

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA DO MAR *Bunodosoma*
caissarum SOBRE O COMPORTAMENTO E O SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO EM CAMUNDONGOS**

Margarete Gondran Carvalho da Silva

Florianópolis, 1999

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA DO MAR *Bunodosoma*
caissarum SOBRE O COMPORTAMENTO E O SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis, 1999

“EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA DO MAR *Bunodosoma caissarum* SOBRE O COMPORTAMENTO E O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EM CAMUNDONGOS”

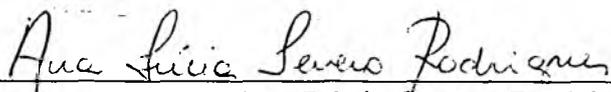
MARGARETE GONDRAN CARVALHO DA SILVA

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.

Orientadora



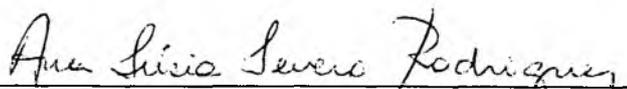
Ana Lúcia Severo Rodrigues

Coordenador do Curso



Nelson Horácio Gabilan

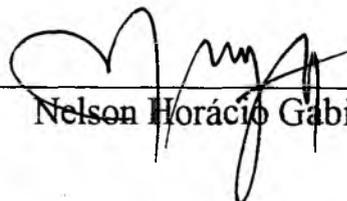
Banca Examinadora



Ana Lúcia Severo Rodrigues (Presidente)



Maribel Antonello Rubin



Nelson Horácio Gabilan

AGRADECIMENTOS

À professora Ana Lúcia Severo Rodrigues pela amizade e dedicação dispensada na orientação deste trabalho.

Ao colega Alan Luiz Eckeli, acadêmico do curso de Medicina da UFSC, pela inestimável colaboração na execução de todos os experimentos.

Ao colega Adair Roberto Santos, doutorando do curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC pelos ensinamentos e auxílio nos ensaios de binding.

Ao prof. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia da UFSC, pela permissão do uso do cintilador beta.

Ao Biotério da UFSC pelo fornecimento dos animais.

Aos bolsistas do Laboratório de Neurotoxicologia (BQA/UFSC) pelo coleguismo.

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da UFSC.

Ao Núcleo de Pesquisa em Construção/ECV pela concessão de horário especial para conclusão deste trabalho, e ao Prof. Humberto R. Roman pelo auxílio na tradução do abstract.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Toxinas e anêmonas do mar	1
1.2 Sistema Nervoso Central	4
1.2.1 O Sistema glutamatérgico e a excitotoxicidade	5
1.3 Convulsões	8
1.4 Drogas anticonvulsivantes	10
1.5 Estudo das alterações comportamentais causadas por substâncias neurotóxicas	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Reagentes	15
3.2 Equipamentos	16
3.3 Animais e tratamento	16
3.4 Anêmonas do mar	17
3.5 Obtenção do extrato bruto	17
3.6 Ensaio de termolabilidade, proteólise e tratamento com esfingomiolina	17
3.7 Dosagem de proteínas	18
3.8 Testes Comportamentais	18

3.8.1 Convulsões induzidas pelo EB	18
3.8.2 Efeito de agentes anticonvulsivantes sobre as convulsões induzidas pelo EB	18
3.8.3 Campo Aberto	19
3.8.4 Nado forçado (“forced swimming test”)	20
3.8.5 Alternação espontânea	21
3.9 Teste Neuroquímico: Ensaio de união específica (“binding”) de [³ H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos	21
3.9.1 Preparação de membranas	21
3.9.2 Determinação da união específica de [³ H]glutamato em membranas	22
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Testes Comportamentais	25
5.1.1 Observação de convulsões induzidas pelo EB via icv	25
5.2 Efeito do pré-tratamento ou co-administração de agentes anticonvulsivantes sobre as convulsões induzidas pelo EB (Grau 4)	28
5.2.1 antagonistas não competitivos do receptor NMDA	28
5.2.2 antagonista competitivo do receptor NMDA	31
5.2.3 bloqueador de canal de cálcio	31
5.2.4 anticonvulsivantes que agem sobre canais de sódio	33
5.2.5 antagonista de glutamato	35
5.3 Tarefa do Campo Aberto com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i>	35
5.4 Tarefa do Nado Forçado com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i>	39
5.5 Tarefa de Alternação Espontânea com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i>	42

5.6 Camundongos tratados com EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via intraperitoneal (ip)	43
5.6.1 Observação das convulsões induzidas pelo EB via intraperitoneal (ip)	43
5.6.2 Avaliação da ambulação no campo aberto pelo tratamento do EB por via ip	45
5.7 Teste Neuroquímico	46
5.7.1 Ensaio da união específica (“binding”) de [³ H] glutamato	46
5.8 Ensaio de termolabilidade, proteólise e tratamento com esfingomielina	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- EB = extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*
- NMDA = N-metil-D-aspartato
- AMPA = 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
- KA = cainato
- AP5 = 2-amino-5-fosfanoverato
- MK-801 = dizolcipine
- SNC = sistema nervoso central
- EqT II = toxina isolada do veneno da anêmona *Actinia equinia*
- ATX II = toxina isolada do veneno da anêmona *Anemonia sulcata*
- Bc2 = citolisina isolada do mucus da anêmona *Bunodosoma caissarum*
- Bc I, II e III = peptídeos neurotóxicos isolados do veneno da anêmona *Bunodosoma caissarum*
- LTP = potencial de longa duração
- PCP = fenciclidina (antagonista não seletivo de NMDA)
- TCP = tienilciclohexilpiperidina (antagonista não seletivo de NMDA)
- PTZ = pentilenotetrazol
- GABA = ácido gama aminobutírico
- NMDLA = N-metil-D,L-aspartato
- CGP 40116 (enantiômero de CGP 37849) = ambos antagonistas de NMDA
- BAY K 8644 = agonista de canal de cálcio
- JSTX-3 = toxina isolada do veneno da aranha *Nephila clavata*
- [³H]glutamato - glutamato radioativo
- GRX - peptídeo neurotóxico da anêmona *Bunodosoma granulifera*
- MCD = peptídeo degranulador de mastócitos isolado do veneno de abelhas
- DTX I = polipeptídeo isolado do veneno da cobra *Dendroaspis angusticeps*
- e.p.m. = erro padrão da média

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de comprometimento neurológico causado pela administração icv do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> .	25
Tabela 2. Efeito do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a atividade locomotora em campo aberto (sessão única de 6 min).	42
Tabela 3. Efeito do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> na alternância espontânea em labirinto em T.	43
Tabela 4. Escala de comprometimento neurológico causado pela administração ip do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> .	43
Tabela 5. Percentagem de convulsões induzidas pelo EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> após tratamento térmico, proteolítico e com esfingomielina.	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem (A) e grau (B) de convulsões produzidas pela administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* 26
- Figura 2.** Latência para o início das convulsões produzidas pela administração do EB de *Bunodosoma caissarum*. 27
- Figura 3.** Efeito do pré-tratamento com MK-801 injetado icv 10 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B) induzidas pelo EB. 29
- Figura 4.** Efeito do pré-tratamento com cetamina injetada icv 10 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B). 30
- Figura 5.** Efeito da co-administração de AP-5 icv com o EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 µg/proteína/sítio) sobre o grau das convulsões. 31
- Figura 6.** Efeito do pré-tratamento com nifedipina injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B). 32
- Figura 7.** Efeito do pré-tratamento com fenitoína injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a latência para o início das convulsões. 33

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com carbamazepina injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B) induzidas pelo EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> .	34
Figura 9. Respostas de levantar (“rearing”) no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	36
Figura 10. Respostas de cruzamento no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	36
Figura 11. Número de bolos fecais no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	38
Figura 12. Número de respostas de auto-limpeza no campo aberto de camundongos com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	38
Figura 13. Latência para sair do primeiro quadrado no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	39
Figura 14. Imobilidade na tarefa do nado forçado de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> por via icv.	41
Figura 15. Imobilidade na tarefa do nado forçado de camundongos tratados com EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> (0,25µg proteína/sítio, icv) e/ou MK-801 (0,01 mg/kg, ip).	41
Figura 16. Grau de convulsão produzida pela administração ip do EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> .	44
Figura 17. Respostas de cruzamento durante 2 min. (A) e 10 min. (B) no campo aberto em camundongos tratados ip com o EB de <i>Bunodosoma caissarum</i> .	45

Figura 18. Efeito de concentrações crescentes do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a união específica (“binding”) de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral.

46

Figura 19. Efeito de concentrações crescentes do EB de *Bunodosoma caissarum* não fervido e fervido por 30 min. sobre a união específica (“binding”) de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral.

47

RESUMO

O veneno da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* contém dois tipos de substâncias biologicamente ativas: citolisinas e neurotoxinas. Este trabalho avaliou o efeito do extrato bruto (EB) desta anêmona, sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em camundongos. Injeção intracerebroventricular (icv) do EB (0,5 a 5 µg proteína/sítio) causou convulsões de forma dose-dependente. Nas doses de 1,5 a 5 µg proteína EB/sítio obteve-se efeito convulsivante máximo, sendo por esta razão a dose de 1,5 µg proteína EB/sítio escolhida para avaliação do efeito de drogas anticonvulsivantes. Convulsões também foram observadas por via intraperitoneal (ip). O tratamento com MK-801 (68 nmol/sítio) e cetamina (50, 75 e 100 mg/Kg, ip), antagonistas não competitivos do receptor NMDA, não afetou o grau e a porcentagem das convulsões, mas alterou significativamente a latência para o início das mesmas. O antagonista competitivo do receptor NMDA, AP5 (1 e 20 µg/sítio) co-administrado com o EB preveniu as convulsões em 68% e 50%, respectivamente. Nifedipina, bloqueador de canal de cálcio do tipo L, nas doses 15, 30 e 45 mg/Kg, ip aumentou a latência, e nas doses 30 e 45 mg/Kg, ip atenuou o grau das convulsões. A administração icv de Riluzol (1 e 10 nmol/sítio), antagonista de glutamato, previniu as convulsões em 88,9 e 87,5% dos animais tratados, respectivamente. Fenitoína (150 mg/Kg, ip), bloqueador de canal de sódio, não foi efetivo contra as convulsões. Carbamazepina, também bloqueador de canal de sódio, aumentou a latência, e diminuiu o grau das manifestações convulsivas, nas doses de 270 e 540 mg/Kg, ip. Nos testes comportamentais, o EB foi avaliado em doses sub-convulsivantes (0,05 - 0,25 µg proteína/sítio). O EB causou déficit na memória de habituação no campo aberto, sem alterar a atividade locomotora e a resposta emocional dos animais. No teste de alternância espontânea em um labirinto em T há evidências de dano hipocampal no grupo tratado com o EB (0,25µg proteína/sítio), devido ao maior número de provas para alternar os braços do labirinto em relação ao grupo controle. No nado forçado, o MK-801 (0,01 mg/Kg, ip) reduziu o tempo de imobilidade, semelhante ao EB. Não houve efeito aditivo ou sinérgico quando ambos foram injetados juntos nos animais (MK-801 ip e EB icv). Em concentrações que variaram de 1 a 20 µg proteína/ml o EB inibiu significativamente o "binding" específico de glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos. Após tratamento térmico (100°C por 30 min), a ação convulsivante EB foi mantida e o binding específico do glutamato não foi alterado. Em presença de tripsina (30 µg/ml no meio de incubação), o EB perdeu sua propriedade convulsivante, mas não após pré-incubação com esfingomiélin (500µg/ml). Deste modo, sugerimos que o mecanismo de ação convulsivante do EB se deve à presença de neurotoxinas em sua composição, interagindo com receptores glutamatérgicos e com canais de cálcio do tipo L.

ABSTRACT

Two types of biologically active substances are found in the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*: cytolytins and neurotoxins. This work investigated the effect of the crude extract of this anemone (CE) on behavioral and neurochemical parameters in mice. Intracerebroventricular injections of CE (0,5 to 5 μg protein/site) caused dose-dependent convulsions in mice. A maximal convulsant effect was obtained from 1,5 to 5,0 μg protein/site of the CE, and therefore the dose of 1,5 μg protein/site was chosen to evaluate the effect of anticonvulsant drugs. Convulsions were also observed by intraperitoneal route (ip). MK-801 (68 nmol/site) and ketamine (50, 75 and 100 mg/kg, ip), non-competitive antagonists of the NMDA receptor, did not affect the degree and the percentage of the convulsions, but significantly changed the time for them to start (latency). The competitive antagonist of the NMDA receptor, AP5 (1 and 2 μg /site) co-administered with CE, prevented the convulsions in 68% and 50% of mice, respectively. Nifedipine, L-type calcium channel blocker, at 15, 30 and 45 mg/Kg, ip increased the latency of the convulsions, while at 30 and 45 mg/Kg, ip attenuated the degree of them. Riluzol (1 and 10 nmol/site, icv), a glutamate antagonist, prevented the convulsion in 88,9 and 87,5% of the treated animals, respectively. Phenytoin (150 mg/kg,ip), a sodium channel blocker, did not antagonized the CE-induced convulsions. Carbamazepine, another sodium channel blocker, at 270 and 540 mg/Kg,ip, increased the latency and decreased the degree of the convulsive manifestations. CE was evaluated on sub-convulsant doses (0,05-0,25 μg protein/site) on behavioral tasks in mice. CE caused a deficit in the memory of habituation in an open-field, without altering the locomotor activity and the emotional response of the animals. In the spontaneous alternation in a T maze, the results suggest a hippocampal damage in the group treated with 0,25 μg protein CE/site, since the number of trials to alternate the arm of the maze was higher in this group as compared to control group. In the forced swimming test, MK-801 (0,01mg/kg,ip) reduced the immobility time in a way similar to CE. There was not an additive or synergic effect of these agents in the forced swimming test when both were administered together to the animals (MK-801 ip and CE icv). CE (1 - 20 μg protein/ml), significantly decreased the specific glutamate binding in cerebral cortical membranes of mice. Both the convulsant action of CE and its effect on glutamate binding were not altered after thermal treatment of CE (100°C for 30 minutes). Moreover, CE lost its convulsant property in presence of trypsin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the incubation medium), but maintained its convulsant effect after pre-incubation with sphingomyelin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Therefore, we suggest that the mechanism underlying the convulsant effect of CE is due to the presence of neurotoxins in its composition, interacting with glutamatergic receptors and with L-type calcium channels.

1. INTRODUÇÃO

Neurotoxinas são substâncias que seletivamente causam dano ao Sistema Nervoso Central (SNC). Por definição toxinas são de origem natural, mas o termo tem sido aplicado a muitas substâncias químicas sintéticas que também agem sobre o SNC (Alan L. Harvey, 1993).

Neurotoxinas têm sido amplamente utilizadas como ferramentas na moderna Neurociências. Muito do nosso presente conhecimento a respeito do mapeamento do SNC, de seu funcionamento, bem como das doenças que o acometem, têm sido obtido com o auxílio de neurotoxinas (MacDonald & Sirvio, 1993).

Esta é uma das razões pelo crescente interesse na exploração e pesquisa de recursos naturais. Muitos trabalhos sobre os efeitos farmacológicos e toxicológicos provocados por produtos naturais obtidos de organismos marinhos têm sido realizados com anêmonas do mar (Kaul, 1982; Kaul & Daftari, 1986), tendo em vista, que são uma rica fonte de proteínas e peptídeos biologicamente ativos tais como: neurotoxinas, cardiotoxinas e hemolisinas (Kem, 1988; Turk, 1991). Estas toxinas despertam nosso interesse pois representam ferramentas de estudos, nos auxiliando na investigação e compreensão de uma variedade de processos bioquímicos (Turk, 1991).

1.1 Toxinas e anêmonas do mar

As anêmonas do mar, em comum com outros membros do Filo Cnidária, possuem órgãos especializados em estocar suas toxinas denominados nematocistos (Turk, 1991), que podem ser encontrados por todo o corpo e mais abundantemente nos tentáculos (Malpezzi & Freitas, 1991). A produção de toxinas está relacionada ao seu estilo sedentário de vida. As anêmonas necessitam de substâncias que as auxiliem na

captura de presas e que as protejam contra ataques de predadores. A maioria das toxinas das anêmonas não representam um risco público, embora já tenha acontecido acidentes durante o verão, com banhistas na costa da Jugoslávia com a anêmona *Anemonia sulcata* (Maretic & Russel, 1982).

Aparentemente, existem quatro classes diferentes de polipeptídeos no veneno das anêmonas do mar: uma de polipeptídeos básicos com peso molecular abaixo de 3.000 Da, e uma de peso molecular variando de 4.000-6.000 Da. Uma terceira classe inclui polipeptídeos com peso molecular variando de 6.000-7.000 Da e a quarta com pesos acima de 10.000 Da. Na primeira e na segunda classe encontramos toxinas que agem sobre membranas excitáveis, principalmente sobre canais do sódio. A terceira classe possui toxinas com atividade inibidora de proteases e a quarta classe exhibe toxinas principalmente com atividades citolíticas (Alsen, 1983).

Nas diferentes espécies de anêmonas, são encontrados com mais frequência os polipeptídeos que agem sobre membranas excitáveis comumente denominados neurotoxinas e os com atividade citolítica denominados citolisinas. A maioria das espécies de anêmonas estudadas possuem os dois tipos de toxinas (Kem & Dunn, 1988; Sensic & Macek, 1990). Citolisinas são produzidas por uma grande diversidade de organismos. Embora com estruturas químicas diferentes, elas interferem com a integridade da membrana celular (Bernheimer, 1986) com fortes evidências de que danificam as membranas por formação de poros (Michaelis, 1979; Zorec et al., 1990; Macek et al., 1995) tornando-a permeável à cátions (Varanda & Finkestein, 1980; Zorec et al., 1990; de los Rios et al., 1998). As citolisinas mais estudadas são aquelas que afetam as membranas de eritrócitos e são chamadas hemolisinas (Turk et al., 1989; Galettis & Norton, 1990; Malpezzi & Freitas, 1991). Toxinas de anêmonas do mar e escorpiões tem efeitos similares sobre os canais de sódio, inibindo a inativação e mantendo o canal aberto (Caterall, 1980). Rogers et al, (1996) demonstraram que estas toxinas (anêmonas e escorpiões) compartilham um mesmo sítio nos canais de sódio neuronal e cardíaco. Com preparações parcialmente purificadas de veneno da anêmona *Condylactis gigantea*, obteve-se um prolongamento do potencial de ação em axônios de

crustáceos (Shapiro, 1968). Estudos posteriores mostraram que estes efeitos eram devido ao retardamento do processo de inativação dos canais de sódio (Narahashi et al., 1969).

Os canais de potássio também são alvos para a ação das toxinas de anêmonas. Segundo Aneiros et al. (1993) a primeira toxina com ação sobre canais de potássio isolada de um organismo marinho foi do gênero *Bunodosoma* (*Bunodosoma granulifera*), embora já existissem toxinas com este efeito de outras fontes, como por exemplo, dendrotoxina do veneno de cobra (Harvey, 1997). Em fibras musculares de lagostim e em cultura de células cromafins bovinas, uma fração obtida do veneno da anêmona *Bunodosoma cangicum* provocou um bloqueio seletivo e reversível sobre as correntes de potássio dependentes de cálcio (Araque et al., 1995). Pennington et al. (1995), caracterizaram e sintetizaram uma potente toxina da anêmona *Stichodactyla helianthus* que inibe canais de potássio. Posteriormente foram identificados sítios de ligação desta toxina nos canais de potássio em linfócitos humanos e em cérebro de ratos (Pennington et al., 1996).

As toxinas do veneno das anêmonas do mar podem ainda causar outros efeitos farmacológicos em diferentes tecidos, tais como: edema pulmonar, queda da pressão sangüínea, deficiência respiratória e bradicardia pela toxina EqT II (Sket et al., 1974), atividade ionotrópica positiva pela toxina tenebrosina C (Galletis & Norton, 1990), além de atividade histaminolítica (Elliot et al., 1986) e agregação plaquetária (Teng et al., 1988). Atividade estimulante central semelhante às anfetaminas foi encontrada numa fração da anêmona *Stoichactis kenti* em camundongos (Turlapaty et al., 1973), produzindo sintomas como ataxia, catalepsia, e convulsões tônicas, podendo chegar a morte. Sintomas neurotóxicos também foram observados após a administração do mucus da anêmona *Bunodosoma granulifera* em camundongos, tais como sensibilidade ao som e ao toque, efeitos semelhantes ao bloqueio de canais de potássio pela dendrotoxina (Aneiros et al., 1993). O poder letal destas toxinas sobre pequenos mamíferos também foi relatado por Alsen et al. (1978) com a toxina ATX II da anêmona *Anemonia sulcata*. Antes da morte, sintomas como sonolência, ataxia, redução da frequência respiratória e convulsões foram observados.

Bunodosoma caissarum é uma anêmona do mar do litoral brasileiro que possui os dois tipos de toxinas no seu veneno. A atividade hemolítica do seu veneno foi investigada e comprovada em eritrócitos de diferentes espécies (peixes, cobras, sapos e camundongos) por Malpezzi & Freitas (1991). Um aumento da liberação do neurotransmissor glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos por uma fração hemolítica (Bc2) de seu mucus (obtido pelo processo chamado de “milking”), foi obtida recentemente por Míguas et al. (1999). As neurotoxinas (BcI, BcII e BcIII), também presentes em seu veneno têm efeito despolarizante nas células nervosas de crustáceos (Malpezzi et al., 1993). Aumento da permeabilidade vascular em vários tecidos de ratos também foi demonstrado recentemente por uma outra fração obtida do seu extrato bruto (Muniz, 1998). Muitos estudos sobre a neurotoxicidade de certos venenos (cobra, escorpiões, anêmonas) têm sido feitos sobre o sistema nervoso periférico, principalmente sobre a junção neuromuscular. No SNC os estudos se limitam a preparações *in vitro* e até o presente pouco é conhecido sobre o mecanismos de ação dessas neurotoxinas.

1.2 Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central é constituído pelo cérebro e pela medula espinhal. O órgão mais importante e complexo é o cérebro. Nele existem cerca de 100 bilhões de neurônios conectados entre si por sinapses (Nichols, 1993). A comunicação é feita por substâncias químicas chamadas de neurotransmissores. Os neurotransmissores são produzidos pelo neurônio pré-sináptico e estocados em vesículas no terminal axônico. O neurônio pós-sináptico contém estruturas protéicas denominadas receptores, através dos quais os neurotransmissores convertem os sinais intercelulares em sinais intracelulares. Os neurotransmissores podem ser classificados em três categorias: amino ácidos, aminas e peptídeos. Os aminoácidos e aminas são pequenas moléculas estocadas em vesículas, e

os peptídeos são moléculas maiores estocados em grânulos secretórios. A liberação do neurotransmissor é iniciada pela chegada de um potencial de ação no neurônio pré-sináptico. O potencial de ação despolariza a membrana e permite um influxo de cálcio. A elevação do cálcio intracelular é um sinal que causa a liberação do neurotransmissor por um processo conhecido como exocitose. Imediatamente após a interação do neurotransmissor com o receptor pós-sináptico, este deve ser retirado da fenda para permitir uma nova transmissão sináptica. A retirada do neurotransmissor pode ser simplesmente por difusão da fenda. Para alguns amino ácidos a retirada pode ser auxiliada por recaptadores localizados nas membranas pré-sinápticas e glial. Outra forma de retirada do neurotransmissor é através de sua degradação por enzimas na própria fenda (Machado, 1993). Cada passo da transmissão sináptica pode ser afetado por drogas e toxinas específicas, e isto tem possibilitado o nosso entendimento das funções neurais e os comportamentos relacionados a elas (Bear et al., 1996).

1.2.1. O Sistema Glutamatérgico e a Excitotoxicidade

O glutamato e em menor extensão o aspartato, são os neurotransmissores excitatórios do SNC, sendo responsáveis por diversas funções cerebrais, incluindo plasticidade neuronal, aprendizado e memória. O glutamato é liberado das terminações nervosas glutamatérgicas na fenda sináptica em resposta a uma despolarização e age sobre receptores pós-sinápticos (Fonnum, 1984; Greenamyre & Porter, 1994; Cotman et al., 1995).

O papel principal do glutamato está na transmissão rápida de informações (Nicholls, 1993), porém o interesse maior se concentra no seu envolvimento na indução da LTP (potencial de longa duração), processo que vem sendo repetidamente proposto como o mecanismo base do aprendizado e da memória (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993).

Os receptores do glutamato estão localizados em praticamente todas as células do SNC, sendo classificados em duas categorias: metabotrópicos e ionotrópicos. Os ionotrópicos são canais iônicos associados a fluxos de cátions (sódio, potássio e cálcio) e os metabotrópicos são receptores ligados à proteína G. Os receptores ionotrópicos foram subdivididos em NMDA, AMPA e KA sensíveis ao N-metil-D-aspartato, 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato e cainato, respectivamente (Whetsell, 1996).

O receptor NMDA é o mais estudado dos receptores glutamatérgicos. Apesar do receptor NMDA não ser um canal voltagem-dependente, ele é bloqueado pelo íon magnésio, sendo este bloqueio dependente de voltagem. Este bloqueio é removido por despolarização da membrana. O receptor NMDA também é bloqueado pelo zinco num sítio distinto do sítio do magnésio (Wong & Kemp, 1991). Outro sítio bloqueador é um sítio localizado dentro do canal, sensível ao PCP (fenciclidina), onde também podem ligar-se antagonistas como cetamina e o MK-801. A ativação do receptor NMDA é modulada por poliaminas, como a espermina e espermidina e pelo aminoácido glicina. A ligação da glicina no receptor NMDA parece ser essencial para abertura do canal, e por isto é conhecida como um co-agonista. A presença das poliaminas aumenta a habilidade do glutamato e da glicina em abrir o canal do receptor NMDA (McEntee & Crook, 1993; Greenamyre & Porter, 1994).

A mais fascinante ironia da vida e da morte neuronal é que o glutamato, além de seu reconhecido papel fisiológico, é também o maior causador de morte neuronal, podendo comportar-se como um agente neurotóxico. Em certas situações, altas concentrações de glutamato podem se acumular na fenda sináptica e iniciar um processo excitotóxico. Tais situações incluem uma prolongada e excessiva liberação de aminoácidos excitatórios que junto com uma anormalidade no sistema de recaptção comprometem a vitalidade neuronal e glial (Meldrum & Garthwaithe, 1990; Vornov et al., 1993). A presença de glutamato em altas concentrações na fenda sináptica, causa morte neuronal por uma excessiva estimulação de seus receptores pós-sinápticos, cuja ativação promoverá a entrada de cálcio e sódio para dentro das células. Esse processo é

conhecido como excitotoxicidade. O aumento do influxo de cálcio através dos receptores NMDA, desempenha um papel crítico na excitotoxicidade. A excitotoxicidade tem sido recentemente implicada em algumas injúrias agudas, tais como isquemia (Nicholls, 1993) hipóxia, hipoglicemia e convulsões (Meldrum & Garthwaithe, 1990; Nakanishi & Masu, 1994) e também na patogênese de várias doenças neurodegenerativas progressivas tais como Parkinson, Alzheimer e Huntington (Rothman & Olney, 1986; Beal, 1992).

A excitotoxicidade pode se apresentar de duas formas. A primeira, dependente de sódio e cloreto extracelulares, se manifesta por um agudo inchamento (“swelling”) visto a princípio nos dendritos e depois atinge todo o corpo celular (Whetsell, 1996). O segundo, um processo mais lento, dependente de cálcio extracelular, ativa várias enzimas que desencadeia e amplifica uma cascata de eventos neurotóxicos (Choi & Rothman, 1990; Godfraind & Govoni, 1995; Whetsell, 1996). Em ambos os casos resulta em morte celular.

A descoberta de toxinas no veneno de certos animais ou plantas que antagonizem ou mimitizem respostas do glutamato em diferentes modelos biológicos tem gerado interesse em vista de seu potencial para aplicações clínicas e como ferramentas para pesquisas em neurotransmissão. Uma fonte de antagonistas glutamatérgicos têm sido encontrada no veneno de certas espécies de aranhas (Usmanov et al., 1985; Akaide et al., 1987; Sherrell & Michaelis, 1987; Jackson & Usherwood, 1988; Kawai, 1991). JSTX-3 uma toxina de aranha (*Nephila clavata*), inibiu convulsões induzidas por agonistas de glutamato (Himi et al., 1990b). Michaelis et al (1984) obtiveram inibição do união específica (“binding”) de L-glutamato em membranas sinápticas de ratos por toxinas do veneno de três espécies de aranhas. Foi purificada uma toxina de baixo peso molecular do veneno de abelhas, com ação antagonista de glutamato em sinapses de músculos de insetos (Eldefrawi, 1988). Em anêmonas do mar, o antagonismo de respostas de glutamato foi demonstrado por uma fração (D) do exudato da espécie *Phyllactis flosculifera*, sobre potências evocados por agonistas de glutamato em neurônios centrais de moluscos (*Zachrysia guanensis*) e sobre a atividade de neurônios isolados do ouvido

interno de *Ambystoma tigrinum*, uma espécie de salamandra (Garateix et al., 1996). Resultado semelhante foi obtido por uma fração (P3) da anêmona *Physalia physalis* também sobre potenciais evocados pelo glutamato em neurônios de caracóis (*Zachrysis guanensis*) e em junção neuromuscular de lagostim (*Cambarus clarkii*), a qual é reconhecida como sendo glutamatérgica (Mas et al., 1989).

Estudos utilizando as anêmonas do mar como fonte destas substâncias sobre o SNC de mamíferos, não têm sido muito explorados. Desta forma, mais estudos no campo da neurociências, utilizando toxinas de anêmonas do mar como ferramentas na investigação da transmissão glutamatérgica ou em eventos bioquímicos neuronais patológicos tais como convulsões, podem ser úteis futuramente para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas.

1.3 Convulsões

Convulsões têm sido amplamente usadas como modelos experimentais para o estudo da epilepsia. Os modelos experimentais podem ser do tipo genético, elétrico, físico ou químico. O modelo químico é feito por aplicação ou retirada de substâncias químicas com o conseqüente aparecimento dos sintomas epiléticos. Os modelos químicos podem diferir de acordo com as preparações usadas e suas aplicações. Estes incluem sistemas *in vivo* e *in vitro*. Os modelos *in vitro* incluem fatias cerebrais, sistemas monossinápticos ou culturas neuronais. *In vivo* as preparações tendem a imitar algumas ou todas as alterações da síndrome epilética humana (De Deyn et al., 1992). Epilepsia se refere a uma síndrome de desordens neurológicas caracterizadas por descargas cerebrais espontâneas, chamadas ataques (Meldrum, 1994). Várias substâncias possuem a capacidade de induzir ataques convulsivos em modelos animais. Entre eles podemos citar: pentilenotetrazol, bicuculine, penicilina, picrotoxina, betacarbolinas, hidrazidas, aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato, NMDA, quisqualato, cainato, ácido quinolínico), metais (alumina, cobalto, zinco, ferro), neuropeptídeos (opiódos, fator de

liberação de corticotropina, somatostatina, vasopressina), agentes colinérgicos, toxina tetânica, e outros. Pentilenotetrazol (PTZ) é o agente clássico dos convulsivantes sistêmicos. Ao nível sináptico ele interage com receptores GABA tipo A, possivelmente no mesmo sítio da picrotoxina (antagonista GABA A). Quando administrado sistemicamente, picrotoxina induz o aparecimento de hiperatividade, tremores por todo o corpo, extensão tônica das patas traseiras e ataques tônico-clônicos generalizados (De Deyn et al., 1992).

Registros feitos no hipocampo mostram que durante os ataques muitos neurônios disparam em sincronia resultantes de impulsos excitatórios sincronizados. Este padrão de atividade pode se espalhar pela vizinhança por um progressivo recrutamento de neurônios no córtex ou da região CA3 para a região CA1 do hipocampo. Esta disseminação pode atingir inclusive estruturas do sistema límbico. Estudos *in vitro* com fatias hipocampais ou corticais mostram que este fenômeno ocorre por mudanças iônicas, ou por fatores que diminuem a inibição do GABA, ou ainda por fatores que aumentam a excitação do receptor NMDA (Meldrum, 1994).

Papéis específicos para os receptores NMDA na epilepsia têm sido propostos (Dingledine et al., 1990). Um exemplo, são os intensos disparos neuronais sensíveis aos aminoácidos excitatórios, que permitem a ativação dos receptores NMDA por longo tempo. O aumento da eficácia sináptica resultante desta ativação pode ser um dos mecanismos do evento epiléptico. Outro fator que contribui para a participação dos aminoácidos excitatórios é que embora muitos ataques induzidos quimicamente sejam fracamente atenuados ou não afetados por antagonistas competitivos ou não competitivos de seus receptores, estes compostos desempenham propriedades anticonvulsivantes em modelos experimentais de epilepsia (Collingridge & Lester, 1989). Os neurotransmissores excitatórios causam convulsões quando administrados no cérebro (De Deyn et al., 1992). Injeções repetidas de glutamato ou aspartato (3 $\mu\text{mol/icv}$) em ratos causam hiperventilação, sacudidas corporais, tremores, e convulsões tônico-clônicas generalizadas e praticamente metade dos animais morrem durante o “status epiléptico” (Sloviter & Dempster, 1985). Aminoácidos exógenos, tais como NMDA, quisqualato,

cainato e outros são poderosos excitantes neuronais (Collingridge & Lester, 1989). Sintomas semelhantes aos apresentados pelo glutamato e aspartato são observados após injeção icv destes aminoácidos em camundongos (Turski et al., 1990).

1.4 Drogas anticonvulsivantes

Das atuais drogas clássicas utilizadas clinicamente na terapia antiepiléptica, algumas são efetivas contra ataques parciais e ataques tônico-clônico generalizado, tais como fenitoína e carbamazepina. Estas drogas atuam sobre canais de sódio, prolongando o tempo de inativação do canal. Entretanto ambas são, juntamente com trimetadiona e etosuximide inefetivas contra convulsões induzidas por NMDA, quisqualato e cainato (Turski et al., 1990). Antagonistas dos aminoácidos excitatórios que agem sobre receptores ionotrópicos são também anticonvulsivantes em modelos animais de epilepsia, porém seus efeitos clínicos ainda são pouco efetivos e alguns possuem muitos efeitos colaterais indesejados (Meldrum, 1994). MK-801, antagonista não competitivo do receptor NMDA, potentemente bloqueia os ataques induzidos por NMDLA (enantiômero do NMDA), pentilenotetrazol, eletrochoque e som. PCP, TCP e cetamina também foram efetivos contra ataques induzidos por NMDLA, mas com potências muito superiores ao MK-801, sendo a cetamina, o mais inferior dentre eles (Tricklebank et al., 1989). Ubc L059, um análogo etil do piracetam mostrou atividade anticonvulsivante em vários modelos animais. Este composto foi ativo após administração oral e intraperitoneal em ratos e camundongos em ataques audiogênicos, convulsões induzidas eletricamente e quimicamente por PTZ, bicuculine, picrotoxina e NMDA (Gower et al., 1992). CGP 40116 uma enantiômero ativo de um novo antagonista competitivo do receptor NMDA, CGP 37849, reduziu a incidência e a severidade de convulsões induzidas por pilocarpina (Starr & Starr, 1994).

Embora a epilepsia seja adequadamente controlada na maioria dos pacientes, alguns permanecem intratáveis e/ou respondem parcialmente ao tratamento (Gower et al., 1992). Muitas evidências associam os eventos excitatórios mediados pelo glutamato ou outros amino ácidos excitatórios no SNC à atividade epilética humana. Quando uma droga bloqueia uma determinada população de receptores de aminoácidos excitatórios, o glutamato ainda pode produzir seus efeitos sobre populações de receptores que estejam desbloqueados. Isto limita a atividade anticonvulsivante de antagonistas de NMDA quando aplicados sozinhos (Czuczwar et al., 1995). A partir desta observação, orientou-se os estudos para a avaliação da interação entre antagonistas de NMDA e também com outras drogas antiepilépticas convencionais (Czuczwar et al., 1996). Em 1984, Czuczwar et al., já forneciam evidências da interação de antagonistas de NMDA com drogas antiepilépticas, usando AP5 (2-amino-5-fosfonovalerato). Esta droga aumentava de forma significativa a ação anticonvulsivante do fenobarbital e difenilidantoína. Nestes estudos, os autores não levaram em conta os efeitos adversos destes tratamentos combinados, visto que o AP5 era usado em altas doses sistêmicas, devido a sua pobre penetração no sistema nervoso central. Quando, drogas que melhor penetravam no SNC se tornaram acessíveis, mostrou-se que o MK-801 potencializa os efeitos protetores do valproato e fenobarbital (Urbanska et al., 1991).

Existem evidências de que o cálcio é um fator importante para a indução da atividade epilética (Czuczwar et al., 1990). A abertura de canais de cálcio permite a liberação de neurotransmissores e contribuem para o processo convulsivo. BAY k 8644 um agonista de canal de cálcio da classe das dihidropiridinas foi usado por Shelton et al., (1987) para investigar o papel do cálcio na epileptogênese. Os ataques apresentados após a administração icv desta droga em camundongos foram revertidos por inibidores de canais de cálcio, mas não por drogas clássicas como carbamazepina, pentobarbital e diazepam. Uma variedade de antagonistas de canais de cálcio tem provado ser efetivos contra convulsões em diferentes modelos experimentais (Czuczwar et al., 1994; Gasoir et al., 1995; Gasoir et al., 1996). A influência de antagonistas de canal de cálcio e de receptores glutamatérgicos sobre a eficácia de drogas antiepilépticas, tem sido

intensamente investigado, na busca de uma melhor terapia em benefício do tratamento da epilepsia humana (Czuczwar et al., 1994; Czuczwar et al., 1995; Gasoir et al., 1995; Kleinrok et al., 1995; Czuczwar et al., 1996; Gasoir et al., 1996).

1.5 Estudo das alterações comportamentais causadas por substâncias neurotóxicas.

A observação de alterações comportamentais em animais experimentais têm sido freqüentemente utilizada para avaliar a funcionalidade do SNC, e para estudar efeitos adversos de agentes químicos e/ou físicos sobre organismos (World Health Organization, 1986). Levando em conta que o comportamento é o produto final da atividade do sistema nervoso, o qual pode ser inclusive afetado pelo funcionamento de outros sistemas, alterações causadas por agentes tóxicos podem refletir-se em alterações comportamentais. Tem sido demonstrado que uma série de agressões ao SNC se manifestam por distúrbios de comportamento (Da Silva et al., 1990; Himi et al., 1990a, Moreira et al., 1996; Rodrigues et al., 1996). Alguns estudos comportamentais foram realizados com toxinas de cobra, como a crotoxina (Moreira et al., 1996), dendrotoxina (Silveira et al., 1988), com um peptídeo do veneno do *Conus geographus* (Oliveira et al., 1985) e também com um peptídeo com atividade tipo fosfolipase A2 do veneno da cobra *Oxyuranus scutellatus* (Gandolfo et al., 1996). Alterações cognitivas em camundongos causadas por injeção intracerebroventricular de JSTX-3, uma toxina de aranha com atividade bloqueadora de receptores de glutamato, foram observadas por Himi et al. (1990a,b).

Relatos de alterações comportamentais causadas por neurotoxinas extraídas de animais, principalmente de anêmonas do mar, ainda são poucos na literatura. Entretanto, eles são de grande importância no sentido de direcionar estudos bioquímicos e farmacológicos a respeito do mecanismo de ação destas toxinas, sobre o sistema nervoso central. A análise comportamental de animais tratados com venenos também pode contribuir para fornecer componentes neuroprotetores e/ou substâncias para modelos de

lesões do SNC.

Ensaio piloto realizado no nosso laboratório demonstraram que a injeção icv do extrato bruto (EB) da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* provocava convulsões em camundongos de forma dose dependente, sendo que o padrão destas convulsões se assemelhava aos padrões convulsivos provocados por glutamato e aspartato, tais como: hiperventilação, sacudidas corporais, tremores, pulos, convulsões clônicas generalizadas e convulsões tônico-clônicas (Sloviter & Dempster, 1985).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar alguns efeitos comportamentais e neuroquímicos deste extrato bruto (EB) da anêmona *Bunodosoma caissarum* sobre o SNC de camundongos, dando ênfase ao sistema glutamatérgico.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral do presente trabalho é estudar o mecanismo de ação envolvido na ação convulsivante do extrato bruto (EB) da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* através de testes comportamentais e neuroquímicos, dando ênfase sobre sua interação com o sistema glutamatérgico em camundongos.

2.2 *Objetivos específicos:*

1. Realizar estudos comportamentais (nado forçado, campo aberto e alternância espontânea) em doses subconvulsivantes do EB.
2. Verificar o efeito de anticonvulsivantes (antagonistas de NMDA, bloqueadores de canal de cálcio, bloqueadores de canal de sódio, antagonista de glutamato) sobre as convulsões induzidas pelo EB.
3. Verificar os efeitos do EB sobre a união específica de [³H]glutamato em córtex cerebral de camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido clorídrico - Merck

Albumina de soro bovino - Sigma, St. Louis, MO

AP5 = 5-aminofosfonovalerato - Sigma, St. Louis, MO

Carbamazepina - Sigma, St. Louis, MO

Carbonato de sódio - Reagen

Cetamina - Sigma, St. Louis, MO

Cloreto de magnésio - Reagen

Cloreto de sódio - Reagen

Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Sigma, St. Louis, MO

DMSO - Sigma, St. Louis, MO

Esfingomielina - Sigma, St. Louis, MO

Etanol absoluto - Merck

Fenitoína - Sigma, St. Louis, MO

Folin-Ciocalteu - Sigma, St. Louis, MO

Glutamato - Sigma, St. Louis, MO

[³H]glutamato (46 Ci/mmol) - Amershan International, U. K.

Hidróxido de sódio - Reagen

Imipramina - Sigma, St. Louis, MO

Líquido de cintilação - Packard

MK-801 - RBI, MA, USA

Nifedipina - Sigma, St. Louis, MO

NMDA = N-metil-D-aspartato - Sigma, St. Louis, MO

Riluzol - Sigma, St. Louis, MO

Sacarose - Reagen

Sulfato de cobre - Reagen

Tripsina - Merck
Tartarato de sódio e potássio - Reagen
Tris(hidroximetil)aminometano - Sigma, St. Louis, MO
Tween 80 - Sigma, St. Louis, MO

3.2 Equipamentos

Agitador de tubos QUIMIS
Balanças: analítica Sartorius e semi-analítica Gehaka BG 200
Banho térmico PMC e FANEM
Centrífuga refrigerada Hitachi, centrífugas para eppendorf FANEM e Denver
Cintilador Packard
Espectrofotômetro Micronal B382 e B342 II
Estufa FANEM
Freezer a - 20°C
Potenciômetro Nova Técnica

3.3 Animais e tratamento

Foram utilizados camundongos suíços, machos adultos (com cerca de três meses de idade, pesando entre 30 e 35 g) fornecidos pelo Biotério da UFSC, mantidos em ciclo claro escuro de 12 horas em temperatura ambiente, com livre acesso à comida e água. Os animais foram expostos ao extrato bruto da anêmona *Bunodosoma caissarum* (EB) através de injeção intracerebroventricular (icv) e intraperitoneal (ip). Para injeção icv os animais foram anestesiados com éter e as injeções receberam as seguintes orientações: Imm lateral e 1mm posterior ao bregma e 2,4 mm de profundidade (De Sarro et al., 1996), usando uma microseringa Hamilton de 10 µl conectada por uma cânula de polipropileno à agulha injetora. O grupo controle recebeu injeção de veículo (salina) com o mesmo volume injetado do grupo tratado com o EB (4 µl/sítio). A administração do EB ou de salina por via ip foi na proporção de 10 ml/kg de peso corporal.

3.4 *Anêmonas do mar*

As anêmonas do mar *Bunodosoma caissarum* foram coletadas na praia da Armação em Florianópolis, Ilha de Santa Catarina.

3.5 *Obtenção do Extrato Bruto (EB)*

Para a obtenção do extrato bruto, as anêmonas foram trazidas até o laboratório e mantidas em água do mar. Os tentáculos foram retirados junto com o disco oral e cortados em pequenos pedaços. Colocou-se 0,8 g em cada tubo de centrifuga (quatro tubos) junto com 4 ml de água milli-Q. Homogeneizou-se o tecido e o mesmo foi centrifugado a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e os sobrenadantes foram misturados. Este sobrenadante foi dividido em tubos eppendorf contendo cada um 1 ml. Estes foram novamente centrifugados a 12.000g durante 5 minutos. Novamente os precipitados foram descartados e os sobrenadantes misturados. Este último sobrenadante foi estocado em amostras de 200 µl no freezer (Gabilan, 1992). Estas amostras foram utilizadas para os experimentos deste trabalho, sendo o extrato bruto referido como EB.

3.6 *Ensaio de termolabilidade, proteólise e tratamento com esfingomielina*

Para determinar se havia a participação de citolisinas na sua ação convulsivante, o EB foi submetido a dois ensaios: 1) incubação em uma solução de esfingomielina (500 µg/ml), um inibidor da atividade citolítica do veneno de anêmonas do mar, e 2) exposição a temperatura de 100°C por 30 minutos.

Um terceiro ensaio foi realizado para determinar se o(s) agente(s) convulsivante(s) presente(s) no EB tinha(m) caráter protéico. Desta forma o EB foi incubado em salina pH 6,5 com uma solução 30 µg/ml de tripsina em banho-maria à 37°C por 30 minutos, para digestão do(s) componente(s) protéico(s), de acordo com Monks et al., (1994), com pequenas modificações. Antes da injeção icv nos animais, o EB submetido à proteólise sofreu tratamento térmico a 100°C também por 30 minutos, para inibição da atividade da tripsina.

3.7 Dosagem de Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino como padrão.

3.8 Testes Comportamentais

3.8.1 Convulsões induzidas pelo EB

Após a administração icv ou ip do extrato bruto (EB) da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* nos camundongos, foi observado o tempo em segundos para o aparecimento de convulsões (latência) e a elas estabelecido um grau de acordo com a evolução e gravidade da manifestação.

3.8.2 Efeitos de agentes anticonvulsivantes sobre as convulsões induzidas pelo EB

A administração prévia ou simultânea de agentes farmacológicos com o intuito de prevenir as convulsões foi realizado de acordo com Gandolfo et al. (1996) e Ghauri et al (1996). O antagonista não competitivo do receptor NMDA, MK-801, foi administrado por via icv 10 minutos antes da administração do EB (administração em ventrículos laterais opostos). AP5, um antagonista competitivo de NMDA, foi administrado

simultaneamente com o EB por via icv. Por via ip foram administrados cetamina (antagonista não competitivo NMDA), nifedipina (bloqueador de canal de cálcio), carbamazepina e fenitoína (bloqueadores de canal de sódio), riluzol (bloqueador de glutamato), 15 minutos antes da injeção do EB. Observou-se o tempo, após a injeção do EB que cada animal levava para manifestar os sinais convulsivos (latência) e a gravidade dos mesmos (grau). Nos casos em que os animais não apresentaram convulsões, anotou-se a porcentagem de animais protegidos. Para todos os ensaios realizados, foram feitos grupos controles, com animais injetados com salina. Também foram realizados controles com as respectivas substâncias anticonvulsivantes, além do seu agente solubilizante (DMSO ou Tween). Os antagonistas de receptor NMDA, MK-801, cetamina e AP5, foram dissolvidos em salina. Nifedipina e riluzol foram diluídos em DMSO e seu volume completado com salina. Carbamazepina e fenitoína foram suspensos em uma solução 1% de Tween, sendo também o volume final completado com salina. Todas as soluções tinham pH mantidos entre 6 e 7.

3.8.3 Campo Aberto

Esta tarefa foi realizada em camundongos machos adultos conforme descrito por Rodrigues et al. (1996). Os animais foram tratados com doses subconvulsivantes do EB (0,05; 0,10 e 0,25 µg proteína/sítio) e submetidos a três sessões, com intervalos de 24 horas entre elas, sendo a primeira sessão realizada 30 minutos após a injeção do EB, em uma caixa de madeira medindo 40X60X50 cm. O chão da caixa foi dividido em 12 quadrados iguais. A parte frontal da caixa era de vidro, para facilitar o trabalho do observador. Foram observados o número de respostas de orientação (“rearings”) ao longo das sessões, para avaliar a memória de habituação e o número de respostas de cruzamentos para avaliar a atividade locomotora. O número de quadrados atravessados com as quatro patas correspondia ao cruzamento. A elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco correspondia às respostas de orientação. As atividades de auto-limpeza e

defecação e também a latência para sair do primeiro quadrado, caracterizada como timidez do animal, são parâmetros que nos fornecem dados sobre o perfil emocional dos animais (Archer, 1973; Moreira et al., 1996).

3.8.4 Nado forçado (“forced swimming test”)

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt et al., (1977), para auxiliar a pesquisa com drogas antidepressivas. O objetivo era criar um modelo animal que reproduzisse comportamento semelhante a depressão e que fosse sensível a drogas clinicamente efetivas utilizadas no tratamento desta doença. O modelo se baseou na observação de que ratos e camundongos (Porsolt et al., 1979) quando forçados ao nado numa situação da qual eles não poderiam escapar, após um período de agitação, adotam uma postura de imobilidade. Um camundongo é considerado imóvel quando ele flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água.

Camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB (0,05; 0,10 e 0,25), MK-801/EB e MK-801 (0,01 mg/Kg, ip), tiveram sua imobilidade avaliada no teste do nado forçado durante um período de 6 minutos conforme descrito por Kitamura & Nagatani (1996), em um cilindro plástico (altura 24 cm, diâmetro 10cm) contendo 19 cm de água a 25°C. O grupo controle foi tratado com salina. Imipramina (antidepressivo tricíclico), foi utilizada como droga de referência (controle positivo). MK-801 (antagonista NMDA) mimetiza os efeitos de antidepressivos clinicamente efetivos neste modelo (Trullas & Skolnick, 1990). O uso do MK-801, para se fazer o estudo comparativo com o EB, se deu em razão do conhecimento prévio do seu mecanismo de ação sobre os receptores NMDA. Os mesmos grupos experimentais (experimentos independentes) foram avaliados quanto à atividade locomotora em uma única sessão de 6 minutos no campo aberto a fim de excluir um eventual efeito locomotor das drogas utilizadas sobre a imobilidade na tarefa do nado forçado.

3.8.5 Alternação Espontânea

Esta tarefa é utilizada para avaliar a integridade da formação hipocampal e foi realizada essencialmente conforme descrito por Da Silva et al. (1990), em uma caixa de madeira no formato de T, com os braços menores medindo 20 cm e o braço maior 34 cm, com 8 cm de largura. O camundongo foi colocado na extremidade do braço maior e observado o tempo em que o mesmo levava para entrar em um dos braços menores. Em seguida o animal era retirado da caixa e após um intervalo de 15 segundos, era recolocado na extremidade do braço maior, e novamente observava-se o tempo em que o mesmo levava para entrar em um dos braços. Assim que o animal alternava os braços era terminada a sessão. Era permitido ao animal 5 tentativas num período que não excedesse 300 segundos. Assim sendo, foi registrada a prova em que o camundongo alternou os braços do labirinto e o tempo total(s) necessário para executá-lo.

3.9 Teste Neuroquímico: Ensaio de união específica (“binding”) de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos

3.9.1 Preparação de membranas

Para obtenção de fragmentos de membranas foi utilizado o procedimento descrito por Souza & Ramirez (1991). Os animais foram sacrificados e o cérebro imediatamente retirado. O córtex cerebral após ser removido foi pesado e homogeneizado em 20 volumes de uma solução com sacarose 0,32 M, Tris/HCl 10 mM pH 7,4 e MgCl₂ 1 mM em um potter de vidro contendo duas vazas: A (mais folgada) e B (mais justa), com 10 movimentos manuais de vai e vem, com cada uma das vazas. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g (3.000 rpm) durante 15 minutos em uma centrífuga refrigerada. O sobrenadante (S1) desta centrifugação foi mantido no gelo. O precipitado desta centrifugação, contendo a fração nuclear, “debris” celulares e um pouco de mielina, foi ressuspenso no mesmo volume do tampão utilizado inicialmente e procedeu-se uma nova

centrifugação a 1.000 g por novamente 15 minutos. O segundo precipitado foi desprezado e o sobrenadante (S2) misturado ao S1. A mistura dos sobrenadantes (S1 e S2) foi centrifugada a 27.000 g (16.000 rpm) a 4°C durante 15 minutos. O precipitado resultante foi ressuspensão em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM pH 7,4 e permaneceu no gelo por 30 minutos para que fosse processada a lise das vesículas. O lisado foi submetido a uma nova centrifugação de 27.000 g também por 15 minutos. O precipitado obtido foi lavado 3 vezes em tampão Tris/HCl 10 mM pH 7,4 (ressuspensão no tampão seguida de centrifugação a 27.000 g por 15 minutos). O precipitado resultante da terceira lavagem foi ressuspensão em tampão Tris/HCl 10 mM pH 7,4. A concentração proteica obtida foi de 2-2,5 mg/proteína/ml de membrana.

3.9.2 Determinação da união específica de [³H]glutamato em membranas

Os ensaios para determinação da união específica de [³H]glutamato em membranas de córtex de camundongos foram realizados a 30°C, em um tempo de incubação de 30 minutos, em tubos eppendorf. Eles continham 0,1 ml de membrana, Tris/HCl 50 mM pH 7,4, e [³H]glutamato 40 nM (46Ci/mmol), em um volume final de 0,5 ml, com ou sem glutamato não radiotivo 40 µM (para medida da união total e inespecífica, respectivamente) (Elisabetsky et al., 1995). A fim de determinar o efeito do EB sobre a união específica do glutamato, concentrações crescentes (0,5 a 20 µg proteína/ml) foram adicionadas ao meio de incubação. Após a incubação os eppendorfs foram centrifugados por 20 minutos para separar o [³H]glutamato não unido às membranas. O sobrenadante de cada tubo foi removido com pipeta Pasteur e imediatamente foi efetuada uma lavagem rápida e cautelosa das paredes dos eppendorfs e do precipitado com água milli-Q a 4°C. Os eppendorfs foram cuidadosamente secados

com cotonetes e a eles foi adicionado 300 µl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% para solubilizar as proteínas. Os eppendorfs permaneceram em repouso por cerca de 12 horas. Após este período, os eppendorfs foram colocados em estufa a 60°C durante 15 minutos e então agitados em vortex. A cada eppendorf foi adicionado 1,2 ml de líquido de cintilação. Os eppendorfs foram colocados dentro de vials de vidro e a radioatividade lida em cintilador beta. A união específica de [³H]glutamato foi calculada pela diferença entre a união total e a inespecífica. Por união inespecífica entende-se a união de [³H]glutamato na presença de glutamato não radioativo em uma concentração 1.000 vezes superior ao de [³H]glutamato.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post-hoc* de Duncan para comparação entre os grupos, quando apropriado. Os resultados do campo aberto foram analisados através ANOVA de duas vias (4 grupos experimentais - controle, 0,05; 0,10 e 0,25 µg proteína do EB X três sessões) com a sessão considerada como medida repetida. A fim de atingir os requisitos para uma análise de variância, os resultados de defecação e de respostas de auto-limpeza foram submetidos à transformação de raiz quadrada. Os efeitos dos agentes anticonvulsivantes sobre a porcentagem de convulsões induzidas pelo EB de *Bunodosoma caissarum* foi avaliada através do teste exato de Fischer. Foi considerado estatisticamente significativo o nível de significância de $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Testes Comportamentais

5.1.1 Observação de convulsões induzidas pelo EB via icv.

O EB injetado via icv em camundongos nas doses 0,5; 1; 1,5; 2,5; 3 e 5 μg proteína/sítio causou convulsões, cujos sintomas foram agrupados em estágios (grau) conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Escala de manifestações convulsivas causadas pela administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum*

Grau	Manifestação
1	Sonolência e/ou hiperatividade e/ou “body rolling”
2	Pulos, tremores e ataxia
3	Movimentos mioclônicos sem perda do reflexo de endireitamento
4	Movimentos mioclônicos com perda do reflexo de endireitamento
5	Convulsão tônica seguida de morte

As manifestações convulsivas em animais com grau ≥ 2 frequentemente eram acompanhadas de hipersecreção salivar, hiperpnéia e piloereção. O efeito de concentrações crescentes do EB sobre a porcentagem de camundongos que desenvolveram convulsões é mostrado na figura 1 A. A partir da concentração de 1,5 μg proteína do EB/sítio, 100% dos animais apresentaram manifestações convulsivas. O grau das convulsões foi evoluindo à medida em que se aumentava a concentração do EB, sendo que a partir da dose 1,5 μg proteína/sítio ($4,1 \pm 0,26$), essa evolução atingiu os níveis máximos como mostra a Figura 1B.

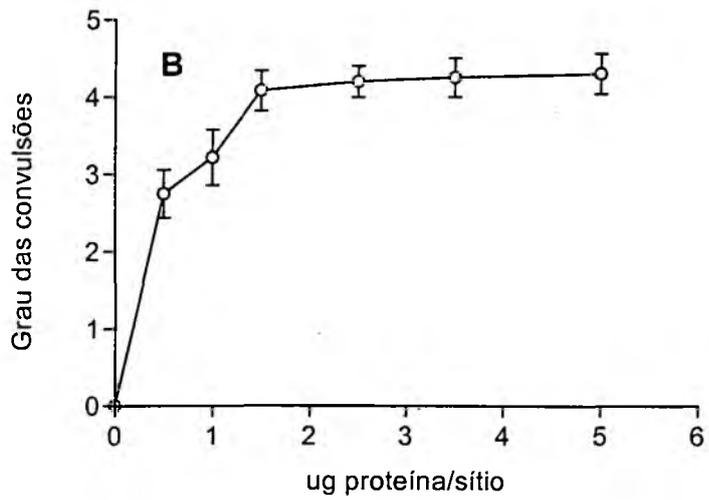
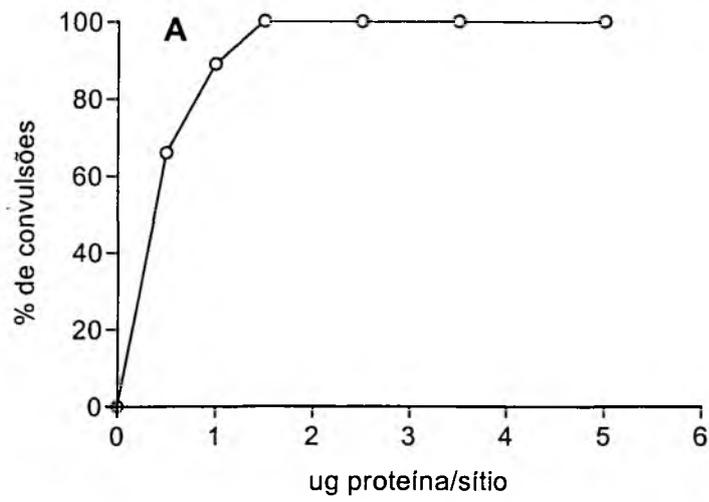


Figura 1- Porcentagem (A) e grau (B) de convulsões produzidas pela administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum*. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. (n= 10 a 15).

A latência para o início das convulsões (Figura 2), foi maior na dose 0,5 μg de proteína em relação as demais doses (1 a 5 μg de proteína) ($P < 0,05$).

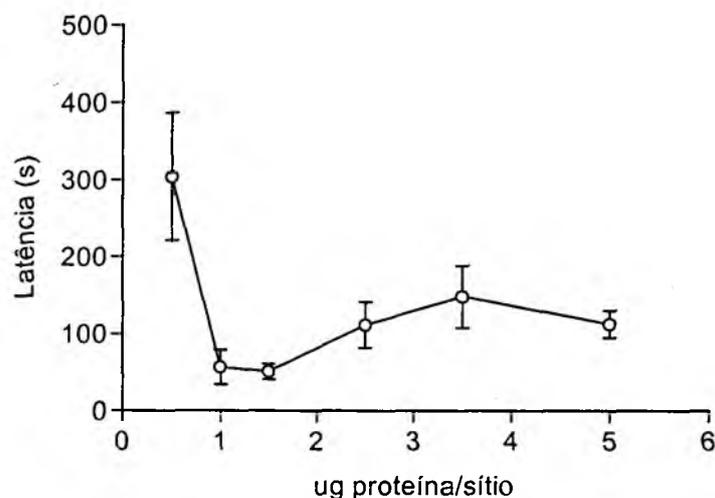


Figura 2 - Latência para o início das convulsões produzidas pela administração do EB de *Bunodosoma caissarum*. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. (n= 9 a 15).

Com o objetivo de investigar se as manifestações convulsivas do EB contavam com a participação de citolisinas, testou-se uma fração citolítica (Bc2), do veneno da *Bunodosoma caissarum* obtida pelo processo de "milking", por via icv também em camundongos. Nenhum efeito no estado geral dos animais foi observado com a dose 0,5 μg de proteína/sítio (n=7). Entretanto, na dose 1,5 μg de proteína/sítio algumas manifestações foram observadas, tais como "body rolling" e hiperatividade em 57% dos animais (n=7). Com 3 μg proteína/sítio além de "body rolling", o comportamento dos animais foi agravado com o aparecimento de ataxia, movimentos circulares e movimentos mioclônicos das patas anteriores em 78% dos animais (n=9).

5.2 Efeito do pré-tratamento ou co-administração de agentes anticonvulsivantes sobre as convulsões induzidas pelo EB (Grau 4).

5.2.1 Antagonistas não-competitivo do receptor NMDA

O tratamento com MK-801 nas doses 17, 34 e 68 nmol/sítio não foi eficaz na prevenção das convulsões induzidas pelo EB (1,5 µg proteína/sítio). A latência para o aparecimento de sinais convulsivos das doses 17 e 34 nmol/sítio não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle, só ocorrendo na dose de 68 nmol/sítio ($P < 0,001$), como mostra a Figura 3A. A Figura 3B, mostra que o tratamento com MK-801 não alterou também o grau das manifestações convulsivas. Doses acima de 68 nmol/sítio, não foram utilizadas, devido ao aparecimento de uma complexa síndrome motora, consistindo de ataxia, “body rolling” e movimentos laterais com a cabeça, podendo assim vir a comprometer a avaliação dos resultados.

A eficácia anticonvulsivante da cetamina também foi avaliada contra as convulsões induzidas pelo EB. Três doses foram usadas: 50; 75 e 100 mg/Kg. Todos os grupos tratados com a droga apresentaram uma latência maior para o aparecimento das convulsões em relação ao grupo controle, ($P < 0,01$) (Figura 4A). Nenhuma das doses foi efetiva contra as manifestações convulsivas, nem sequer amenizando os sintomas, (Figura 4B). De forma semelhante ao MK-801, cetamina em doses superiores a 100 mg/Kg, ip, produz efeitos colaterais que se confundem com algumas manifestações convulsivas do EB e portanto, caso fossem usadas, impediriam também uma avaliação mais eficiente da eficácia anticonvulsivante deste agente.

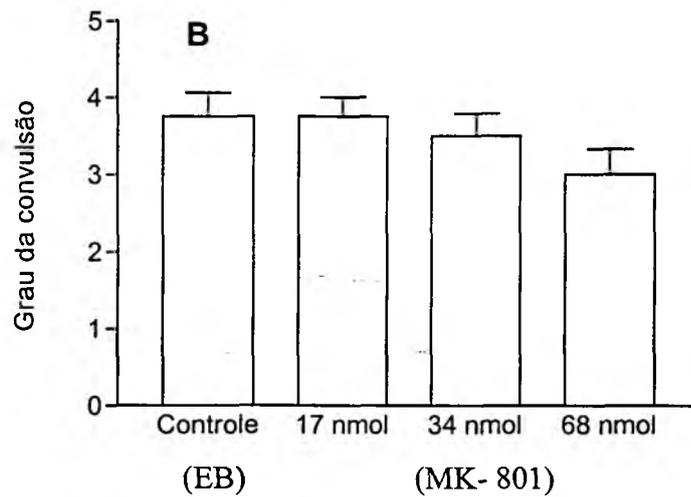
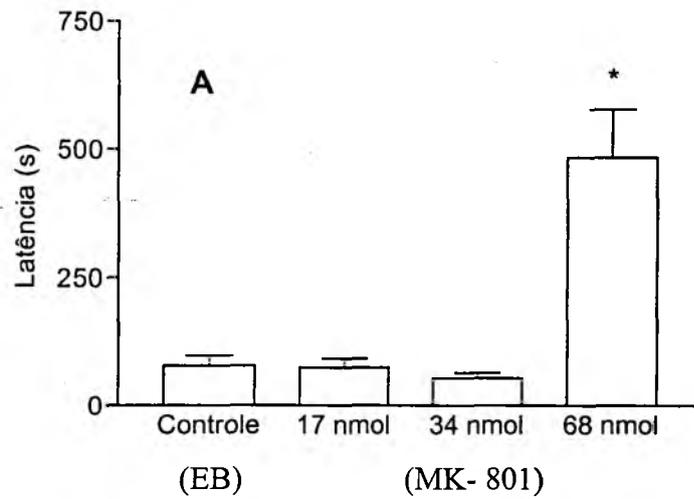


Figura 3 - Efeito do pré-tratamento com MK-801 injetado icv 10 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 µg proteína/sítio) sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B) induzidas pelo EB. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 4 a 8). * indica $P < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste de Duncan.

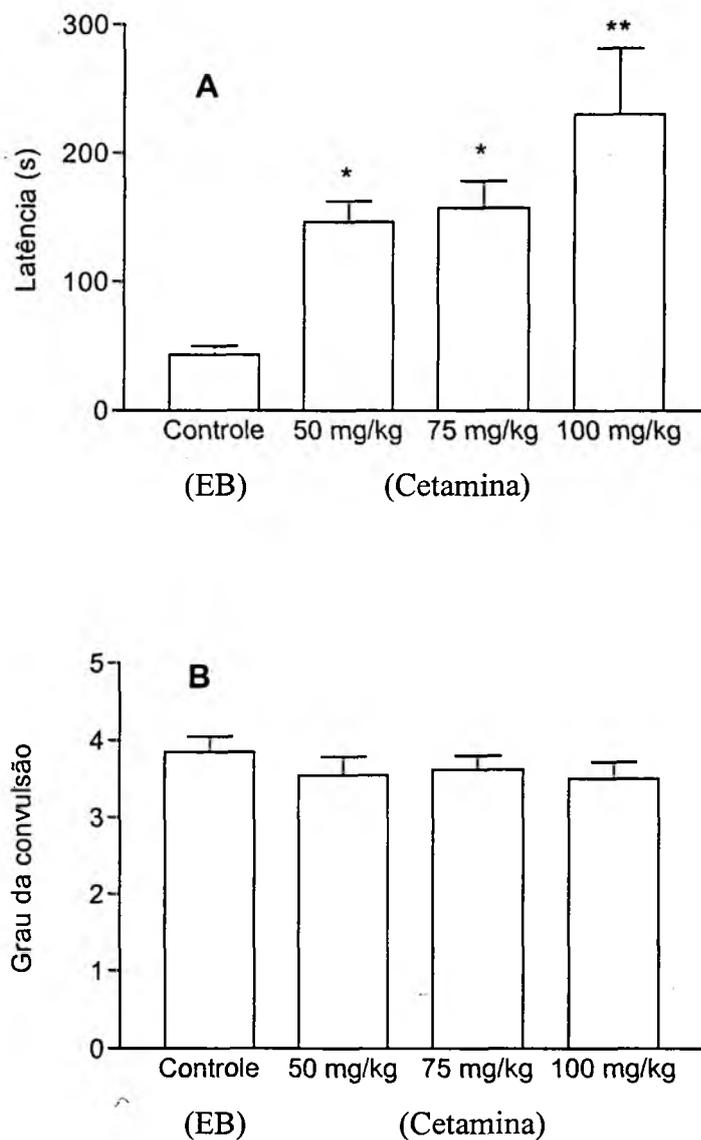


Figura 4 - Efeito do pré-tratamento com cetamina injetada ip 10 min antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 µg proteína/sítio) sobre a latência para o início das convulsões (**A**) e sobre o grau das convulsões (**B**). Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8 a 13). P < 0,01 em relação ao grupo controle, pelo teste de Duncan.

5.2.2 Antagonista competitivo do receptor NMDA

O antagonista competitivo AP-5 (2-amino-5-fosfanoverato) foi co-administrado com o EB por via icv, devido a sua limitada penetração no sistema nervoso central (Kleinrok et al., 1995), nas doses 0,25; 1 e 2 $\mu\text{g/sítio}$. Somente as doses 1 e 2 foram capazes de prevenir as convulsões em 68% e 50%, respectivamente (significativo para $P < 0,05$ - teste de Fischer). A Figura 5 mostra o efeito do AP-5 sobre o grau das convulsões nos animais que não tiveram proteção total.

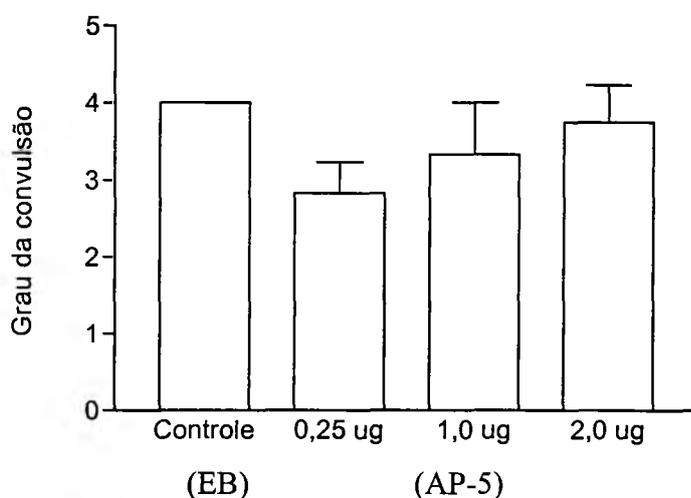


Figura 5 - Efeito da co-administração de AP-5 icv com EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 μg proteína/sítio) sobre o grau das convulsões. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n= 7 a 8).

5.2.3 Bloqueador de canal de cálcio

O pré-tratamento com o bloqueador de cálcio do tipo L, nifedipina, nas doses de 15; 30 e 45 mg/Kg, ip, não foi eficiente em prevenir o aparecimento das convulsões induzidas pelo EB. Entretanto, houve um aumento na latência para o aparecimentos dos sinais convulsivos em todos os grupos tratados ($P < 0,05$) (Figura 6A) e nas doses 30 e 45

mg/Kg, ip, observou-se uma significativa redução no grau convulsivo comparado com o grupo controle ($P < 0,01$) (Figura 6B).

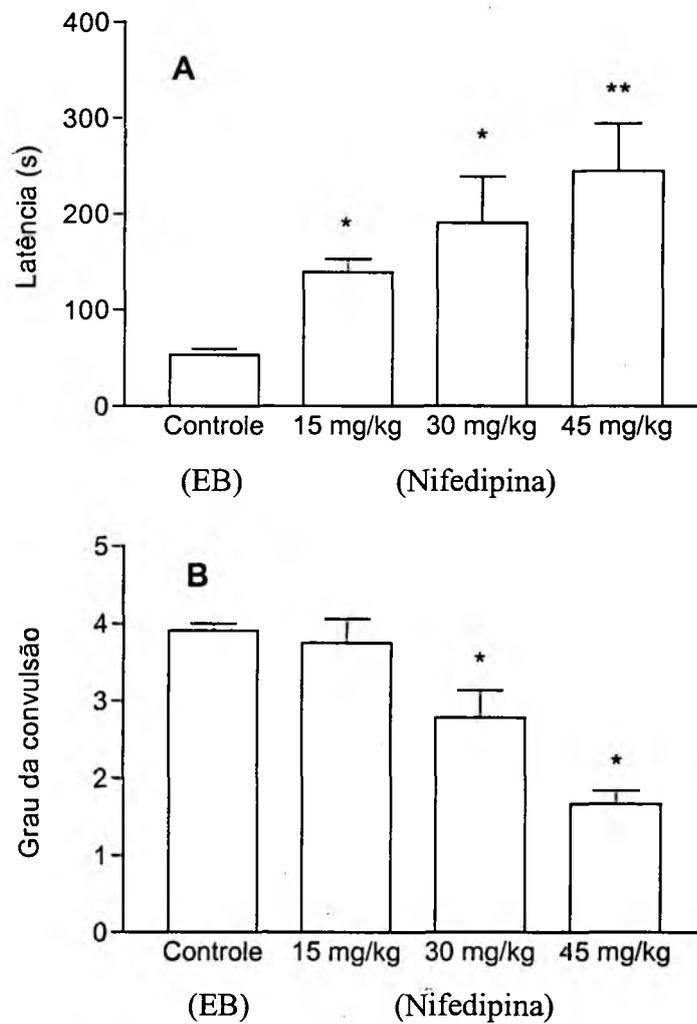


Figura 6 - Efeito do pré-tratamento com nifedipina injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 μ g proteína/sítio) sobre a latência para o início das convulsões (A) e sobre o grau das convulsões (B). Os resultados estão expressos como média + e.p.m. ($n = 6$ a 11). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle, pelo teste de Duncan.

5.2.4 Anticonvulsivantes que agem sobre canais de sódio

A pré-administração de fenitoína na dose de 150 mg/Kg, ip, não preveniu as convulsões induzidas pelo EB. Não houve alteração significativa na latência (Figura 7) e nem no grau (grau $4,0 \pm 0$ em ambos os grupos) das manifestações convulsivas.

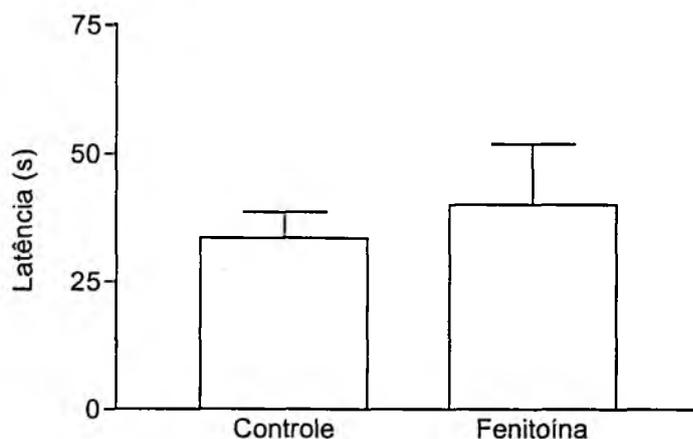


Figura 7 - Efeito do pré-tratamento com fenitoína (150 mg/Kg, ip) injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 μ g proteína/sítio) sobre a latência para o início das convulsões. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n=7 a 8).

Carbamazepina foi pré-administrada em duas doses: 270 e 540 mg/Kg. O pré-tratamento com as duas doses aumentou a latência para o aparecimento das convulsões, sendo que apenas a dose maior foi considerada significativa neste parâmetro pelo teste *post-hoc* ($P < 0,05$) (Figura 8A). Ambas as doses diminuíram significativamente o grau das manifestações convulsivas ($P < 0,01$) (Figura 8B).

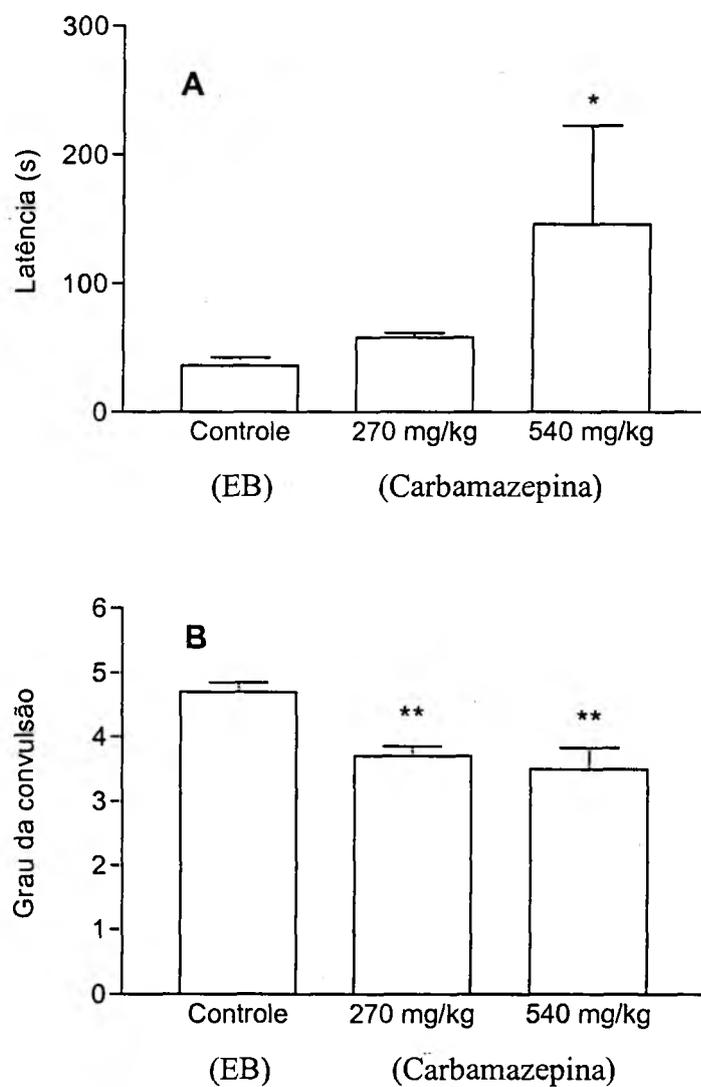


Figura 8 - Efeito do pré-tratamento com carbamazepina injetada ip 15 min. antes da administração icv do EB de *Bunodosoma caissarum* (1,5 µg proteína/sítio) sobre a latência para o início das convulsões (**A**) e sobre o grau das convulsões (**B**). Os resultados estão expressos como média + e.p.m (n=8 a 10). *P<0,05 e **P<0,01 em relação ao grupo controle, pelo teste de Duncan.

5.2.5 Antagonista de glutamato

A administração de riluzol nas doses 1 e 10 nmol, icv, preveniu o aparecimento de convulsões em 88,9 e 87,5 % dos animais tratados, respectivamente (significativo para $P < 0,01$ - teste de Fischer).

5.3 Tarefa do Campo Aberto com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum*.

Os resultados do número de respostas de levantar (“rearing”) e o número de cruzamentos registrados durante 6 min. em cada sessão são mostrados nas figuras 9 e 10, respectivamente. A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida do número de respostas de levantar no campo aberto (Fig. 9) demonstrou um efeito significativo da interação sessão X tratamento ($F(16,84) = 0,73$, $P < 0,05$). A análise *post-hoc* da interação pelo teste Duncan indicou que somente os animais controle tiveram memória de habituação, demonstrado pela redução significativa das respostas de levantar na última sessão em relação à primeira. Os animais tratados com EB nas doses 0,05, 0,10 e 0,25 $\mu\text{g/sítio}$ não apresentaram nenhuma alteração no número de respostas de levantar entre as sessões.

A análise de variância de duas vias considerando as sessões como medida repetida do número de respostas de cruzamento no campo aberto (Fig. 10) não demonstrou efeito do tratamento sobre este parâmetro. Também não houve um efeito significativo da interação sessão X tratamento. Entretanto, a análise estatística indicou um efeito significativo da sessão ($F(2,84) = 13,51$, $P < 0,001$) sobre as respostas de cruzamento. O teste *post-hoc* indicou que este efeito foi devido a redução do número de cruzamentos ao longo das sessões.

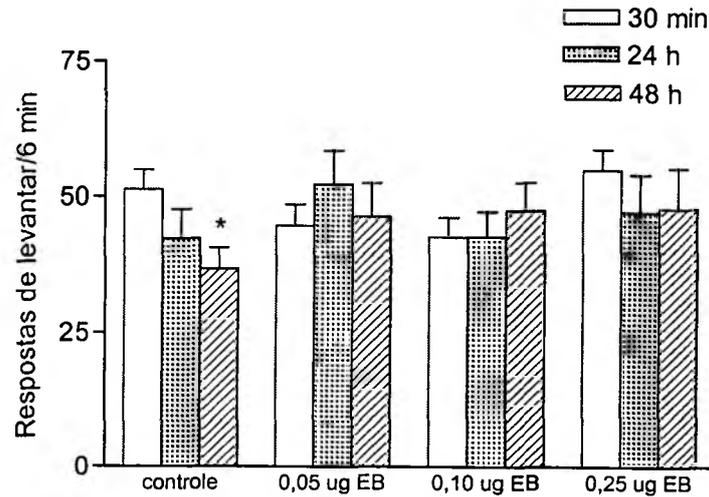


Figura 9 - Respostas de levantar ("rearings") no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv. (n= 10 a 14 animais por grupo). **P<0,01 em relação à primeira sessão do respectivo grupo pelo teste de Duncan.

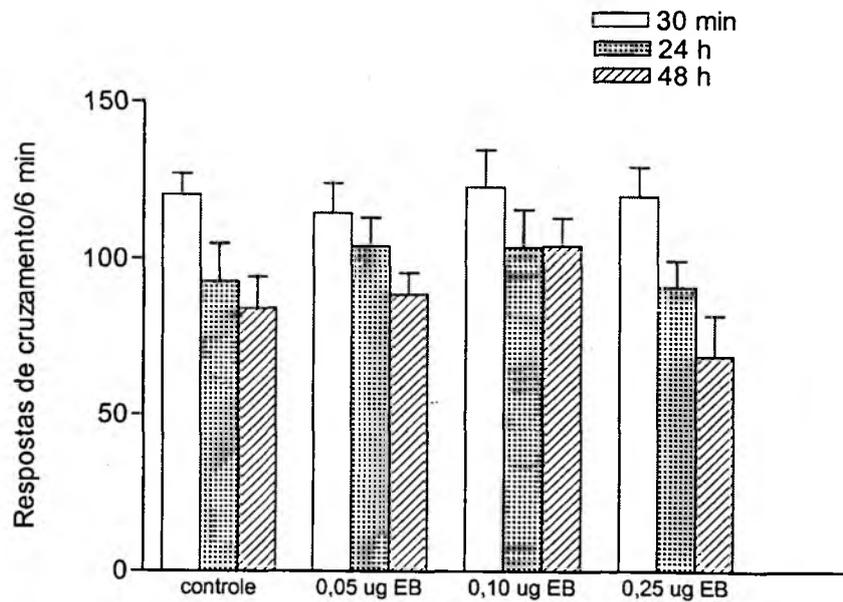


Figura 10 - Respostas de cruzamentos no campo aberto de camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv. (n = 10 a 14 animais por grupo)

Também foram avaliados neste ensaio, o efeito do EB sobre o número de bolos fecais (Figura 11), as respostas de auto-limpeza (Figura 12) e sobre a latência para sair do primeiro quadrado (Figura 13). Os resultados referentes a estes parâmetros foram convertidos à raiz quadrada de modo a tornar normal a distribuição dos resultados e as variâncias homogêneas. A análise de variância de duas vias, considerando as sessões como medida repetida do número de bolos fecais, indicou apenas um efeito significativo das sessões $F(2,58) = 12,71, P < 0,001$). Este resultado mostra que a defecação foi menor na primeira do que na segunda e terceira sessão. Não houve efeito significativo do tratamento nem da interação sessão X tratamento. Com relação à auto-limpeza, a análise de variância de duas vias, considerando a sessão como medida repetida do número de respostas, demonstrou que não houve efeito significativo do tratamento, sessão ou da interação sessão X tratamento. Para a latência, tempo que o animal leva para sair do primeiro quadrado, a análise de variância de duas vias indicou um efeito significativo apenas com relação às sessões ($F(2,58) = 4,25, P < 0,05$). Este resultado se deve ao fato de que a latência na terceira sessão foi menor do que na primeira sessão. Não houve efeito significativo do tratamento ou da interação sessão X tratamento. Os resultados destes três parâmetros (bolo fecal, auto-limpeza e latência para sair do primeiro quadrado) indicam que o tratamento com o EB em doses sub-convulsivantes não foi capaz de comprometer o estado emocional dos camundongos.

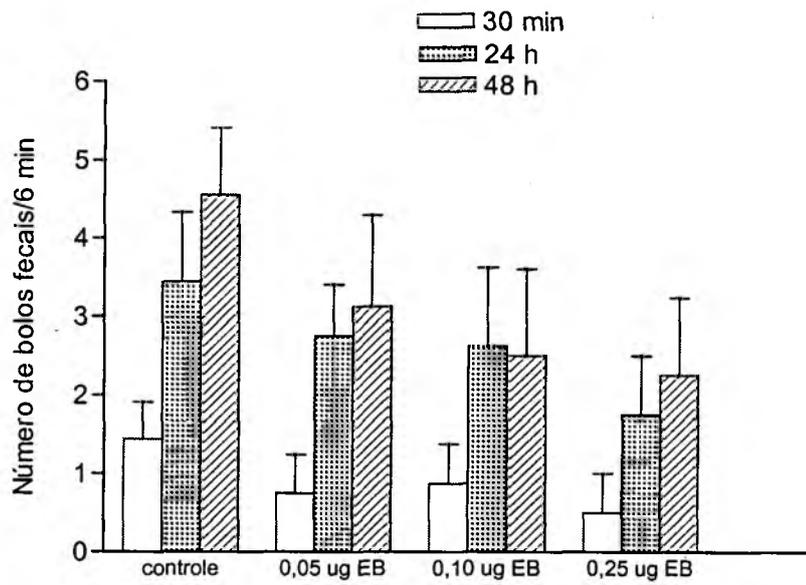


Figura 11 - Número de bolos fecais no campo aberto de camundongos tratados com doses subconvulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv (n = 8 a 9 animais por grupo)

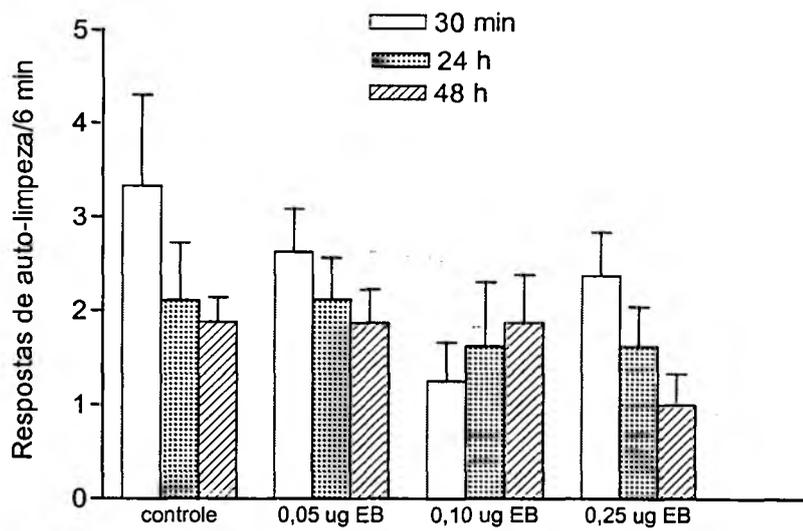


Figura 12 - Número de respostas de auto-limpeza no campo aberto de camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv. (n = 8 a 9 animais por grupo).

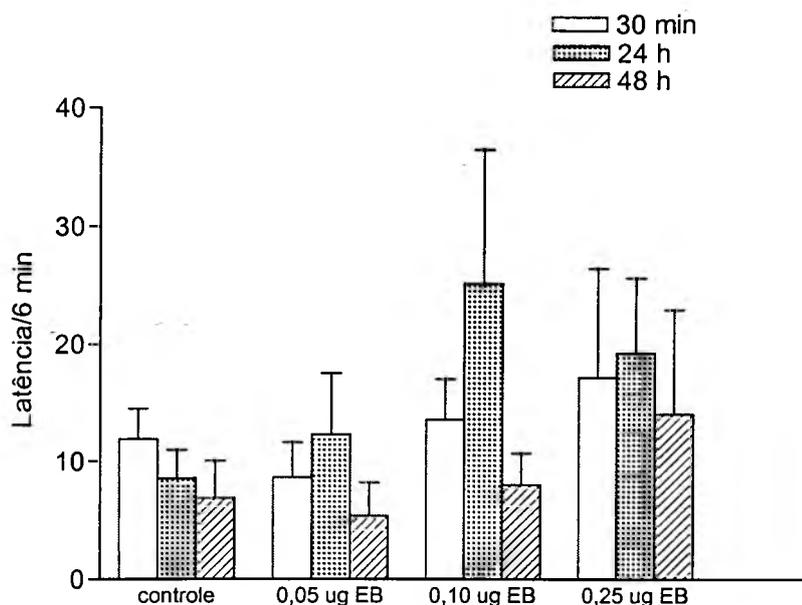


Figura 13 - Latência para sair do primeiro quadrado no campo aberto de camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv (n = 8 a 9 animais por grupo).

5.4 Tarefa do nado forçado com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum*.

Para a realização desta tarefa comportamental, os animais foram tratados com as doses 0,05, 0,10 e 0,25 μg proteína/sítio do EB. Como controles positivos foram utilizadas duas doses do antidepressivo imipramina: 15 e 30 mg/kg e como controles negativos os animais receberam injeção de salina no mesmo volume. Os resultados mostram um efeito significativo da injeção do EB sobre a imobilidade. O EB reduziu a imobilidade no teste do nado forçado quando comparado ao grupo controle (salina) em todas as doses testadas ($P < 0,05$) (Fig. 14). A redução da imobilidade provocada pelo EB não foi dose-dependente, pois não houve diferença significativa entre as doses utilizadas.

Também não houve diferença significativa entre o EB e imipramina. É importante ressaltar que as doses do EB que produziram diminuição na imobilidade do nado forçado não alteraram a atividade locomotora no teste do campo aberto como mostra a Tabela 2. Desta forma, a diminuição da imobilidade provocada pelo EB não pode ser atribuída a uma alteração na atividade locomotora. Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação pelo qual o EB reduziu o tempo da imobilidade na tarefa do nado forçado, decidimos verificar se este efeito seria devido a uma interação do EB com receptores glutamatérgicos do sub-tipo NMDA. Para esta finalidade então, realizamos um experimento comparativo, no qual utilizamos o antagonista não-competitivo do receptor NMDA, MK-801. Foram testados os efeitos do MK-801 (MK-801, 0,01mg/kg, ip + salina, icv) e do EB (salina ip + EB, 0,25 µg proteína/sítio, icv), bem como o efeito da associação MK-801 e EB (MK-801 0,01 mg/kg, ip + EB, 0,25 µg proteína/sítio, icv). O intervalo entre as injeções ip e icv foi de 15 minutos. O grupo controle recebeu duas injeções de salina (salina ip + salina icv) (Figura 15). A análise de variância mostra que houve uma redução significativa na imobilidade em cada um dos grupos tratados: EB, MK-801 e MK-801 + EB em relação ao grupo controle, tratado com salina, embora não haja diferença nas médias da imobilidade entre os três primeiros grupos. Este resultado nos sugere que o EB exerce seu efeito interagindo com receptores do sub-tipo NMDA, provavelmente competindo com o MK-801 pelo mesmo sítio de ação. Nesta segunda etapa, também a atividade locomotora dos grupos tratados foram avaliados. A tabela 2 mostra que os grupos tratados com EB, MK-801 e MK-801 + EB não apresentaram diferenças na ambulação no campo aberto quando comparados ao grupos controle, vindo descartar um possível efeito locomotor sobre a tarefa do nado forçado.

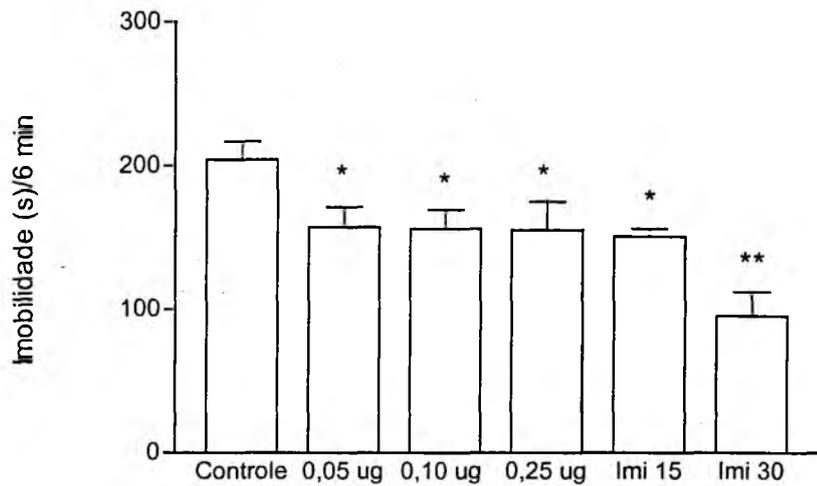


Figura 14 - Imobildade na tarefa de nado forçado de camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum* por via icv (n = 7 a 10 animais por grupo). Os resultados estão expressos como média + e.p.m. *P<0,05 e **P<0,01 em relação ao controle pelo teste de Duncan.

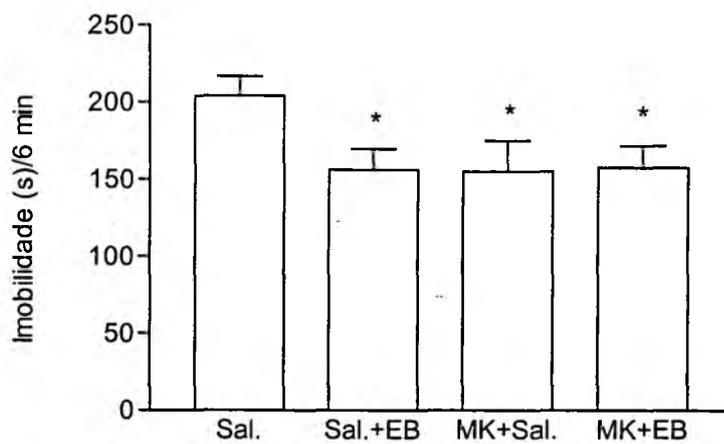


Figura 15 - Imobildade na tarefa do nado forçado de camundongos tratados com EB de *Bunodosoma caissarum* (0,25 µg proteína/sítio, icv) e/ou com MK-801 (0,01 mg/kg, ip). (n = 7 a 10 animais por grupo). Os resultados estão expressos como média + e.p.m. *P<0,05 em relação ao grupo controle pelo teste de Duncan.

Tabela 2. Efeito do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a atividade locomotora no campo aberto (sessão única de 6 min.)

Grupo	N	Média ± e.p.m. (*)
Salina + Salina	8	110,4 ± 11,8
Salina + EB	8	96,1 ± 18,4
MK-801 + Salina	8	95,4 ± 10,1
MK-801 + EB	7	72,4 ± 23,3

Não houve diferença significativa entre os grupos pela ANOVA de uma via.

* número de cruzamentos

5.5 Tarefa de alternância espontânea com camundongos tratados com doses sub-convulsivantes do EB de *Bunodosoma caissarum*.

Para a realização desta tarefa comportamental, os animais foram tratados com EB nas doses 0,05, 0,10 e 0,25 µg proteína/sítio. A tabela 3 mostra os resultados do número de prova alternada e da latência total para alternância (s). Embora os resultados da prova alternada tenham sido expressos em valores absolutos não transformados (Tabela 3), os dados referentes a esta resposta foram transformados em raiz quadrada para a realização da análise estatística, pois eles não apresentaram uma distribuição normal. Houve um efeito significativo do tratamento no número da prova alternada ($P < 0,05$). Quanto à latência, não foram observadas diferenças significativas do tratamento para alternância do braço do labirinto.

Tabela 3. Efeito do EB de *Bunodosoma caissarum* na alternância espontânea em labirinto em T

Grupo	Prova alternada	Latência (s)
Controle	2,0 ± 0,0	47,7 ± 9,3
0,05 µg/sítio	2,0 ± 0,1	64,2 ± 10,3
0,10 µg/sítio	2,3 ± 0,2	50,7 ± 9,7
0,25 µg/sítio	2,6 ± 0,2*	77,2 ± 21,1

Os resultados estão expressos como média ± e.p.m.; n = 9 a 10 animais por grupo

* P < 0,05 em relação ao controle por ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan.

5.6 Camundongos tratados com EB de *Bunodosoma caissarum* por via intraperitoneal (ip)

5.6.1. Observação de convulsões induzidas pelo EB via intraperitoneal (ip).

A injeção intraperitoneal do EB nas doses de 25 e 50 mg proteína/kg (n=18) causou comportamento convulsivo, cujas manifestações foram categorizadas conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Escala de manifestações convulsivas causada pela administração ip do EB de *Bunodosoma caissarum*

Grau	Manifestação
1	Tremores
2	Movimentos gustatórios e de coçar
3	Balançar a cabeça e andar para trás
4	Movimentos mioclônicos
5	Abalos do corpo todo

As primeiras manifestações citadas na tabela 4 foram observados a partir de 5 minutos após a administração de EB por via ip. Além destas manifestações, os animais apresentaram perda do tônus muscular. Desta forma os animais foram submetidos à uma sessão do campo aberto para avaliação da atividade locomotora. Camundongos injetados por via ip em doses menores (0,1; 1 e 3 mg proteína/kg) não apresentaram nenhuma alteração visível de seu estado geral (dados não mostrados). De modo semelhante, o grupo tratado com a dose 10 mg proteína/kg não apresentou nenhuma alteração convulsiva visível.

O gráfico da Figura 16 mostra o grau das manifestações convulsivas em animais tratados com EB via ip. Nos grupos tratados com 25 e 50 mg proteína/kg as convulsões evoluíram para a morte. É interessante ressaltar que o perfil das manifestações convulsivas apresentados pelos animais tratados com EB por via ip diferiu daquele apresentado pelos animais tratados por via icv.

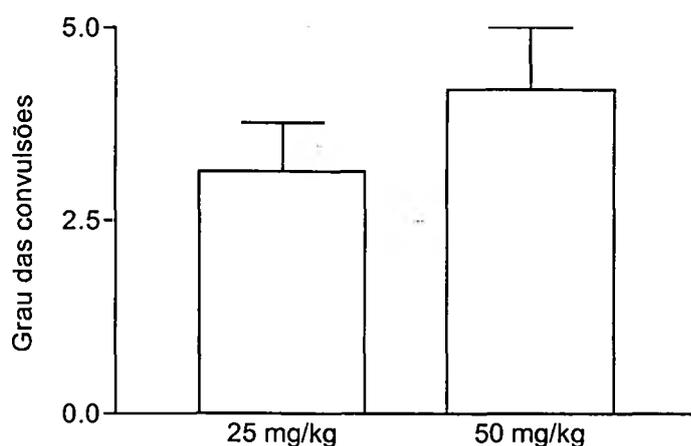


Figura 16 - Grau de convulsões produzida pela administração ip do EB de *Bunodosoma caissarum*. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (= 5 a 8).

5.6.2. Avaliação da atividade locomotora no campo aberto pelo tratamento do EB por via ip.

Camundongos tratados com doses de 10, 25 e 50 mg proteína/sítio por via ip. foram imediatamente (30s) submetidos a uma sessão de 10 minutos no campo aberto para avaliação da atividade locomotora. As respostas de cruzamento nos primeiros 2 minutos e no tempo total de 10 minutos foram registradas e comparadas ao grupo controle. Os resultados da ANOVA mostraram que houve efeito significativo do tratamento tanto no tempo de 2 minutos quanto no tempo 10 minutos (Fig. 17A e 17B respectivamente). O teste *post-hoc* demonstrou que todos os grupos apresentaram uma ambulação inferior comparado ao controle ($P < 0,01$), mas não diferiram entre si nos tempos de 2 e 10 minutos.

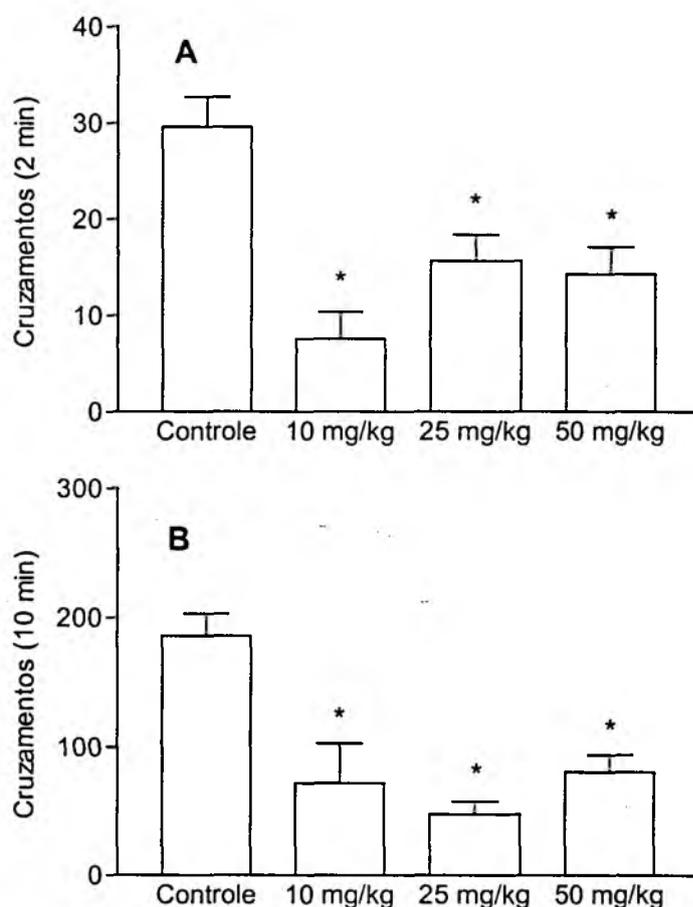


Figura 17 - Respostas de cruzamentos durante 2 min.(A) e 10 min. (B) no campo aberto em camundongos tratados ip com o EB de *Bunodosoma caissarum*. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 6 a 8) * indica $P < 0,01$ em relação do grupo controle pelo teste de Duncan

5.7 Teste neuroquímico

5.7.1. Ensaio da união específica ("binding") de [³H]glutamato

Com o objetivo de verificar se o EB de *Bunodosoma caissarum* exerce sua ação a nível central interagindo com receptores glutamatérgicos, concentrações crescentes do EB foram testadas sobre a união específica de [³H]glutamato (independente de sódio) em preparações de membrana de córtex cerebral de camundongos. A Fig. 18 mostra uma curva dose-resposta do EB, na qual houve redução da união específica do [³H]glutamato de forma dose-dependente, com concentrações relativamente baixas do EB (efeito máximo em torno de 80% de inibição da união específica de glutamato a partir de 10 µg proteína/ml do meio de incubação). Houve um efeito significativo do EB no sentido de inibir a união específica de glutamato nas concentrações de 1 a 20 µg proteína do EB/ml do meio de incubação. Resultado semelhante foi obtido com o EB submetido a um pré-tratamento à 100°C por 30 minutos (Figura 19).

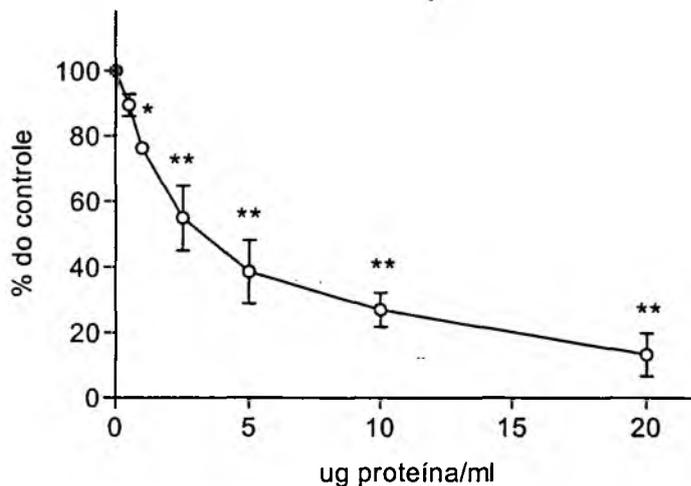


Figura 18 - Efeito de concentrações crescentes do EB de *Bunodosoma caissarum* sobre a união específica ("binding") de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos como média dos valores em porcentagem em relação ao controle \pm e.p.m.
* indica $P < 0,05$ e ** indica $P < 0,01$ em relação ao controle pelo teste de Duncan. (n = 3 experimentos independentes, cada um em triplicata).

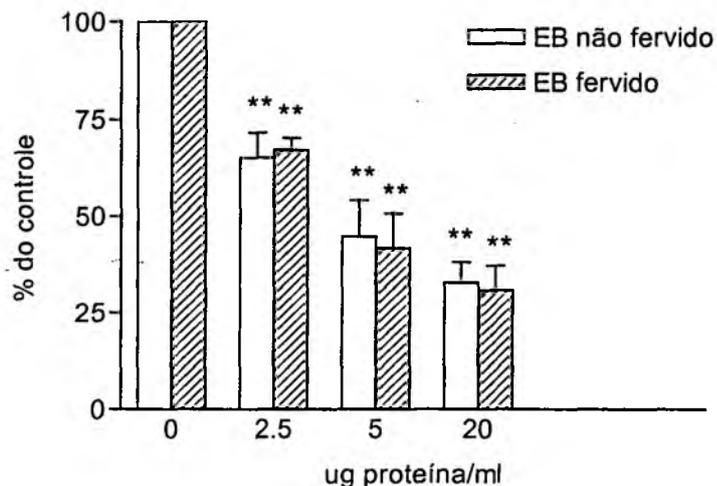


Figura 19 - Efeito de concentrações crescentes do EB de *Bunodosoma caissarum* não fervido ou fervido por 30 minutos sobre a união específica ("binding") de [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m.. ** indica P<0,01 em relação ao controle pelo teste de Duncan (n = 3 experimentos independentes realizados em triplicata).

5.8 Ensaio de termolabilidade, proteólise e tratamento com esfingomielina do EB

Após ter sido submetido a uma temperatura de 100°C por 30 minutos, o extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* (EB) (1,5 µg proteína/sítio, icv) ainda manteve suas propriedades convulsivantes, apresentando um resultado significativamente diferente ao do grupo salina (P<0,01 - Teste de Fischer). Resultado semelhante foi obtido após a incubação com esfingomielina (500 µg/ml). Entretanto o EB não foi resistente ao tratamento com tripsina (30µg/ml), o qual inativou sua ação convulsivante. Portanto o grupo tratado com o EB sob proteólise apresentou resultado significativamente diferente do grupo tratado apenas com o EB (P<0,01 - Teste de Fischer) (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de convulsões induzidas pelo EB após tratamento térmico, com esfingomielina e com tripsina (proteólise)

Tratamento	% Convulsão
Controle (Salina)	0 (10)
EB	100 (10)
EB + 100 °C	100 (10)
EB + Esfingomielina	100 (4)
EB + Tripsina	0 (9)

() = número de animais tratados

EB = 1,5 µg proteína/sítio

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho fez uma avaliação do extrato bruto (EB) de *Bunodosoma caissarum* sobre o sistema nervoso central de camundongos, através de estudos comportamentais e neuroquímicos, dando ênfase ao sistema glutamatérgico. A anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* é encontrada no litoral brasileiro, presa principalmente em rochas. Esta anêmona exibe em seu veneno substâncias neurotóxicas e hemolíticas (Malpezzi & Freitas, 1991; Gabilan, 1992). A atividade hemolítica do veneno desta anêmona encontra-se relativamente bem caracterizada, sendo atribuída à presença de citolisinas (polipeptídeos de peso molecular na faixa de 16 a 20 KDa) (Malpezzi & Freitas, 1991).

Três peptídeos neurotóxicos do veneno da *Bunodosoma caissarum* foram caracterizados e sequenciados (BcI, II e III) por Malpezzi et al., (1993). Entretanto, estudos descrevendo os efeitos destes peptídeos sobre o SNC, *in vivo* através de injeção icv em animais experimentais, não se encontram à disposição na literatura. Um peptídeo neurotóxico (GRX) recentemente isolado da anêmona *Bunodosoma granulifera*, tendo inclusive homologia estrutural com peptídeos da anêmona *Bunodosoma caissarum*, demonstrou ação central em camundongos quando injetado por via ip, provocando hiperatividade, comportamentos agressivos, dispnéia e aumento da sensibilidade ao toque e ao som (Santana et al., 1998). Em nosso estudo, detectamos uma acentuada ação convulsivante do EB em camundongos. Esta ação é rapidamente observada quando o EB é administrado por via icv, mas também ocorre após administração ip. Nossos resultados em conjunto conduzem à idéia de que esta ação convulsivante seja devido à presença de toxinas neurotóxicas do EB, e que possivelmente o sistema glutamatérgico esteja envolvido na sua gênese e propagação através de uma excessiva estimulação de seus receptores.

O efeito convulsivante do EB parece não envolver toxinas citolíticas. Duas razões contribuem para esta idéia. A primeira é que as citolisinas do veneno da anêmona *Bunodosoma caissarum* perdem sua atividade hemolítica quando submetidas à 90°C por 20 s (Malpezzi & Freitas, 1991). Citolisinas do veneno da anêmona *Pseudactia varia*

(variolisina) também perdem sua atividade hemolítica após aquecimento (Bernheimer et al., 1984). O EB da anêmona *Bunodosoma caissarum* foi submetido à temperatura de 100°C durante 30 minutos. Entretanto, O EB continuou produzindo as convulsões, mantendo inclusive o mesmo padrão do EB não submetido à fervura. Segunda, a pré-incubação do EB com esfingomielina (500 µg/ml), um fosfolípídeo comumente encontrado na membrana plasmática de várias células (Macek, 1992), também não foi capaz de suprimir as convulsões. Citolisinas de várias espécies de anêmonas do mar são inibidas por esfingomielina (Bernheimer et al., 1984; Sentic & Macek, 1990; Galettis & Norton, 1990). A atividade hemolítica das citolisinas da *Bunodosoma caissarum* foi também inibida por esfingomielina quando testada sobre eritrócitos de camundongos (Malpezzi & Freitas, 1991). A administração icv de uma fração citolítica parcialmente purificada do veneno de *Bunodosoma caissarum* (Bc2), sensível à temperatura e ao tratamento com esfingomielina, em um ensaio piloto, mostrou um fraco efeito convulsivante. Contudo este efeito não justificaria que a mesma estivesse contribuindo de forma significativa para as manifestações convulsivas produzidas pelo EB. Este resultado também reforça a idéia de que uma ou mais neurotoxinas sejam os componentes convulsivantes presentes no EB.

A fim de eliminar suspeitas à respeito da natureza protéica do(s) componente(s) responsável(eis) pela ação convulsivante do EB, foi realizada uma proteólise com tripsina de acordo com Monks et al. (1994). A confirmação veio com o resultado da total abolição da ação convulsivante do EB após o processo de digestão com tripsina. A possível ação da tripsina foi eliminada por fervura, pois tinha sido previamente demonstrado que este procedimento não afetava a ação convulsivante do EB.

Convulsões também foram observadas após a administração intraperitoneal do EB em camundongos, diferentes da via icv, mas com um perfil semelhante às convulsões produzida pela pilocarpina, agonista muscarínico (Starr & Starr, 1994), o que pode indicar um possível envolvimento do sistema colinérgico na sua ação convulsivante. Outra diferença observada entre as injeções ip e icv do EB de *Bunodossoma caissarum* foi com relação à atividade locomotora no campo aberto. Os animais injetados por via ip apresentaram um comprometimento motor com perda do tônus muscular, sugestivo da

ação do veneno a nível de junção neuromuscular. Tal aspecto não foi investigado neste trabalho, porém seria interessante conduzir estudos futuros neste sentido.

A diferença de perfis observada entre as administrações ip e icv nos leva a sugerir a participação de diferentes componentes do veneno na ação convulsivante do EB. Algum ou alguns dos componentes que contribuem para produzir o perfil convulsivo icv pode ou podem ter dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica e esta poderia ser a razão pelas diferenças ocorridas entre as administrações. Até o presente, pouco é conhecido a respeito da habilidade de alguns polipeptídeos, principalmente de venenos em atravessar a barreira hematoencefálica e afetar o sistema nervoso central (Silveira et al, 1988). Este perfil convulsivo parece estar associado apenas à presença de componentes de baixo peso molecular. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade do próprio EB afetar a permeabilidade da referida barreira e facilitar a passagem de alguns de seus componentes de maior peso molecular, visto que em recente trabalho (Muniz, 1998) uma fração citolítica do EB de *Bunodosoma caissarum* demonstrou capacidade de alterar a permeabilidade vascular em vários tecidos de ratos.

Com a finalidade de esclarecer o mecanismo de ação através do qual o EB produzia ataques convulsivos, antagonistas não competitivos do receptor de NMDA, cetamina e MK-801, e o antagonista competitivo AP5 (2-amino-5-fosfonovalerato) foram utilizados. O antagonista não competitivo MK-801 tem um amplo espectro de atividades farmacológicas incluindo ação anticonvulsivante, ansiolítica, neuroprotetora e propriedades motoras (Clineschmidt et al., 1982a,b,c). Entretanto, os efeitos protetores do MK-801 estão associados a altas doses, os quais podem vir acompanhados de uma complexa síndrome comportamental que inclui movimentos laterais com a cabeça, hiperlocomoção, queda e ataxia. Sintomas semelhantes podem ser observados após administração sistêmica de cetamina (Hiramatsu et al., 1989). Convulsões induzida por N-metil-DL-ácido aspártico (NMDLA) foram bloqueados por MK-801 e cetamina, sendo para esta última necessário uma dose extremamente maior (Tricklebank et al., 1989). Em nossos ensaios, MK-801 e cetamina que compartilham um mesmo sítio no interior do

canal iônico NMDA, apenas prolongaram o tempo para o aparecimento dos sinais convulsivos, sem entretanto prevenir as convulsões ou sequer atenuá-las. Por outro lado, o AP-5, antagonista competitivo de NMDA, foi capaz de prevenir as convulsões em alguns animais, mas não alterou a latência ou o grau convulsivo quando esta se manifestou. Convulsões induzidas por NMDA são também inibidas por AP-5 (De Deyn et al., 1992). Embora os resultados com os antagonistas de NMDA não tenham sido suficientes para suprimir totalmente as convulsões, eles nos indicam que o efeito convulsivante do EB se deve ao menos em parte a uma interação com receptores NMDA. Entretanto, de que forma essa interação ocorre ainda necessita ser melhor esclarecida.

Os resultados obtidos com fenitoína e carbamazepina, bloqueadores de canal de sódio, sugerem que a ação em canais de sódio não parece ser um mecanismo de ação primária do EB. A carbamazepina parece exercer efeito apenas em doses altas, o que pode ser um efeito inespecífico. A fenitoína não exerceu qualquer efeito protetor sobre as convulsões induzidas pelo EB na dose de 150 mg/kg, ip. Fenitoína parece interagir também com canais de cálcio em membranas cerebrais (Greenberg et al., 1984), reduzindo sua recaptção (Pincus & Hsiao, 1981) e inibindo a liberação de neurotransmissores e hormônios (Woodbury, 1980). Em convulsões induzidas por NMDA, quisqualato e cainato tanto a fenitoína como a carbamazepina e outras drogas antiepilépticas não protegeram os animais (Turski et al, 1990). Nas convulsões induzidas por BAY k 8644 (agonista de canal de cálcio) em camundongos, carbamazepina não teve efeito e fenitoína além de não proteger os animais, aumentou a intensidade e a duração dos ataques (Shelton et al., 1987). Em convulsões induzidas por pentilenotetrazol e bicuculina tanto carbamazepina como fenitoína foram inefetivos (De Deyn et al., 1992). Entretanto fenitoína preveniu convulsões induzidas por dendrotoxina (proteína isolada do veneno de cobra (*Dendroaspis angusticeps*) em camundongos (Harvey, 1997). Desta forma, a interferência indireta dos canais de sódio no influxo de cálcio, que poderia estar contribuindo para a ação convulsivante do EB, parece improvável, visto que os antagonistas de canais de sódio não foram muito eficientes na reversão do processo convulsivo.

Alterações na homeostase do cálcio citosólico pode acarretar em mudanças irreversíveis na fisiologia e morfologia das células (Choi, 1988). A formação de poros permeáveis ao cálcio é relatada por Zorec et al. (1990), como sendo o mecanismo de ação da equinatoxina II da anêmona *Actinia equina*. Após dois minutos de exposição um inchamento (“swelling”) era observado sem entretanto promover nenhuma alteração na morfologia. No sistema nervoso central um aumento na concentração do cálcio livre citosólico pode resultar em um imediato ou um lento dano cerebral (Godfraind & Govoni, 1995). A ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem é uma das principais vias através da qual o cálcio intracelular pode aumentar (Harman & Maxwell, 1995; Mody & MacDonald, 1995). Além disto, o influxo de cálcio através da ativação de receptores NMDA ou ativação de canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem produzem ataques em animais experimentais (Czuczwar et al., 1985). Assim sendo, bloqueadores de canal de cálcio, tais como nifedipina (bloqueador de canal de cálcio do tipo L) que foi utilizado no presente estudo, podem exercer efeitos neuroprotetores, da mesma forma que antagonistas de receptores de NMDA (Small & Buchan, 1997). Neste sentido, o grau de proteção obtido com nifedipina em nossos estudos, sugere a participação do cálcio sobre as convulsões induzidas pelo EB da anêmona *Bunodosoma caissarum*. É possível que a ação convulsivante do EB se manifeste por ação de mais de um de seus componentes, agindo sinergicamente sobre sítios distintos na membrana, como por exemplo canais de cálcio e receptores de glutamato ao mesmo tempo. Isto explicaria porque nifedipina não foi tão eficiente em inibir as convulsões. Contudo, mais estudos são necessários para melhor esclarecer esta parceria.

Devido à semelhança das manifestações convulsivas do EB com a dos amino ácidos excitatórios, optou-se também pelo uso do riluzol. Riluzol (RP 54274) é um composto com estrutura benzodiazepínica que possui propriedades anticonvulsivantes provavelmente por bloqueio da transmissão glutamatérgica (Stutzmann et al., 1991; Doble, 1996). As propriedades antiglutamatérgicas do riluzol parecem ser mediadas por quatro mecanismos: 1) inativação de canais de cálcio voltagem-dependentes sobre terminais nervosos glutamatérgicos; 2) inibição da liberação de glutamato; 3) bloqueio não competitivo de receptores NMDA; e 4) ativação de uma via dependente de proteína G (Miller & Swash, 1996). Riluzol (1 e 10 nmol/sítio, icv) foi bastante eficiente na

prevenção das convulsões induzidas pelo EB, protegendo em 88,9 e 87,5 % dos animais tratados respectivamente. Tiveram também seus efeitos antagonizados pelo riluzol: MCD, um peptídeo do veneno de abelhas, cujo principal alvo epileptogênico é o hipocampo, e DTX I, pequeno peptídeo isolado do veneno de cobras, com loci epileptogênico tanto cortical como hipocampal (Stutsmann et al., 1991). Os efeitos protetores do riluzol contra a hiperexcitabilidade induzida pelo MCD pode resultar de suas propriedades antiglutamatérgicas. Estudos in vivo tem mostrado que MCD produz liberação de amino ácidos excitatórios na região CA1 do hipocampo, durante sua atividade epiléptica. Embora tanto MCD como DTX I tenham como ação primária o bloqueio de canais de potássio voltagem dependentes (Gandolfo, 1989; Harvey, 1997), a expressão de suas atividades epileptogênicas pode envolver uma cascata de eventos que inclui a liberação de glutamato, sendo este último o substrato do efeito protetor do riluzol (Stutsmann et al, 1991). Embora os receptores NMDA sejam amplamente distribuídos por todo o cérebro, a densidade destes receptores é grandemente alta no hipocampo e considerando que talvez o EB possa iniciar seus efeitos convulsivantes também no hipocampo, já que os ensaios comportamentais (campo aberto e alternância espontânea) sugeriram pequenos déficits hipocampais e o resultado obtido com riluzol, protegendo os animais, corrobora a hipótese do envolvimento do sistema glutamatérgico na ação convulsivante do EB.

Como é do nosso conhecimento, o comportamento é um reflexo da função neural. Em vista disso, submetemos um grupo de animais a alguns testes comportamentais não aversivos, tais como campo aberto e alternância espontânea, com a finalidade de verificar se o EB provocava danos neurológicos em doses subconvulsivantes.

Em um campo aberto, os animais apresentam um comportamento exploratório consistindo de atividades locomotora (“crossing”), de orientação (“rearing” - elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco), auto-limpeza (“grooming”) e defecação. A habituação a um novo ambiente é expressa pela redução de tais atividades (Dutra et al., 1991), e depende apenas da integridade hipocampal (Izquierdo et al., 1993). A retenção da habituação pode ser medida durante uma segunda ou mais exposição, pela diferença nos

parâmetros entre a primeira e a última sessão. A redução no número de “rearings” ao longo das sessões no campo aberto é um indicativo de que o animal reconhece o ambiente (Netto et al., 1986). A habituação no campo aberto é considerada por alguns pesquisadores como sendo bastante adequada para avaliar deficits cognitivos sutis, por envolver um aprendizado não essencial em uma tarefa não aversiva (Strupp et al., 1984; Dutra et al., 1991) sendo ainda a que menos se confunde com outras expressões comportamentais (Netto et al., 1986; Rotta et al., 1988). A ausência de habituação nos animais tratados com o EB em doses subconvulsivantes (0,5 a 0,25 µg proteína/sítio), sugere que houve um comprometimento da função hipocampal.

Os resultados relativos à ambulação demonstram que o EB nas doses acima citadas não interfere com a atividade locomotora. Nestas doses utilizadas, acredita-se que o EB tenha um comportamento semelhante ao de um antagonista de NMDA. Antagonistas de NMDA, sejam competitivos ou não competitivos, são estimulantes psicomotores, sendo esta ação mais pronunciada nos antagonistas não competitivos, como o MK-801 (Schmidt, 1994). Entretanto, os efeitos estimulatórios do MK-801 sobre a atividade locomotora têm sido relacionado à dose. Doses a partir de 0,05 mg/kg, ip resultam em aumento da atividade locomotora, enquanto doses abaixo deste valor não comprometem esta atividade (Liljequist et al., 1991; Layer et al., 1993; Hargreaves & Cain, 1995). Entretanto doses mais elevadas de MK-801 (5 a 10 mg/kg), induz o aparecimento de convulsões (Koek & Colpaert, 1990). Com o EB o comportamento parece ser semelhante. Em baixas doses, não exerce influência sobre a atividade locomotora, e em doses mais altas induz o aparecimento de convulsões. Essa característica do EB sugere um comportamento similar ao de um agonista parcial de NMDA (agindo como antagonista em baixas doses e como agonista em altas doses).

Ainda no campo aberto, foram avaliados parâmetros tais como, defecação, auto-limpeza e latência para sair do primeiro quadrado, como medida da reatividade emocional dos animais. Nossos resultados relativos à estas respostas indicaram que o tratamento com o EB da anêmona *Bunodosoma caissarum* não alterou o estado emocional dos animais, visto que não houve nenhum efeito significativo do tratamento sobre estes parâmetros. Em um estudo comparativo das diferenças sexuais do comportamento

emocional em ratos, notou-se que os machos eram mais medrosos na exploração a um novo ambiente do que as fêmeas. A demonstração do medo se deu pela maior defecação e pela menor ambulação dos machos. Este comportamento também pode ser visto tanto em camundongos quanto em hamsters (Gray & Lalljee, 1974). A defecação foi estabelecida como o principal parâmetro da emocionalidade no teste do campo aberto (Whimbey & Denenberg, 1967), ou pode ser simplesmente uma forma de demarcação territorial (Bruell, 1969). A latência para deixar o primeiro quadrado é referida como timidez do animal, sendo utilizada também como parâmetro de emocionalidade na tarefa de habituação ao campo aberto (Archer, 1973). O comportamento de auto-limpeza (“grooming”) parece estar associado a situações de conflitos ou frustrações em diferentes espécies. Ele pode ser aumentado em resposta ao medo ou diminuído diante de uma extrema excitação (Hinde, 1970; Fentress, 1986). Os padrões de auto-limpeza apresentados pelos camundongos em nossos ensaios consistiam de limpeza de toda a face incluindo orelhas e nariz, de todo o corpo, das patas e terminava com a limpeza da cauda em toda a sua extensão. Barros et al. (1994), observaram uma frequência maior na limpeza da face em ratos durante o grooming. Raramente os animais estendiam a limpeza para todo o corpo. Estas peculiaridades podem estar restritas apenas à diferença de espécie. Os resultados dos parâmetros emocionais juntamente com o da atividade locomotora estão compatíveis com os resultados relativos à ausência de habituação nos animais tratados com o EB, uma vez que um eventual estresse emocional provocado pelo tratamento poderia interferir na performance dos camundongos com relação às respostas de orientação ao novo ambiente. Um resultado semelhante foi observado por Moreira et al. (1989) em animais tratados com prolina.

A alternância espontânea se refere a uma tendência natural que muitas espécies de animais apresentam em explorar sucessivamente novos espaços (Yadin et al., 1991; Einat & Szechtman, 1995). Ela consiste de uma situação de escolha, na qual, em certas condições, como por exemplo tratamento com drogas, pode resultar numa escolha perseverativa. Um déficit neste paradigma é visto como aumento na tendência a repetir a mesma escolha. Lesões no hipocampo consistentemente inibem a alternância espontânea (Yadin et al., 1991). Os nossos resultados com o testes de alternância espontânea em

labirinto T sugerem que houve também um comprometimento da função hipocampal, porém mais evidente no grupo tratado com a dose mais elevada do EB (0,25 µg proteína/sítio), resultado este evidenciado pelo maior número de tentativas para alternar o braço quando comparado ao grupo controle.

O teste do nado forçado é um modelo animal de estresse amplamente utilizado para rastrear propriedades antidepressivas em drogas (Sunal et al., 1994). Ele foi idealizado por Porsolt et al. (1977) que observaram que ratos e camundongos quando forçados ao nado em um espaço restrito do qual eles não poderiam escapar, paravam de agitar-se e mantinham uma postura imóvel (Porsolt et al., 1979). Estes autores correlacionaram este comportamento de “desespero”, expresso como imobilidade, a estados clínicos de depressão mental. Este tipo de modelo estressante, inibe a indução da LTP (Potencial de Longa Duração) na região CA1 do hipocampo, um processo dependente da ativação de receptores NMDA (Trullas & Skolnick, 1990). Antagonistas do receptor de NMDA, como o MK-801, mimetizam os efeitos de drogas antidepressivas clinicamente efetivas neste modelo (Trullas & Skolnick, 1990). Considerando que a ação convulsivante do EB foi parcialmente antagonizada por antagonistas de receptores NMDA e que a união específica de glutamato foi inibido pelo EB, empregamos o referido teste para investigar o mecanismo de ação de doses não convulsivantes do EB, usando como droga de referência o antidepressivo tricíclico imipramina, MK-801 como droga comparativa e salina como controle negativo. Injeções agudas ou repetidas de veículo não alteram a imobilidade no teste do nado forçado, seja em animais normais, isolados ou previamente expostos a um contínuo estresse por luta (Hilakivi-Clarke, 1992). O resultado obtido pelos animais submetidos ao tratamento com o EB foi semelhante ao obtido com imipramina, isto é, houve diminuição da imobilidade. A possibilidade do EB causar hiperatividade e estar sendo responsável pela diminuição da imobilidade, foi descartada pelas respostas de cruzamento obtidas em uma sessão do campo aberto durante 6 minutos, o mesmo tempo que o animal permaneceu no ensaio do nado forçado. Não observou-se qualquer alteração na atividade locomotora com a dose utilizada que pudesse comprometer os resultados do referido ensaio. A avaliação do efeito do EB na imobilidade do teste do nado forçado realizada na presença do antagonista não

competitivo de receptores NMDA, MK-801 (0,01mg/kg, ip) (Figura 16) mostra que resultados são similares, sem entretanto haver efeito aditivo ou sinérgico quando ambos foram administrados em conjunto, ou seja, MK-801 por via ip 15 minutos antes da injeção icv do EB. Na dose utilizada o MK-801 também não induz alteração locomotora que pudesse interferir nos resultados de comparação com o EB. Doses de MK-801 bem acima da utilizada são necessárias para obter-se aumento da atividade locomotora (Liljequist et al., 1991). Estes resultados sugerem fortemente que o EB na dose utilizada (0,25 µg proteína/sítio) possui um mecanismo de ação semelhante ao MK-801, ou seja atue como antagonista de receptor NMDA, provavelmente competindo pelo mesmo sítio ou talvez modifique a conformação do receptor de tal forma que dificulte a permanência do MK-801 em seu sítio de ligação. É interessante ressaltar que a hipótese de ação como antagonistas de NMDA também justificaria os efeitos comportamentais provocados pelo EB nas tarefas de campo aberto e alternância espontânea (Schmidt, 1994).

Nos ensaios da medida da união específica de [³H]glutamato, em preparações de membrana de córtex cerebral de camundongos, o EB inibiu o a união específica de glutamato independente de sódio de forma dose dependente. Isto sugere que o veneno desta anêmona pode ter um efeito direto com os sítios de reconhecimento do glutamato em membranas cerebrais. Nos ensaios de “binding” inespecífico, o EB não provocou nenhuma alteração, sugerindo que o mesmo não afeta marcadamente a estrutura físico-química da membrana. Resultados semelhantes com união específica de glutamato foram obtidos com o veneno das aranhas *Araneus gemma*, *Neoscona arabesca* e *Argiope aurantia* (Michaelis et al., 1984). Garateix et al. (1996) demonstraram que uma fração cromatográfica do exudato da anêmona do mar *Phyllactis fosculifera* em registros eletrofisiológicos causou redução nas respostas de glutamato em neurônios do caracol *Zachrysis guanensis*. O efeito do EB sobre a união específica de glutamato parece ser devido à presença de neurotoxinas na amostra, visto que os resultados persistiram após o tratamento térmico ao qual o EB foi submetido e ao qual as citolisinas hemolíticas são vulneráveis.

Somados os resultados, sugere-se que o aparecimento das alterações comportamentais observado nos animais expostos ao veneno da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* (doses até 0,25 µg proteína/sítio alterando tarefas no campo aberto, nado forçado e alternância espontânea e doses superiores causando convulsões) podem ser, ao menos em parte, devido às alterações na neurotransmissão glutamatérgica. Os resultados ainda sugerem que o EB possa atuar como antagonista de NMDA nas doses subconvulsivantes e como agonista nas doses convulsivantes. No entanto estudos adicionais se fazem necessários para melhor esclarecer o envolvimento do sistema glutamatérgico nas ações do EB. A influência direta ou indireta do EB sobre outros sistemas de neurotransmissão não pode ser excluída, uma vez que não foram objeto deste estudo.

7. CONCLUSÕES

1. O extrato bruto obtido do disco oral e tentáculos da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* (EB) apresenta acentuada ação convulsivante seja administrado via icv ou ip, com perfis distintos. A ação convulsivante do EB possivelmente se manifesta pela presença de toxinas neurotóxicas presentes no veneno. O aparecimento de manifestações convulsivas após administração ip sugere a participação de componentes de baixo peso molecular e/ou alteração da permeabilidade da barreira hemato-encefálica pelo veneno.
2. Os resultados dos ensaios comportamentais no campo aberto, nado forçado e alternância espontânea sugerem que o EB produz seus efeitos agindo como antagonista de receptores de glutamato do sub-tipo NMDA, quando aplicado em doses subconvulsivantes.
3. Os resultados obtidos com antagonistas de NMDA, alterando a latência e produzindo parcial proteção em relação às manifestações convulsivas provocadas pelo EB, sugerem mais uma vez o envolvimento do sistema glutamatérgico, principalmente do receptor NMDA, na ação convulsivante do EB.
4. Os canais de sódio parecem não ser alvo de ação primária do efeito convulsivante do EB, visto que bloqueadores tais como fenitoína e carbamazepina não foram eficientes na prevenção do aparecimento das convulsões.
5. O aumento do cálcio intracelular mediado ao menos em parte pelos canais de cálcio do tipo L, parece desempenhar um papel importante nas convulsões induzidas pelo EB, uma vez que a nifedipina inibiu parcialmente seus efeitos convulsivantes.
6. A inibição da união específica de glutamato pelo EB em membranas sinápticas de córtex cerebral de camundongos reforça a hipótese do envolvimento do sistema glutamatérgico nas ações do EB.
7. A persistência do EB em inibir a união específica de glutamato e de causar convulsões, mesmo após tratamento térmico (100°C por 30 min) sugere que estes efeitos devem estar correlacionados e que parecem ser restritos à presença de neurotoxinas.

8. O tratamento do EB com esfingomielina não alterou a capacidade do EB em provocar convulsões, levando-nos a sugerir que citolisinas não participam deste evento, ficando o mesmo restrito à presença de peptídeos neurotóxicos de baixo peso molecular.
9. A ação convulsivante do EB foi suprimida após o mesmo ser submetido ao tratamento com tripsina. Este resultado confirma que a ação convulsivante do EB está associada a componente(s) de caráter protéico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSEN, C., BERESS, L & TESSERAUX, I. (1978) Toxicities of sea anemone (*Anemonia sulcata*) polypeptides in mammals. *Toxicon* 16, 561-566.
- ALSEN, C. (1983) Biological significance of peptides. *Marine Pharmacology: Drugs from the sea. FASEB J.* 42, 101-108.
- AKAIDE, N., KAWAI, N., KRISKIN, N., KLYUCHKO, E., KRISHTAL, O. & TSYNDRENKO, A. (1987) Spider toxins blocks excitatory amino acids responses in isolated hippocampal pyramidal neurons. *Neurosc. Lett* 79, 326-330.
- ANEIROS, A., GARCIA, I., MARTÍNEZ, J.R., HARVEY, A. L., ANDERSON, A. J., MARSHALL, D.L., ENGSTRÖN, A., HELLMAN, U. & KARLSSON, E. (1993) A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1157, 86-92.
- ARAQUE, A., URBANO, F. J., CERVENANSKY, C. GANDÍA, L. & BUÑO, W. (1995) Selective block of Ca²⁺-dependent K⁺ current in crayfish neuromuscular system and chromaffin cells by sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom. *J. Neurosc. Res.* 42, 539-546.
- ARCHER, B. (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 21, 205-235.
- BARROS, H. M. T., TANNHAUSER, S. L. TANNHAUSER, M. A. L. & TANNHAUSER, M. (1994) The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. *Pharmacol & Toxicol.* 74, 339-344.
- BEAL, M. F. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic disease. *FASEB J.* 6, 3338-3344.
- BEAR, M. F., CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. (1996) Neuroscience: exploring the brain. *Williams & Wilkins.*
- BERESS, L. (1988) Phylum Coelenterata (Cnidaria). *Chemistry. In: Poisonous and venomous marine animals of the world*, 152-161.

- BERNHEIMER, A. W. & RUDY, B. (1986) Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochem. Biophys. Acta.* 864, 123-141.
- BERNHEIMER, A. W., AVIGAD, L. S., BRANCH, G., DOWLE, E. & LAY, C.Y. (1984) Purification and Properties of a toxin from the south african sea anemone, *Pseudactinia varia*. *Toxicon.* 22, 183-191.
- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- BRUELL, J. H. (1969) Genetics and adaptative significance of emotional defecation in mice. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 159, 825-830.
- CATTERAL, W. A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15-43.
- CHOI, D. W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosc.* 11, 463-469.
- CHOI, D. W. & ROTHMAN, S. M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemmic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosc.* 13, 171-176.
- CLINESCHMIDT, B. V., MARTIN, G. E. & BUNTING, P. R. (1982a) Anticonvulsant activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5-H-dibenzol[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev. Res.* 2: 123-128.
- CLINESCHMIDT, B. V., MARTIN, G. E., BUTTING, P. R. & PAPP, N. L. (1982b) Central sympathomimetic activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5-H-dibenzol[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant central central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev. Res.* 2, 135-141.
- CLINESCHMIDT, B. V., WILLIAMS, M. J.J., WITOSLAWSKI, P. R., BUTTING, E. A., RISLEY, E. A. & TOTARO, J. A. (1982c) Restoration of shock-suppressed behaviour by treatment with (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5-H-dibenzol[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant central central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev. Res.* 2: 147-152.

- COLLINGRIDGE, G. L., & LESTER, R. A. J. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system, *Pharmacol. Rev.* 40, 143-210.
- COTMAN, C. W., KALHE, J. S., MILLER, E. S., ULAS, J. & BRIDGES R. J. (1995) Excitatory amino acid neurotransmission . *In Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress.* Ed. Bloom, F. E. & Kupfer, D. J. 19, 75-85.
- CZUCZWAR, S. J., TURSKI, L. SCHWARZ, M., TURSKI, W. A. & KLEINROK, Z. (1984) Effects of excitatory amino-acid antagonists on the anticonvulsant action of phenobarbital or diphenylhydantoin in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 357-362.
- CZUCZWAR, S. J., FREY, H. H. & LÖSCHER, W. (1985) Antagonism of N-methyl-D-Laspartic acid induced convulsions by antiepileptic drugs and other agents. *Eur. J. Pharmacol.* 108:273.
- CZUCZWAR, S. J., CHODKOWAK, A., KLEINROK, Z., MALEK, U. & JAGIELLO-WÓJTOWICZ, E. (1990) Effects of calcium channel inhibitors upon the efficacy of common antiepileptic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 176, 75-83.
- CZUCZWAR, S. J., GASOIR, M., TURSKI, W. A. & KLEINROK, Z. (1994) Influence of a Ca²⁺ channel agonist, BAY k-8644, on the anticonvulsant activity of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 264, 103-106.
- CZUCZWAR, S. J., BOROWICZ, K. K., KLEINROK, Z. TUTKA, P. ZARNOWSKI, T. & TURSKI, A. (1995) Influence of combined treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists on electroconvulsions in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 327-333.
- CZUCZWAR, S. J., TURSKI, W. A. & KLEINROK, Z. (1996) Interactions of excitatory amino acid antagonists with conventional antiepileptic drugs. *Metab. Brain Dis.* 11, 143-151.
- DA-SILVA, V. A., MALHEIROS, L. R. & BUENO, F. M. R. (1990) Effects of toluene exposure during gestation on neurobehavioral development of rats and hamsters. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 533-537.
- DE DEYN, P.P., D'HOOGHE, R., MARESCAU, B & PEI, Y. (1992) Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 12, 87-110.

- DE LOS RIOS, V., MANCHENO, J. M., LANIO, M. E., ONADERRA, M. & GAVILANES, J. G. (1998) Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 252, 284-289.
- DE SARRO, G., ONGINI, E., BERTORELLI, R., AGUGLIA, U. & DE SARRO, A. (1996) Anticonvulsant activity of 5,7 DCKA, NBQX, and felbamate against some chemoconvulsants in DBA/2 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2, 281-287.
- DINGLEDDINE, R., MCBAIN, C. J. & MCNAMARA, J. O. (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 334-338.
- DOBLE, A. (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology.* 47, 233-241.
- DUTRA, J. C., WAJNER, M. WANNMACHER, C. M. D., WANNMACHER, L. E., PIRES, R. F. & ROSA-JÚNIOR, A. (1991) Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behaviour. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 595-605.
- EINAT, H. & SZECHTMAN, H. (1995) Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alternation task in rats sensitized to the dopamine agonist quinpirilone. *Physiol. & Behav.* 57, 55-59.
- ELISABETSKY, E., MARSCHNER, J. & SOUZA D. O. (1995) Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 20, 461-465.
- ELDEFRAWI, A.T., ELDEFRAWI, M.E., KONNO, K., MANSOUR, N. A., NAKANISHI, K., OLTZ, E., & USHERWOOD, P. N. R. (1988) Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. Neurobiol.* 85, 4910-4913.
- ELLIOT, R. C., KONYA, R. S. & VICKNESHWARA, K. (1986) The isolation of a toxin from the sea anemone, *Stoichactis kenti*. *Toxicon* 24, 117-122.
- FENTRESS, J. C. (1968) Interrupted ongoing behaviour in two species of vole (*Microtus agrestis* and *Clethrionomys brittanicus*). I. Responses as a function of preceding activity and the context of na apparently "irrelevant" motor pattern. *Anim. Behav.* 16, 135-153.

- FONNUM, F. (1984) Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem. Int. Soc. For Neurochem.* 1-11.
- GABILAN, N. H. (1992) Purificação Parcial de toxinas da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* Corrêa 1964 - Estudo das propriedades da atividade hemolítica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.
- GALLETIS, P. & NORTON, R. S. (1990) Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from sea anemone, *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 28, 695-706.
- GANDOLFO, G. GOTTESMANN, C. BIDARD, JN. & LAZDUNSKI, M. (1989) K⁺ channel openers prevent epilepsy induced by the bee venom peptide MCD. *Eur. J. Pharmacol.* 159, 329-330.
- GANDOLFO, G., LAMBEAU, G., LAZDUNSKI, M. & GOTTESMANN, C. (1996) Effects on behaviour and EEG of single chain phospholipases A2 from snake and bee venoms injected into rat brain: search for a functional antagonism. *Pharmacol. & Toxicol.* 78, 431-347.
- GARATEIX, A . , FLORES, A . , GARCIA-ANDRADE, J. M., PALMERO, A., ANEIROS, A., VEJA, R. & SOTO, E. (1996) Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon* 34, 443-450.
- GASOIR, M., KLEINROK, Z. & CZUCZWAR, S.J. (1995) Influence of BAY k-8644, a calcium channel agonist, on the anticonvulsant activity of conventional anti-epileptics against electroconvulsions in mice. *Neuropharmacology.* 34, 433-438.
- GASOIR, M., BOROWICZ, K., STAROWNIK, R., KLEINROK, Z. & CZUCZWAR, S.J. (1996) Ca²⁺ channel blockade and the antielectroshock activity of NMDA receptor antagonists, CGP 40116 and CGP 43487, in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 312, 27-33.
- GHAURI, M., CHAPMAN, A . G. & MELDRUM, B. S. (1996) Convulsant and anticonvulsant actions of agonists and antagonists of group III mGluRs. *Neuroreport* 7, 1469-1474.

- GRAY, J. A. & LALLJEE, B. (1974) Sex differences in emotional behaviour in the rat: Correlation between open-field defecation and active avoidance. *Anim. Behav.* 22, 856-861.
- GREENAMYRE, J. T. & PORTER R. H. P. (1994) Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 44, 7-13.
- GREENBERG, D. A., COOPER, E. C., & CARPENTER, C. L. (1984) Phenytoin interacts with calcium channels in brain membranes. *Ann. Neurol.* 16, 616-617.
- GODFRAIND, T. & GOVONI, S. (1995) Recent advances in the pharmacology of Ca²⁺ and K⁺ channels. Meeting Report. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 1-4.
- GOWER, A. J., NOYER, M., VERLOES, R., GOBERT, J. & WÜLFERT, E. (1992) Ucb L059, a novel anti-convulsant drug: Pharmacological profile in animals. *Eur. J. Pharmacol.* 222, 193-203.
- HARGREAVES, E. L. & CAIN, D. P. (1995) MK-801-induced hyperactivity: duration of effects in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 13-19.
- HARMAN, A. W. & MAXWELL, M. J. (1995) An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 129-144.
- HARVEY, A. L. (1993) Natural and Synthetic Neurotoxins. *Academic Press Limited*. 146 p.
- HARVEY, A. L. (1997) Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen. Pharmacol.* 28, 7-12.
- HILAKIVI-CLARKE, L. A. (1992) Injection of vehicle is not a stressor in Porsolt's swim test. *Pharmacol. Biochem. & Behav.* 42, 193-196.
- HIMI, T., SAITO, H. & NAKAJIMA, T. (1990a) Spider Toxin (JSTX-3) inhibits the memory retrieval of passive avoidance tests. *J. Neural Transm.* 80, 79-89.
- HIMI, T., SAITO, H., KAWAI, N. & NAKAJIMA, T. (1990b) Spider toxin (JSTX-3) inhibits the convulsions induced by glutamate agonists. *J. Neural Transm.* 80, 95-104.
- HINDE, R. A. (1970): A synthesis of ethology and comparative psychology. In: *Animal Behaviour*. 2nd ed. McGraw-Hill.

- HIRAMATSU, M. CHO, A. K. & NABESHIMA, T. (1989) Comparison of the behavioural and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine. *Eur. J. Pharmacol.* 166,359-366.
- IZQUIERDO, I. (1993) Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Dev. Res.* 30, 1-17.
- JACKSON, H. & USHERWOOD, P. (1988) Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. *Trends Neurosc.* 11, 278-283.
- KAUL, P. N. (1982) Biomedical potential of the sea. *Pure Appl. Chem.* 54,1963-1972.
- KAUL, P. N. & DAFTARI, P. (1986) Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26,117-142.
- KAWAI, N. (1991) Neurotoxic toxins of spider venoms. *J. Toxic-Toxin Rev.* 10, 131-167.
- KEM, W. R. (1988) Sea anemones toxins: structure and action. In: *The Biology of Nematocysts.* 375-405.
- KEM, W. R. & DUNN, B. M. (1988) Separation and characterization of four different amino acid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. *Toxicon* 26, 997-1008.
- KITAMURA, Y. & NAGATANI, T. (1996) Buspirone enhances immobility in the forced swim test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55, 445-451.
- KLEINROK, Z., TURSKI, W. A. & CZUCZWAR, S. J. (1995) Excitatory amino acid antagonists and the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs. *Pol. J. Pharmacol.* 47, 247-252.
- KOEK, W. & COLPAERT, F. C. (1990) Selective blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced convulsions by NMDA antagonists and putative glycine antagonists: Relationship with phencyclidine-like behavioural effects. *Pharmacol. Exp. Therap.* 252, 349-357.
- LAYER, R. T., KADDIS, F. G. & WALLACE, L. J. (1993) The NMDA receptor antagonist MK-801 elicits conditioned place preference in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4,245-247.

- LILJEQUIST, S., OSSOWSKA, K., GRABOWSKA-ANDÉN, M., & ANDÉN, N. (1991) Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *Eur. J. Pharmacol.* 195, 55-61.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, I. L. & RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MACDONALD, E. & SÍRVIÖ, J. (1993) Neurotoxins as tools in lesioning experiments. In: *Natural and Synthetic Neurotoxins*, Acad. Press. Inc. 46 p.
- MACEK, P. (1992) Polypeptide cytolytic from sea anemones (*Actiniaria*). *FEMS Microbiol. Immunol.* 105, 121 - 130.
- MACEK, P., ZECCHINI, M. PEDERZOLLI, C., DALLA SERRA, M., & MENESTRINA, G. (1995) Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin II, a pore-forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L, monitors its interaction with lipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 234, 329-335.
- MACHADO, A. (1993) *Neuroanatomia Funcional*. 2^a Ed., *Atheneu*.
- MCENTEE, W. J. & COOK, T. H. (1993) Glutamate: its role in learning, memory and aging brain. *Psychopharmacology*. 11, 391-401.
- MALPEZZI, E. L. A. & FREITAS, J. C. (1991) Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 1245-1249.
- MALPEZZI, E. L. A., FREITAS, J. C., MURAMOTO, K. & KAMIJA, H. (1993) Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31, 853-864.
- MARETIC, Z. & RUSSEL, F. E. (1982) Some epidemiological and clinical aspects of stings by the anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon*. 20,360-363.
- MAS, R., MENÉNDEZ, R., GARATEIX, A. GARCIA, M. & CHÁVEZ, M. (1989) Effects of a high molecular weight toxin from *Physalia Physalis* on glutamate responses. *Neurosc.* 33, 269-273.
- MATTSON, M. P. (1998) Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 20,53-57.

- MELDRUM, B. & GARTHWAITHE, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neuro degenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379-387.
- MELDRUM, B. (1994) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Edited by G. J. Siegel et al. *Raven Press Ltd.* 5th ed. 885-896.
- MICHAELIS, D. W. (1979) Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. Formation at transmembrane channels in lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta.* 555,67-78.
- MICHAELIS, E. K., GALTON, N. & EARLY, S. L.(1984) Spider venoms inhibit L-glutamate binding to brain synaptic membrane receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81, 55-71.
- MIGUES, P. V., LEAL, R. B., MANTOVANI, M., NICOLAU, M. & GABILAN, N.(1999) Synaptosomal glutamate release by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *NeuroReport* 10, 67-70.
- MILLER, R. & SWASH, M. (1996) Therapeutic advances in ALS. *Neurology.* 47: 217.
- MODY, I. & MACDONALD, J. F. (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16, 356-359.
- MONKS, S. A., GOULD, A. R., LUMLEY, P. E., ALEWOOD, P. F., KEM, W. R., GOSS, N. H. & NORTON, S. R. (1994) Limited proteolysis of structure-function relationship in Sh I, a polypeptide neurotoxin from a sea anemone. *Biochim. Biophys. Acta.* 1207, 93-101.
- MOREIRA, E. G., NASCIMENTO, N., ROSA, G. J. M., ROGERO, J. R. & VASSILIEFF, V. S. (1996) Crotoxin-induced behavioral effects in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 629-632.
- MOREIRA, J.C.F., WANNMACHER, C.M.D., COSTA, S.M. & WAJNER, M. (1989) Effect of proline administration on rat behaviour in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 885-890.
- MUNIZ, D. (1998) Estudo da atividade biológica do extrato bruto e da fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento, Universidade Federal de Santa Catarina.
- NAKANISHI, S. & MASU, M. (1994) Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 319-348.

- NARAHASHI, T., MOORE, J. W. & SHAPIRO, B. I. (1969) Condylactis toxin: interaction with nerve membrane ionic conductances. *Science*. 163, 680-681.
- NETTO, C. A., DIAS, R. D. & IZQUIERDO, I. (1986) Training in an open-field: Simultaneous learning of habituation and of a water finding task, and differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock on the retention of both tasks. *Psychoneuroendocrinology* 11, 437-446.
- NICHOLLS, D. G. (1993) The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212, 613-631.
- OLIVEIRA, B. M., MCINTOSH, J. M., CLARCK, C., MIDDLEMAS, D., GRAY, W. R. & CRUZ, L. J. (1985) A sleep-inducing peptide from *Connus geografus* venom. *Toxicon* 23, 277-282.
- PENNINGTON, M. W., BYRNES, M. E., ZAYDENBERG, I., KHAYTIN, I., CHASTONAY DE, J., KRAFTE, D. S., HILL, R., MAHNIR, V. M., WOLBERG, W. A., GORCZYCA, W. & KEM, W. R. (1995) Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int. J. Pep. Prot. Res.* 46, 354-358.
- PENNINGTON, M. W., MAHNIR, V. M., KRAFTE, D. S., ZAYDENBERG, I., BYRNES, M. E., KHAYTIN, I., CROWLEY, K. & KEM, W. R. (1996) Identification of three separate binding sites on SHK toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human T-lymphocytes and rat brain. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 219, 696-701.
- PINCUS, J. & HSIAO, K. (1981) Calcium uptake mechanisms affected by some convulsant and anticonvulsant drugs. *Brain Research* 217,119-129.
- PORSOLT, R. D., BERTIN, A. & JALFRE, M. (1977) Behavioural despair in mice: A preliminary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229, 327-336.
- PORSOLT, R. D., BERTIN, A., BLAVET, N., DANIEL, M. & JALFRE, M. (1979) Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur. J. Pharmacol.* 57,201-210.
- RODRIGUES, A. L. S., ROCHA, J. B. T., MELLO, C. F. & SOUZA, D. O. (1996) Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. & Toxicol.* 79, 150-156.

- ROGERS, J. C., QU.Y., TANADA, T. N., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. (1996) Molecular determinantes of high affinity binding of α -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel α subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 15950-15962.
- ROTHMAN, S.M. & OLNEY, J. W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.* 19, 105-111.
- ROTTA, F. T., MELLO, C. F., ROCHA, J. B. T & SOUZA, D. O. G. (1988) Early undernutrition blocks the effect of naltrexone on rat exploratory behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 305-312.
- SANTANA, A. N.C., LEITE, A. B., FRANÇA, M.S.F., FRANÇA, L., VALE, O.C., CUNHA, R.B., RICART, O.A.C., SOUZA, M.V. & CARVALHO, K.M. (1998) Partial sequence and toxic effects of granulitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Bunodosoma granulífera*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1335-1338.
- SCHMIDT, W. J. (1994) Behavioural effects of NMDA-receptor antagonists. *J Neural Transm* 43, 63-69.
- SENSIC, L. & MACEK, P. (1990) New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B, 687-693.
- SHAPIRO, B. I. (1968) A site of action of toxin from the sea anemone *Condilactis gigantea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 519-531.
- SHELTON, R. C., GREBB, J. A. & FREED, W. J. (1987) Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel agonist BAY k 8644. *Brain Res.* 402, 399-402.
- SHERREL, L. E. & MICHAELIS, E. K. (1987) Presence of proteins and glutamate as major constituents of the venom of the spider *Araneus gemma*. *Toxicon* 25, 433-442.
- SILVEIRA, R., BARBEITO, L. & DAJAS, F. (1988) Behavioral and neurochemical effects of intraperitoneally injected dendrotoxin. *Toxicon* 26, 287- 292.
- SKET, D., DRASLAR, K., FERLAN, I. & LEBEZ, D. (1974) Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina* . Pathophysiological action. *Toxicon* 12, 63-68.

- SLOVITER, R. S. & DEMPSTER, D. W. (1985) "Epileptic" brain damage is replicated quantitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Res. Bull.* 15, 39-60.
- SMALL, D. L. & BUCHAN, A. M. (1997) NMDA antagonists: their role in neuroprotection. In: *Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia*. Academic Press.
- SOUZA, D. O. & RAMIREZ, G. (1991) Effects of guanine nucleotides on Kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.* 3, 39-45.
- STARR, M. S. & STARR, B. S. (1994) The new competitive NMDA receptor Antagonist CGP 40116 inhibits pilocarpine-induced limbic motor seizures and unconditioned motor behaviour in the mouse. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 127-131.
- STRUP, B. J., LEVITSKY, D. R. & BLUMSTEIN, L. (1984) PKU, learning and models of mental retardation. *Develop. Psychob.* 17, 109-120.
- STUTZMANN, J., BÖHME, G. A., GANDOLFO, G., GOTTESMANN, C., LAFFORGUE, J., BLANCHARD, J., LADURON, P. M. & LAZDUNSKI, M. (1991) Riluzole prevents hyperexcitability produced by the mass cell degranulation peptide and dendrotoxin I in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 193, 223-229.
- SUNAL, R., GÜMÜSEL, B. & KAYAALP, S. O. (1994) Effect of changes in swimming area on results of "behaviour despair test". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 891-896.
- TENG, C. M., LEE, C. Y. & FERLAN, I. (1988) Platelet aggregation induced by equinatoxin. *Thromb. Res.* 52, 401-411.
- TRICKLEBANK, M. D., SINGH, L., OLES, R. J., PRESTON, C. & IVERSEN S.D. (1989) The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 167, 127-135.
- TURLAPATY, P., SHIBATA, S. NORTON, T. R. & KUCHI, M. (1973) Effects of a central stimulant substance isolated from the sea anemone *Stoichactis kenti* on brain monoamines of the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 24, 359-365.
- TRULLAS, R. & SKOLNICK, P. (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.* 185, 1-10.

- TURK, T. (1991) Cytolytic toxins from sea anemones. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* 10, 223-262.
- TURK, T., MACEK, P. & GUBENSEK, F. (1989) Chemical modification of equinatoxin II, a lethal and cytolytic toxin from the sea anemone *actinia equina* L. *Toxicon* 27, 375-384.
- TURSKI, L., NIEMANN, W. & STEPHENS, D. N. (1990) Differential effects of antiepileptic drugs and β -carbolines on seizures by excitatory amino acids. *Neuroscience* 39, 799-807.
- URBANSKA, E., DZIKI, M., KLEINROK, Z., CZUCZWAR, S. J. & TURSKI, W. A. (1991) Influence of MK-801 on the anticonvulsant activity of antiepileptics. *Eur. J. Pharmacol.* 200, 277-282.
- USMANOV, P. B., KALIKULOV, D., SHADYEVA, N. G., NENILIN, A. B. & TASHMUKHAMEDOV, B. A. (1985) Postsynaptic blocking of glutamatergic and cholinergic synapses as a common property of araneidae spider venoms. *Toxicon* 23, 528-531.
- VARANDA, W. & FINKELSTEIN A. (1980) Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxin from the sea anemone, *Stoichatis heliantus*. *J. Membrane Biol.* 55, 203-211.
- VON LUBITZ, D. K. J. E., PAUL, I. A., CARTER, M. & JACOBSON, K. A. (1993) Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 249, 265-270.
- VORNOV, J. J., TASKER, C. R. & COYLE, J. T. (1993) The Differential Neurotoxicity of endogenous and exogenous excitatory neurotransmitter receptor agonists. In: *Natural and Synthetic Neurotoxins.* 187-224.
- WHETSELL, W. O. Jr. (1996) Current concepts of excitotoxicity. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 55, 1-13.
- WHIMBLEY, A. E. & DENENBERG, V. H. (1967) Two independent behavioural dimensions in open-field performance. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63, 500-504.
- WONG, E. H. F. & KEMP, J. A. (1991) Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 401-425.

WOODBURY, D. M. (1980) Phenytoin proposed mechanism of anticonvulsant action. *Adv. Neurol.* 27, 447-471.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.(1986) Principles and methods for the assesment of neurotoxicity associated with exposure to chemicals. Geneva: WHO.180 p. (Environmental Health Criteia, 60).

YADIN, E., FRIEDMAN, E. & BRIDGER, W. H. (1991) Spontaneous alternation behaviour: an animal model for obsessive-compulsive disorder? *Pharmacol. Biochem. & Behav.* 40, 311-315.

ZOREC, R., TESTER, M., MACEK, P. & MASON, W. T. (1990) Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity. *J. Membrane Biol.* 118, 243-249.