UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BRUNO CESAR RIBEIRO RAMOS

Estudos farmacológicos preliminares com a peçonha obtida dos
nematocistos de *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa)

Preliminary pharmacological studies with the venom obtained from
nematocysts of *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa)

SÃO PAULO

2009

BRUNO CESAR RIBEIRO RAMOS

Estudos farmacológicos preliminares com a peçonha obtida dos
nematocistos de *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa)

Preliminary pharmacological studies with the venom obtained from
nematocysts of *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Fisiologia, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador (a): Prof^o Dr^o José Carlos de
Freitas

São Paulo

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS/USP

R 175e

Ramos, Bruno Cesar Ribeiro

Estudos farmacológicos preliminares com a peçonha obtida dos nematocistos de *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa) / Bruno Cesar Ribeiro Ramos. – São Paulo: B. C. R. R., 2009.

p. : Il.

Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. 2009.

1. Hidrozoário – Toxinas
2. *Macrorhynchia philippina* 3. Extração de peçonha 4. Toxinologia I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

LC: QL 377.H9

Nome: RAMOS, Bruno Cesar Ribeiro

TÍTULO: Estudos farmacológicos preliminares com a peçonha obtida dos nematocistos de *Macrorhynchia philippina* (Cnidaria, Hydrozoa)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Fisiologia, na Área de
Fisiologia Geral.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Hlio Theodoro Ramos e Elisabete Simonato Ribeiro e, ao meu padrasto Antonio Tadeu de Freitas, que mesmo nos piores momentos sempre confiaram no meu potencial e acreditaram at mais do que eu que esse dia chegaria.

AGRADECIMENTOS

A minha família por acreditar em mim e pelo amor e carinho concedido por eles durante todos os anos da minha vida.

Ao meu irmão Daniel Gustavo Ribeiro Ramos e ao meu primo Theodoro Tetsuo Nagoya, que são pessoas especiais pra mim e sempre serão.

Ao meu irmão mais novo Alexandre Ribeiro de Freitas, que sempre me faz rir com vídeos toscos da internet.

Aos meus amigos, da Raleh, pelas cervejadas e pelos momentos de diversão que me proporcionaram nesse período.

A todo pessoal do laboratório da prof^a Regina P. Markus pela amizade e pelas cervejadas no C.A. da Bio e em especial a Eduardo K. Tamura pelo ajuda na construção dessa dissertação.

Aos amigos Marcio Patto, Leonardo Lima e Marcelo (Tchelão), também pelas cervejadas e momentos de descontração.

A todo pessoal do laboratório de toxinologia e produtos naturais pelo suporte e apoio. Em especial a Enrique Sanches Rozas por ser praticamente meu co-orientador e a Wilson Ferreira Jr. pela colaboração nos ensaios que foram definitivos para construção dessa dissertação.

A minha namorada, Daniela Sawatani, pelo apoio e carinho.

Ao time de handbol da Biologia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao CEBIMAr pelo apoio e pela infraestrutura cedida.

Aos professores: Ida Sigueko Sano Martins, José Guilherme Chaui Berlinck, Márcio Reis Custódio, Silvia Cristina Ribeiro de Souza, Carlos Arturo Navas Iannini, Ana Maria de Lauro Castrucci, pelo indubitável auxílio na construção do profissional que me torno nesse momento.

Ao meu orientador José Carlos de Freitas pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, sob sua orientação e a sua esposa Carla Dello pela ajuda em momentos difíceis.

RESUMO

Muitas interações entre organismos são mediadas pela liberação de substâncias biologicamente ativas. Nos Cnidários esse tipo de interação é ainda mais marcante devido a organelas características do grupo, denominadas nematocistos. Usados tanto na captura de alimento quanto para defesa do organismo, os nematocistos contêm toxinas com ações que variam de moderadas até potencialmente fatais em humanos, o que torna importante o estudo desse grupo sob ponto de vista toxinológico. As classes Anthozoa, Cubozoa e Scyphozoa têm sido extensivamente estudadas sob esse ponto de vista durante décadas, porém a classe Hydrozoa, embora não menos importante, ainda carece de estudos. Os poucos trabalhos realizados com membros desse grupo se restringem a algumas espécies de hidras, caravelas (*Physalia*) e hidrocorais (*Millepora*).

A espécie *Macrorhynchia philippina* é composta por hidróides coloniais bentônicos que podem ser encontrados ao longo de todo o Canal de São Sebastião-SP. Ela é responsável por diversos acidentes com banhistas e mergulhadores que esbarram em suas colônias, desencadeando uma sensação de dor bastante forte, aguda e localizada que persiste por alguns segundos. Contudo, este contato não leva a lesões graves ou inflamação local como as peçonhas de membros das demais classes. Embora sejam organismos comuns e farmacologicamente interessantes, não existe nenhum estudo do ponto de vista toxinológico com esta espécie. Assim, nesse trabalho, investigamos os hidróides da espécie *M.philippina*, além de caracterizar as toxinas obtidas de seus nematocistos. Para essa análise utilizamos dois métodos de obtenção de peçonha: a homogeneização, que consiste na maceração de fragmentos da colônia (extrato total), e a estimulação elétrica, da qual se obtém a peçonha diretamente dos nematocistos (peçonha bruta). Esses dois métodos foram submetidos a três testes farmacológicos na tentativa de se evidenciar a presença de toxinas como, citolisinas, neurotoxinas e citotoxinas.

A comparação entre os dois métodos mostrou uma paradoxal diferença. Apenas o extrato total provocou efeitos positivos nos testes indicando a perda de atividade ou mesmo a ausência de toxinas que provoquem esses efeitos na peçonha bruta. A observação desses dados, somados aos relatos de dor registrados pelo contato dessa espécie com seres humanos, nos levou a submeter a peçonha bruta a mais três testes, que evidenciariam desta vez a existência de toxinas envolvidas em processos de inflamação e indução de dor.

Os resultados obtidos em todos os testes sugerem a existência de uma toxina de origem “não nematocística” responsável pelos efeitos citolíticos e neurotóxicos observados. Assim como a existência de toxinas presentes nos nematocistos envolvidas em processos de inflamação e indução de dor.

ABSTRACT

Many interactions between animals are made by the release of bioactive substances. In Cnidarian, these interactions are greatly expressed by characteristic organelles of this group named nematocysts. Using it for prey capture or defense against predators, the nematocysts have a toxic cocktail with actions that can be moderate or potentially fatal to humans. This fact makes the studies involving these animals a very important subject. The Classes Anthozoa, Cubozoa e Scyphozoa have been studied, under this point of view, for decades. However, the Hydrozoa class, even though no less important, still need a similar approach. The few works that had been made with the members of this group include only a limited number of species of hydra, Man-of-War (Physalia) and firecorals (Millepora).

The species *Macrorhynchia philippina* are composed by bentonic colonial hydroids. They are found along the entire São Sebastião-SP channel, being responsible for injuries to divers and bathers that entry in contact with their colony. The pain evoked from its contact is very strong, acute and pointed, that lasts for a few seconds. Nevertheless, its contact does not lead to serious injury or local

inflammatory edemas like those produced by animals belonging to other classes. Even though being a species of pharmacological interest, there is no toxinological study made with these animals.

In this work, we investigated the hydroids from *M. philippina* species trying to characterize the effects of the venom obtained from its nematocysts. In order to perform this task two methods of extraction had been used: the homogenization, that consists in the maceration of fragments of the colony (total extract), and the electrical stimulation, from which we can obtain the venom produced directly by the nematocysts (crude venom). These two methods were performed using three pharmacological tests in order to try to prove the existence of toxins like, cytolytins, neurotoxins and cytotoxins.

The comparison between the two methods shows a paradoxal difference. Only the total extract evoked positive effects, showing a loss of activity or even the absence of the toxins that evoke these effects in crude venom. These observation, in addition with the reports of acute pain due to the contact with this specie in humans, lead us to submit the crude venom to three more new tests, that would expose the existence of toxins that are involved in pain and inflammatory mechanisms.

Our results suggest the existence of a toxin from non-nematocysts tissues, responsible for the cytolytic and neurotoxic effects observed, and a toxin in nematocysts that act in inflammatory mechanism and pain induced processes.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	12
Objetivo Geral	20
Objetivos específicos	21
MATERIAL E MÉTODOS	21
Métodos de obtenção e preparo da peçonha	22
Estimulação Elétrica	22
Ultrafiltração	24
Homogeneizações da Colônia	25
Estimativa do Conteúdo Protéico	25
Métodos de purificação da peçonha	26
Purificação por Filtração em Gel de Sephadex G-50	26
Purificação por Cromatografia de Fase Reversa (RP-HPLC)	27
Ensaio Farmacológicos	27
Hemólise em Eritrócitos de Camundongos (Citólise)	27
Injeção Hemocélica em <i>Callinectes danae</i> (Neurotoxicidade)	29
Citotoxicidade em Ovos de Ouriço do Mar (Citotoxicidade)	31
Indução de Hiperálgia por Carragenina	33
Avaliação da sensibilidade dolorosa:	33
Nocicepção Induzida por Formalina	35
Produção Intracelular de Óxido Nítrico (NO) em Células Endoteliais	35
Avaliação da Concentração de NO Intracelular através de Microscopia Confocal	36
Análise estatística	37

RESULTADOS	38
Métodos de Obtenção da Peçonha	38
Métodos de Purificação da Peçonha	41
Hemólise em Eritrócitos de Camundongos	44
Injeção Hemocélica em <i>Callinectes danae</i> (Siri-Azul)	48
Citotoxicidade em Ovos de Ouriço (<i>L. variegatus</i>)	49
Indução de Dor e Hiperalgesia	51
Produção intracelular de NO em Células Endoteliais	54
DISCUSSÃO	56
Métodos de obtenção da peçonha	56
Métodos de Purificação e Estabilidade da Peçonha	58
Comparação entre Extrato Total e Peçonha Bruta	61
Análise da Peçonha Bruta	64
Indução de Hiperalgesia por Carragenina	64
Nocicepção Induzida por Formalina	65
Produção de NO em Células Endoteliais	67
CONCLUSÃO	69
BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUÇÃO

Os oceanos são ambientes extremamente diversos. São volumetricamente e superficialmente maiores do que o ambiente terrestre e oferecem assim um amplo espaço no qual os animais podem viver e se diversificar. Assim não é de se surpreender que esse ambiente abrigue uma enorme diversidade de animais (BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J., 2007). Essa tremenda variedade e abundância de animais nos oceanos de todo mundo é resultado de vários fatores, dentre os quais, muitos estão relacionados a condições de redução de estresse químico e físico nas atividades diárias dos organismos (BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J., 1990).

Devido à grande quantidade de espécies presentes nesses ambientes, outro fator não menos importante que deve ser levado em conta é a inevitável interação entre organismos. Muitas dessas interações são mediadas pela liberação de substâncias biologicamente ativas, as quais podem ser classificadas de acordo com seu papel ecológico (BURKS; LODGE, 2002; RUTHER, *et al*, 2002) em:

- Feromônios: atuando na comunicação entre membros da mesma espécie.
- Cairomônios: atuando na comunicação entre membros de espécies diferentes com vantagens para a espécie receptora e;

- Alomônios: substâncias químicas defensivas e ofensivas, com vantagens adaptativas para a espécie que libera a substância no meio.

Nesse contexto os alomônios ofensivos são substâncias empregadas por organismos predadores para paralisar e subjugar sua presa, enquanto os alomônios defensivos são utilizados para deterem inimigos (predadores ou competidores) (SHER *et al.*, 2005).

O uso desses alomônios já foi amplamente registrado nos diversos táxons do Reino Metazoa, mas nenhum táxon o faz tão ampla e elegantemente como os membros do Filo Cnidaria.

O filo Cnidaria é um conjunto altamente diverso que inclui as águas-vivas, as anêmonas do mar, os corais e as hidras, e também formas bem menos conhecidas, como hidróides, sifonóforos, zoantídeos e mixozoários. Existem atualmente cerca de 13.000 espécies conhecidas de cnidários (TURK; KEN, 2009). Grande parte da diversidade exibida pelo grupo resulta de dois aspectos fundamentais do seu estilo de vida. O primeiro é a tendência de formar colônias por reprodução assexuada, podendo assim atingir formas e proporções impossíveis para indivíduos solitários. O segundo é a presença, em muitas espécies dentro do grupo, de um ciclo de vida dimórfico, que inclui duas morfologias adultas completamente diferentes, o pólipó e a medusa.

Os cnidários são organismos com simetria radial e representam um dos mais primitivos níveis de organização multicelular. São metazoários diploblásticos, ou seja, são formados a partir de duas camadas germinativas, ectoderme e endoderme as quais são intercaladas por uma matriz extracelular chamada

mesoglêia ou mesênquima. Eles ainda possuem um número limitado de tipos celulares que podem ser subdivididos em uma maioria de células multifuncionais e um limitado número de células altamente especializadas (ZHANG *et al.*, 2003).

Os animais desse filo também podem ser chamados de celenterados, pois apresentam uma única cavidade corporal, denominada cavidade gastrovascular. Essa cavidade possui uma única abertura (boca), a qual é rodeada por tentáculos que auxiliam na captura do alimento.

Os cnidários são em sua grande maioria carnívoros, embora alguns sejam suspensívoros ou abriguem intracelularmente algas simbiontes das quais podem obter energia. Assim como predadores ativos os membros desse filo necessitam de um sistema eficiente de captura alimento. Essa necessidade é suprida por células altamente especializadas, produzidas única e exclusivamente pelos membros desse filo, chamadas cnidócitos ou nematócitos.

Os cnidócitos representam uma das estruturas mecânicas e morfológicas mais elaboradas da natureza (TARDENT, 1995) e, como consequência, é uma das mais complexas células eucarióticas existentes (ANDERSON; BOUCHARD, 2009). A demanda energética na criação de uma célula tão complexa se torna ainda mais marcante pelo fato de que os cnidócitos só podem ser usados uma única vez. Dessa maneira estas células são altamente reguladas para garantir que seu uso seja feito apenas em condições adequadas (ANDERSON; BOUCHARD, 2009). Essas células possuem uma organela capaz de se everter, denominada cnida, ou de modo geral, nematocisto. Morfologicamente, existem aproximadamente 30 diferentes tipos de cnida (FAUTIN, 2009), as quais podem ser agrupadas em três tipos básicos. O primeiro é formado pelos verdadeiros

nematocistos, cuja estrutura é composta por uma cápsula com paredes duplas contendo uma mistura tóxica e um túbulo eversível. Geralmente esse túbulo é acompanhado por espinhos ou estiletos para facilitar a penetração e a fixação nos tecidos da vítima e é capaz de levar as toxinas até a mesma através do poro terminal existente no túbulo ou através da sua superfície (BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J., 2007). O segundo tipo, o espirocisto, contém mucoproteínas ou glicoproteínas que aderem no corpo da vítima ao invés de penetrar. E finalmente o terceiro tipo, o pticocisto, que é utilizado exclusivamente na fixação do próprio animal.

Dos tipos básicos listados acima os que merecem maior atenção e que são mais estudados nos dias de hoje são os nematocistos. Assim como em outros animais peçonhentos o seu caráter tóxico se deve principalmente ao grande espectro de polipeptídios presentes na sua peçonha, e que podem ser divididos em três categorias principais: (1) polipeptídios de alto peso molecular (5-80 kDa), substâncias citolíticas formadoras de poros, das quais algumas possuem atividades hemolíticas, cardiotoxinas e dermatonecroticas; (2) fosfolipases tóxicas; e (3) polipeptídios neurotóxicos, que são modificadores de condutância de íons e geralmente agem nos canais de sódio e potássio (ZHANG *et al.*, 2003).

A importância no estudo desses animais reside não apenas no potencial óbvio que suas toxinas têm como ferramentas farmacológicas, mas também nos frequentes contatos desses animais com seres humanos. Teoricamente qualquer cnidário é um agressor em potencial aos seres humanos devido à presença de suas células características, os cnidócitos. Existem pelo menos quatro Classes de cnidários tóxicos reconhecidas pela maioria dos sistematas (TURK; KEN, 2009).

São estas as Classes, Anthozoa, Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa. Dentre essas quatro classes, três possuem estágio medusóide em seu ciclo de vida, Scyphozoa, Cubozoa e Hydrozoa, e geralmente os casos fatais de envenenamento em seres humanos decorrem do contato com essas medusas, principalmente com animais das classes Cubozoa e Scyphozoa. Apesar de possuírem toxinas extremamente potentes e causarem fatalidades aos seres humanos, muitas dificuldades são encontradas no estudo com esses animais.

Assim como o nematocisto, todos os variados sistemas de injeção de peçonha do reino animal têm um propósito similar, a injeção efetiva da peçonha na presa ou predador (CARRETTE; SEYMOR, 2002). Contudo a quantidade de peçonha injetada por um único nematocisto é infinitamente pequena se comparada a de outros animais como, por exemplo, cobras e aranhas. Sendo assim necessária, muitas vezes a ativação de milhares dessas organelas para que a presa ou predador sofram seus efeitos.

Da mesma maneira, os trabalhos que envolvem a ação e caracterização da peçonha de cnidários necessitam de um método eficiente de extração dos nematocistos, pois é necessária a coleta de milhares de nematocistos para que a peçonha possa ser removida em quantidades suficientes para análise.

Um dos principais métodos utilizados para obtenção da peçonha de cnidários desde o início do século XX, quando o interesse por esses animais começou a crescer, foi o da maceração ou homogeneização, onde os indivíduos em sua totalidade ou apenas seus tentáculos, eram utilizados para obtenção da peçonha. Análises dos procedimentos de extração da peçonha do primeiro simpósio de toxinas marinhas mostraram que, até a década de 60, a maioria dos

pesquisadores de toxinas marinhas ainda analisavam seus efeitos a partir do extrato total dos animais (TURK; KEM, 2009). Esse método, apesar de eficiente na liberação da peçonha contida no nematocisto, trouxe consigo uma série de dúvidas, pois não se podia garantir que o efeito tóxico apresentado pelo extrato fosse causado exclusivamente pela peçonha contida nos nematocistos. Dessa maneira, na tentativa de contornar esse problema, muitos métodos de extração de peçonha foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas. Bloom *et al*, (1998) desenvolveram um eficiente método de remover grandes quantidades de nematocistos dos tentáculos de cnidários durante os estudos realizados com o cubozoário *Chironex fleckeri*, o mais letal cnidário conhecido (TURK; KEM, 2009). Esse método se baseia no isolamento dos nematocistos através da lenta digestão dos tentáculos do animal em água do mar, com a conseqüente liberação dos nematocistos na mesma. Outros autores utilizam métodos diferentes para obtenção da peçonha de nematocisto, como por exemplo, nos estudos com a anêmona *Aiptasia mutabilis* (MARINO *et al*, 2009), onde os filamentos gastrovasculares (acôntio) isolados desse animal são tratados com solução de citrato de sódio e gentilmente pipetados para permitir o desprendimento dos nematocistos do mesmo. No Brasil, em um trabalho realizado com anêmonas da espécie *Bunodosoma caissarum*, a peçonha foi obtida por estimulação elétrica, sendo os indivíduos, após o procedimento, devolvidos ao aquário ou ao mar (MALPEZZI *et al*, 1993). Este método tem se mostrado bem eficiente na extração da peçonha, já que apenas toxinas presentes nos nematocistos são obtidas. Apesar do desenvolvimento de novas técnicas, muitas abordagens ainda se baseiam na homogeneização total ou parcial dos organismos.

Os membros das classes Anthozoa, Cubozoa e Scyphozoa têm sido extensivamente estudados sob o ponto de vista toxinológico durante décadas, e muitos deles já possuem suas toxinas isoladas e efeitos caracterizados (SUPUT, 2009). Porém a classe Hydrozoa, embora não menos importante, ainda carece de estudos. Existem poucos trabalhos realizados com membros desse grupo, e estes se restringem a algumas espécies de hidras (KLUG *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 2003), caravelas (*Physalia*) (EDWARDS; HESSINGER, 2000), que foi o hidróide mais estudado por ser o responsável pelo maior número de casos de acidentes (BURNETT; GABLE, 1989) e hidrocorais (*Millepora*) (WITTLE *et al.*, 1971; IBARRA-ALVARO *et al.*, 2007), conhecidos como corais de fogo.

A Classe Hydrozoa é composta por cerca de 2.700 espécies, mas devido ao seu pequeno tamanho e aparência de planta a maioria das pessoas não sabem de sua existência. A maioria dos hidróides é colonial e apresenta em seu ciclo de vida tanto a forma de pólipos quanto a forma medusóide (RUPPERT; BARNES, 1994). Uma característica marcante dessa Classe, o polimorfismo, está associada a sua organização colonial. A maioria das colônias hidróides exibe pelo menos dois tipos morfológicos distintos: os gastrozoóides, responsáveis pela captura de alimento, mas que também podem suprir a função de defesa, e os dactilozoóides, pólipos de defesa geralmente encontrados ao redor dos gastrozoóides e que também podem auxiliar na captura de alimento. O terceiro tipo, e menos freqüente, é o gonozoóide, pólipos reprodutivos (RUPPERT; BARNES, 1994).

No Brasil existem quatro espécies de cnidários associados com acidentes no litoral sudeste, onde duas delas são hidróides. São elas: os cubozoários, *Tamoya haplonema* e *Chiropsalmus quadrumanus*, encontrados em toda costa

brasileira; e os hidróides *Physalia physalis* (caravela portuguesa), um hidróide colonial pelágico que pode causar severas injúrias a banhistas e pescadores (Freitas *et al.*, 1995), e *Olindias sambaquienses*, uma hidromedusa conhecida popularmente como “reloginho” (HADDAD *et al.*, 2002). Apesar da maioria dos acidentes ser provocado por animais de vida livre, um trabalho na literatura descreve um acidente com o hidróide colonial bentônico da família Haleciidae, o *Nemalecium lighti*, no litoral brasileiro que produz queimaduras aos banhistas ou mergulhadores que entrarem em contato com seus tentáculos (MARQUES, *et al.* 2002). As peçonhas de cnidários do grupo dos hidróides bentônicos são pouco estudadas, talvez pelo tamanho reduzido de seus pólipos e colônias, e pela dificuldade de se obter quantidades significativas de peçonha para análises, porém, como relatado acima, apesar do tamanho, esses animais podem causar injúrias ao homem, o que torna o estudo desse grupo um tema ainda mais importante.

A espécie *Macrorhynchia philippina* é composta por hidróides coloniais bentônicos pertencentes à ordem Leptothecata e família Aglaopheniidae (fig.1 e 2). Esta espécie possui uma distribuição circuntropical e cicunsubtropical, e no Brasil se tem registros de sua distribuição em Santos e arredores, Rio de Janeiro, Bahia e ao longo do Canal de São Sebastião – SP (MIGOTTO, 1993), onde é responsável por diversos acidentes com banhistas e mergulhadores que esbarram em suas colônias. A sensação é de dor bastante forte, aguda e localizada, que persiste por alguns segundos. Contudo, este contato não leva a lesões graves ou inflamação local como as peçonhas de membros das demais classes. Embora

sejam organismos comuns e farmacologicamente interessantes, não existe nenhum estudo do ponto de vista toxinológico com esta espécie.

Figura 1 – Colônias de *M. philippina* presas ao substrato. Espécie presente no litoral sudeste do Brasil e Bahia.

Figura 2 – Foto detalhada de uma colônia de *M. philippina* evidenciando sua ramificação irregular, com ramos principais polissifônicos e terminais geralmente monossifônicos.

Objetivo Geral

Investigar a espécie *Macrorhynchia philippina* sob o ponto de vista toxinológico.

Objetivos específicos

- Desenvolver um método eficiente para a obtenção da peçonha presente nos nematocistos de *M. philippina*.
- Comparar esse novo método, através de ensaios farmacológicos, com um dos métodos mais amplamente utilizados na literatura, o da homogeneização.
- Caracterizar as toxinas de *M.philippina* através de ensaios farmacológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *M. philippina* foram coletados no canal de São Sebastião, principalmente nas regiões do farol e da transição entre a praia Grande e a praia Preta. As colônias foram coletadas em mergulho livre, utilizando-se de sacos de polietileno para envolvê-las e removê-las do substrato rochoso no sublitoral, a uma profundidade de 1 a 3 metros. Tentativas de coletas anteriores mostram maior integridade dos cnidócitos quando as colônias foram coletadas desta maneira.

Os exemplares foram levados em sacos de polietileno até o Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), onde foram mantidos em tanques com água do mar corrente até o momento do uso.

Métodos de obtenção e preparo da peçonha

Estimulação Elétrica

Fragmentos de *M. philippina* previamente limpos foram colocados em uma placa de Petri (fig.3) com volume de água do mar artificial suficiente para recobrir completamente o fundo da placa. Os estímulos foram gerados por um estimulador (Stimulator, Terroni Equipamentos LTDA., Brasil) e aplicados por de eletrodos de carbono, com frequência de 20Hz, duração de 10ms e voltagem máxima (100Volts) (fig.4). Os eletrodos foram passados por toda a extensão dos fragmentos do animal para que a estimulação fosse mais eficiente. A confirmação da eversão dos filamentos dos nematocistos foi feita através da observação dos mesmos em microscopia óptica, sob um aumento de 400x. A peçonha obtida foi imediatamente congelada a uma temperatura de -20°C .

A solução obtida nesse procedimento foi denominada, nesta dissertação, como “Peçonha Bruta” (PeB).

Figura 3 - Placa de Petri recoberta com uma fina camada de água do mar artificial. Os Fragmentos de *M. philippina* ficam dispostos como mostrado na figura, evitando-se que fiquem para fora da camada de água.

Figura 4 - Aparelhagem utilizada no método de estimulação elétrica de *M. philippina*. (A) Estimulador, (B) Eletrodos de carbono, (C) Placa de Petri e (D) Frasco de coleta.

Para o preparo da peçonha bruta para os testes farmacológicos, esta foi primeiramente centrifugada a 10.000rpm por 5min (Sorvall® Superspeed RC2-B, Ivan Sorvall inc., EUA) para remoção de partículas em suspensão e posteriormente liofilizada para concentração da amostra. O último passo no preparo foi o processo de ultrafiltração, necessário para eliminar a quantidade excessiva de sal da amostra, consequência do processo de liofilização.

Ultrafiltração

A peçonha bruta previamente centrifugada foi submetida a um processo de ultrafiltração no sistema AMICON (Amicon, inc., EUA), que consiste de uma câmara pressurizada com um agitador magnético e uma membrana de filtração Diaflo® (Amicon, inc., Beverly, MA, EUA) de corte molecular de 1000Da. A câmara foi preenchida com 50ml de peçonha bruta e foi submetida a uma pressão de 5,3kgf/cm² com gás nitrogênio para facilitar a filtração. A peçonha bruta foi periodicamente adicionada ao sistema até que todo o seu volume fosse passado. Ao final da última passagem, sem que se permitisse a secagem da membrana, 50ml de tampão PBS foram adicionados à peçonha bruta para que a solução final estivesse dentro de concentrações adequadas de salinidade (1%). Ao final do processo foram obtidos aproximadamente 6ml de peçonha bruta concentrada.

Homogeneizações da Colônia

Fragmentos de *M. philippina* congelados foram pesados, aproximadamente 1g, e homogeneizados com cadinho e pistilo por 2min. Ao homogeneizado foi adicionado 1ml de tampão PBS (pH 7,4). O extrato obtido foi então centrifugado duas vezes a 10.000rpm por 5min (Centrifuga MiniSpin[®], Eppendorf AG, Alemanha) para remoção de partículas em suspensão. O sobrenadante foi retirado e imediatamente congelado a uma temperatura de -20°C. A verificação da eversão dos filamentos dos nematocistos foi feita através da observação dos mesmos em microscopia óptica, sob um aumento de 400x.

A solução obtida através desse procedimento foi denominada, nesta dissertação, como "Extrato Total" (ExT).

Estimativa do Conteúdo Protéico

Para estimar-se a quantidade de proteína presente na peçonha e frações, utilizou-se um "kit" que se baseia no método de dosagem do ácido bicinconínico (BCA) seguindo-se o protocolo do manual do fabricante (Pierce, Rockford, EUA). Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

Métodos de purificação da peçonha

Purificação por Filtração em Gel de Sephadex G-50

O fracionamento do extrato total e da peçonha bruta foi realizado através de uma coluna (1,9cm X 131cm) empacotada com gel Sephadex G-50 (Pharmacia LKB- Biotechnology, Uppsala, Suécia), equilibrada e eluída com solução de acetato de amônio 0,1M a temperatura ambiente. Antes da injeção na coluna, tanto extrato total quanto peçonha bruta foram submetidos a uma centrifugação de 10.000rpm por 5 min (Centrifuga MiniSpin[®], Eppendorf AG, Alemanha). Em cada corrida, 2ml do extrato total foram injetados e para peçonha bruta, 2g do material liofilizado foram diluídos em 10ml de água destilada.

A absorbância de cada fração foi registrada diretamente na saída da coluna, através da passagem do efluente por um detector de UV (Spectra/ChromTM Flow Thru UV Monitor com unidade óptica de 280nm e UV Monitor Controller, Spectrum, Áustria) antes de entrar no coletor de frações. A informação, captada pelo detector, foi integrada e registrada permanentemente em papel (Spectra/ Chrom TM 1 Channel Recorder, Spectrum, Áustria). Cada pico coletado foi liofilizado e armazenado a -20°C.

Purificação por Cromatografia de Fase Reversa (RP-HPLC)

O material obtido através da gel-filtração da peçonha bruta foi ressuspenso em água Milli-Q (Millipore Inc.) e injetado em um sistema de purificação ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), usando uma coluna CAPCEEL PACK C-18 10X250mm (Shiseido Corp, Kioto, Japão). As condições utilizadas no procedimento foram: Solvente A, solução de água com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e solvente B, acetonitrila com 0,1% TFA. As separações foram realizadas em um fluxo de 2,5ml/min, com gradiente do solvente B variando de 0-60% em 40 minutos. Os picos foram monitorados a 214nm. Todos os picos obtidos foram coletados manualmente, liofilizados e armazenados a -20 °C.

Ensaio Farmacológicos

Hemólise em Eritrócitos de Camundongos (Citólise)

O sangue foi obtido de camundongos (*Mus musculus*), cedidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de decapitação. O sangue foi colocado em um béquer com volume de aproximadamente 60ml de solução fisiológica de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 113; de KH_2PO_4 1,2; KCl 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11,1) e mantido em agitação

constante por 15 minutos. A mistura foi centrifugada três vezes a 3000rpm por 5min (Centrifuga Excelsa II 206 MP, FANEM, Brasil) para lavagem dos eritrócitos e remoção do plasma. Após essa etapa foi preparada uma solução de eritrócitos (SE) a 0,5% (v/v) em solução fisiológica de Krebs-Henseleit para os testes em eppendorf.

Para realização dos testes em eppendorf, as amostras obtidas através dos dois métodos de extração foram colocadas em cada tubo a uma concentração arbitrária e caso houvesse necessidade foram diluídas em solução fisiológica de Krebs-Henseleit. Variou-se as concentrações das amostras em µg/ml. Foram utilizados 20µl das amostras e adicionados a eles 180µl de SE a 0,5%. O controle negativo foi feito usando solução fisiológica de Krebs-Henseleit e tampão PBS (pH 7.4). Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, sob agitação constante e posterior centrifugação a 3000rpm por 5min (Centrifuga Excelsa II 206 MP, FANEM, Brasil), o sobrenadante foi retirado e colocado em placas de 96 poços. A atividade hemolítica foi medida pela absorbância do sobrenadante a 540nm em espectrofotômetro Elisa (SpectraMax 250, Molecular Devices, Alemanha). A hemólise total foi obtida pela adição de 20µl de Triton X-100 a 1% e a porcentagem de hemólise foi calculada relativa a esse valor.

Injeção Hemocélica em *Callinectes danae* (Neurotoxicidade)

Nesse experimento foram utilizados exemplares de *Callinectes danae* (siri azul) coletados no canal de São Sebastião por técnicos do centro de biologia marinha da USP (CEBIMar/USP) e mantidos em tanques com água do mar corrente ou em aquários aerados quando levados ao laboratório da USP/SP.

Para avaliar a toxicidade (letalidade ou atividade paralisante) da amostra testada foi utilizada uma metodologia adaptada de Oliveira *et al*, (2006b). Foram utilizados indivíduos com peso variando de 20 a 100g. As amostras de extrato total e peçonha bruta foram injetadas na junção entre o corpo e o segundo par de apêndices locomotores (fig.5) dos indivíduos em três concentrações diferentes: 20, 35 e 50µg/ml, e o seu volume foi fixado seguindo a relação de 6µl/g. Em caso de necessidade de diluição das amostras, estas foram diluídas com solução fisiológico para *Callinectes danae* (em mM: NaCl 470,4, KCl 8,0, CaCl₂ 18, MgCl₂ 1,5, NaHCO₃ 6,0 e glicose 5,6). Os indivíduos foram colocados em bandejas plásticas (fig.6) com água do mar suficiente para cobri-los e foram observados por um período de 2 horas. A cada 30 minutos, os indivíduos foram virados com a parte ventral para cima e seu desempenho no retorno a posição normal foi observado. Foi considerado um efeito positivo as amostras que causaram morte, desorientação parcial ou dificuldade no retorno a posição normal.

Figura 5 - Procedimento utilizado na injeção de amostras em *C. danae*. A injeção das amostras é feita na da junção do corpo com o segundo par de apêndices locomotores.

Figura 6 - Disposição dos indivíduos durante o período de observação de 2 horas. Animais colocados em bandejas plásticas com volume de água suficiente para recobri-los.

Citotoxicidade em Ovos de Ouriço do Mar (Citotoxicidade)

Foram utilizados exemplares da espécie *Lytechinus variegatus* coletados no canal de São Sebastião por técnicos do centro de biologia marinha da USP (CEBIMar/USP) e mantidos em tanques com água do mar corrente até o momento do uso.

A liberação dos gametas foi induzida pela injeção de 3ml de KCl 0,5M na cavidade perivisceral dos ouriços através da região do órgão raspador (lanterna de Aristóteles) (fig.7). Após a ejeção, os óvulos foram colocados em um béquer de 250ml previamente preenchido com água do mar filtrada. O esprema foi coletado com uma pipeta Pasteur junto aos poros genitais e 150µl dessa solução foram adicionados a 50ml de água do mar filtrada para o preparo da solução de espermatozóides. A atividade dos mesmos foi verificada em microscopia óptica sob um aumento de 200x e a solução foi conservada em geladeira até o momento do uso. A fecundação foi realizada pela adição de 1ml da solução de espermatozóides à solução de óvulos.

As amostras testadas de peçonha bruta e extrato total foram empregadas em escala logarítmica ou em concentração arbitrária em placas de 24 poços. A elas foi adicionada a solução de ovos fecundados perfazendo um volume final de 1ml. As placas foram mantidas a uma temperatura de 23° C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com agitação constante. Após a primeira clivagem observada no controle (fig.8), em todas as soluções testadas foi adicionado 1ml de formol 2%, para que as divisões celulares

fossem interrompidas. De cada amostra fixada foram contados 100 embriões, obtendo-se assim a porcentagem de inibição mitótica para cada amostra.

Figura 7 - Local da injeção de KCl 0,5 M em *L. variegatus*, aplicada próxima a região do órgão raspador (lanterna de Aristóteles).

Figura 8 - Primeira clivagem em ovos de ouriço (controle), momento no qual 1ml de formol 4% é adicionado para interromper o processo de mitose.

Indução de Hiperálgia por Carragenina

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 160 e 180g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12:12h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos.

Para indução de hiperálgia foi utilizado a carragenina, um polissacarídeo extraído de alga, que induz uma resposta inflamatória característica, multimedida, com presença de edema e hiperálgia.

A carragenina foi empregada em uma concentração de 100µg/pata, diluída em 50µl de salina estéril. Tanto carragenina quanto peçonha bruta foram injetadas na área subplatar de uma das patas posteriores do rato. A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada antes e em diversos tempos após a injeção do irritante. Animais injetados com tampão PBS, por via intraplantar (i.pl), foram utilizados como controles.

Avaliação da sensibilidade dolorosa:

Para avaliação da sensibilidade dolorosa foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957) (fig.9).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após a administração dos agentes hiperalgésicos (carragenina e peçonha bruta).

Os resultados foram analisados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais.

Figura 9 - Aparelho utilizado na medição de hiperalgesia na pata de ratos descrito por Randall e Sellito (1957).

Nocicepção Induzida por Formalina

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 18 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12:12h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos.

Para avaliar o efeito nociceptivo da peçonha de *M.philippina* no teste de formalina, 20 μl de peçonha bruta (153 μg) foram injetados, em camundongos, por via subcutânea no dorso da pata posterior direita. Para controle positivo foi utilizada solução de formalina a 1% e para controle negativo tampão PBS (pH 7,4). Os camundongos foram colocados imediatamente em caixas transparentes posicionadas em frente a um espelho, de maneira a facilitar a observação quantitativa do comportamento nociceptivo por meio da contagem do número de “flinches” da pata tratada. Os resultados foram avaliados em duas fases distintas. Na primeira fase ou fase neurogênica, as medidas foram obtidas durante o período de 0 a 10 minutos, a segunda fase ou fase inflamatória corresponde às medidas obtidas no período de 20 a 40 minutos.

Produção Intracelular de Óxido Nítrico (NO) em Células Endoteliais

O isolamento de células endoteliais da microcirculação foi realizado segundo protocolo adaptado de Chen *et al.* (1995) e descrito por Lotufo *et al.*

(2006). Os ratos foram anestesiados com inalação de éter e sacrificados por decapitação. O animal foi banhado em etanol 70% e os tecidos (cremaster) retirados em ambiente estéril. Os tecidos foram lavados em PBS (composição: NaCl 125mM, Na_2HPO_4 2mM, NaH_2PO_4 2 mM e KCl 5mM) e cortados em pequenos pedaços (aproximadamente 2 x 2 mm). Em cada um dos poços de placa de 24 poços foram colocados 2 pedaços. Após um período de alguns minutos (2–5min) os tecidos foram cobertos com 700µl de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (20%). As placas foram mantidas em estufas (37°C, 5% CO_2) e os tecidos retirados após 48 horas. Segundo os autores, apenas células sanguíneas e endoteliais deixam o tecido neste período, e as células sanguíneas são excluídas após troca de meio e uma ou duas passagens (CHEN *et al.*, 1995). As células foram subcultivadas utilizando a enzima pancreatina (1:10), que é menos agressiva às células do que a tripsina.

Avaliação da Concentração de NO Intracelular através de Microscopia Confocal

As células endoteliais (1^a e 2^a passagens) foram plaqueadas em lamínulas de vidro em placas próprias para microscopia confocal (200µL, aproximadamente 10⁵ células/ ml) e mantidas por 48 horas em estufa (37°C, 5% CO_2). Após esse período as células foram lavadas com solução PSS suplementada com L-arginina (100µM). Foram adicionados às placas 180µl de peçonha bruta nas concentrações de 30, 50 e 140 µg/placa (n=3). As placas foram novamente incubadas (37°C, 5% CO_2) por um período de 2 horas, onde 50min antes do termino da incubação 20µl

do indicador de NO DAF-FM diacetato, na concentração de 5 μ M, foram adicionados as placas. Após o termino do período de incubação as placas foram lavadas por 2 vezes e os níveis de NO intracelular observados por microscopia confocal.

Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo no comprimento de onda de 488nm e um filtro para emissão em 515-530nm. Foram selecionados campos contendo aproximadamente 3-5 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliada através do programa LSM 510.

Após cada um dos experimentos, foi adicionado 1 mM de nitroprussiato de sódio (doador de NO) às células endoteliais, como um controle positivo de carregamento e produção de NO.

Análise estatística

Para os ensaios em eritrócitos de camundongos as análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância two-Way ANOVA, associado ao teste de Bonferroni. Nos ensaios de indução de hiperalgesia por carragenina e nocicepção induzida por formalina o mesmo método foi utilizado, porém associado ao teste de Tukey. As análises para o ensaio de produção de NO em células endoteliais foram realizadas através do método One-Way ANOVA associado ao teste de Newman-Keus.

RESULTADOS

Métodos de Obtenção da Peçonha

Os dois métodos previamente descritos na seção anterior foram analisados sob microscopia óptica para análise de sua eficiência na extração da peçonha dos nematocistos. As figuras abaixo mostram os resultados obtidos pelo método da estimulação elétrica, método nunca testado antes em hidróides colônias bentônicos. Claramente podemos observar as colônias de *M. philippina* em duas situações distintas: a primeira, antes da estimulação, com seus nematóforos repletos de nematocistos intactos; e a segunda, após a estimulação com os nematocistos presentes nos nematóforos completamente evertidos (fig.10), comprovando assim a eficiência do método. Um ponto importante observado durante o desenvolvimento do método, é que a passagem dos eletrodos pelos fragmentos da colônia pode ocasionar a destruição de alguns gastrozoóides, contaminando assim a peçonha obtida com substâncias endógenas. Essa contaminação é relativamente pequena e parece não ter efeito nos ensaios realizados.

Figura 10 - Microscopia óptica de fragmentos das colônias de *M. philippina*. Em A e B, pólipos antes da estimulação em aumentos de 100x e 400x respectivamente. Em C e D, pólipos após a estimulação elétrica, sob aumentos de 100x e 400x respectivamente. Na figura B, os nematóforos (D) e os gastrozoóides (G).

A eficiência do método da homogeneização também foi comprovada pela visualização de nematocistos evertidos assim como pela presença de fragmentos de cápsulas e túbulos (fig.11)

Figura 11 - Microscopia óptica do extrato total de colônias de *M. philippina*. As setas indicam as cápsulas rompidas dos nematocistos (N) pelo método de extração.

Métodos de Purificação da Peçonha

Na tentativa de se purificar e isolar as toxinas presentes nos nematocistos de *M. philippina*, tanto peçonha bruta quanto extrato total foram submetidos ao processo de purificação por gel-filtração. Os cromatogramas obtidos pelo fracionamento mostraram algumas diferenças. O número de picos assim como tempo de eluição deles variou entre os métodos e obtenção da peçonha, indicando uma diferença substancial de composição entre eles. Estas diferenças podem ser melhor observadas abaixo (fig.12 e 14).

Figura 12 - Representação do cromatograma da peçonha bruta de *M. philippina* em coluna de gel filtração, fluxo de 2,5ml/min. As frações (eixo X) são recolhidas por tempo (8 min). As frações coletadas estão representadas pelos traços pretos.

O cromatograma obtido do fracionamento da peçonha bruta mostra a eluição de dois grupos distintos de moléculas. O primeiro grupo (pico pequeno) foi denominado fração I (Fr I) e o segundo (pico maior) denominado fração II (Fr II). A fração II, porção majoritária da peçonha bruta é a fração na qual se esperaria encontrar algum tipo de atividade, e é também onde todo o sal da amostra é eluído. Devido a esse fato essa fração atingiu uma salinidade extrema (acima de 160%), impedindo a realização dos ensaios farmacológicos sem que o sal fosse removido.

Para remoção do sal da fração II a estratégia utilizada foi a sua passagem em HPLC de fase reversa (fig.13)

Figura 13 - Cromatografia em HPLC de fase reversa da fração II da peçonha bruta de *M. philippina* e suas sub-frações (P1a, P1b, P2 e Pm). A coleta das subfrações foi feita por tempo. O traço verde indica a concentração de acetonitrila.

O cromatograma em HPLC gerou quatro subfrações, P1a, P1b, P2 e Pm, e todas foram testadas em três ensaios farmacológicos; hemólise em eritrócitos de camundongo, injeção hemocélica em *C. danae* e citotoxicidade em ovos de ouriço. Nenhum resultado positivo foi obtido nesses testes.

O cromatograma obtido pela passagem do extrato total mostrou maior heterogeneidade de moléculas, sendo estas agrupadas em cinco frações. Todas essas frações foram coletadas concentradas e submetidas aos mesmos testes aplicados à peçonha bruta, e assim como ela nenhum resultado positivo foi obtido.

Cromatograma do extrato de *Macrorhynchia philippina*

Figura 14 - Representação do cromatograma da peçonha bruta de *M. philippina* em coluna de gel filtração, fluxo de 2,5ml/min. As frações (eixo X) são recolhidas por tempo (8 min). As frações coletadas estão representadas pelos traços pretos.

Todas as frações obtidas a partir dos processos de purificação se mostraram inativas tanto para peçonha bruta quanto para o extrato total. Essa foi considerada uma forte evidência que as toxinas de *M. philippina* são sensíveis a esses processos ou são muito instáveis para serem submetidas aos mesmos. A partir de então todos os testes foram realizados com extrato total e peçonha bruta não processados.

Hemólise em Eritrócitos de Camundongos

O extrato total foi testado em cinco concentrações diferentes: 900, 600, 450, 300 e 150µg/ml. Os resultados obtidos mostram claramente uma atividade dose-dependente do extrato total sobre os eritrócitos de camundongos, com EC₅₀ de 268,4µg/ml. Partindo do princípio que as toxinas eram instáveis, testes em diferentes dias foram realizados para verificar a perda de atividade das mesmas e os resultados obtidos comprovaram o que antes era uma suspeita (fig.15). O extrato total perdeu quase que totalmente sua atividade em apenas 15 dias, reduzindo sua atividade para um valor de 17, 4% na concentração máxima testada.

Atividade Hemolítica do Extrato Total de *M. philippina*

Figura 15 - Atividade hemolítica do extrato total. Cada ponto representa a atividade hemolítica (% média, $\pm$ EPM) correspondente a cada concentração testada (n mínimo de 6 para cada ponto). Significância mínima ($p < 0,05$) foi obtida nos pontos intermediários das curvas. Nos pontos mínimos e máximos a diferença frequentemente não foi significativa ($p > 0,05$).

Uma outra maneira utilizada para demonstrar a perda de atividade do extrato total foi o cálculo das EC_{50} de todos os dias testados. Apenas nos três primeiros dias esse valor pode ser calculado, pois nos últimos dois dias as porcentagens alcançadas pelos valores máximos do extrato total foram muito baixas. Os valores obtidos, $EC_{50\text{Dia}1} = 268,4 \mu\text{g/ml}$, $EC_{50\text{Dia}2} = 369,6 \mu\text{g/ml}$ e $EC_{50\text{Dia}4} = 661,6 \mu\text{g/ml}$, juntamente com a comparação nos gráficos abaixo (fig.16 e 17), salienta a perda de atividade observada e mostra que existe uma perda de potencial tóxico do extrato total da ordem de 37,7% do primeiro dia para o segundo.

Figura 16 - EC₅₀ do extrato total de *M. philippina*. Pontos representam a atividade hemolítica (% média, ± EPM) correspondente a cada concentração testada (n=10).

Figura 17 - EC₅₀ do extrato total de *M. philippina* após 24 horas da extração da peçonha. Pontos representam a atividade hemolítica (% média, ± EPM) correspondente a cada concentração testada (n=10).

A comparação entre os dois métodos de obtenção da peçonha indica uma grande diferença de atividade entre peçonha bruta e o extrato total (fig.18). Para essa comparação foi utilizado o extrato total com 8 dias, pois esse foi o tempo necessário para o preparo da peçonha bruta para os testes hemolíticos. Os valores máximos de atividade hemolítica obtidos para ambas as amostras a 600µg/mL, aproximadamente 50% para o extrato total e 6% para peçonha bruta, indicam fortemente que não há presença de citolisinas na peçonha bruta.

Figura 18 - Comparação da atividade hemolítica entre extrato total e peçonha bruta. Pontos representam a atividade hemolítica (% média, $\pm$ EPM) nas concentrações testadas, (n=10 para PeB e N= 6 para ExT). Nas duas concentrações mais altas $p < 0,001$ e nas mais baixas $p > 0,05$.

Injeção Hemocélica em *Callinectes danae* (Siri-Azul)

Peçonha bruta e extrato total foram testados em três concentrações diferentes, 20, 35 e 50µg/g. Para cada concentração foi utilizado um grupo de 4 indivíduos, perfazendo um total de 12 indivíduos para cada método de obtenção da peçonha.

Nas concentrações mais baixas, 20µg/g, para ambos os métodos, não se pôde verificar nenhum tipo de efeito, porém nas concentrações mais altas, 35 e 50µg/g, fica clara a diferença de composição química entre eles. O extrato total apresentou efeito positivo em todos os 8 indivíduos testados, com sintomas que vão desde paralisia e dificuldade de retorno a posição normal (n=3) até morte (n=5). Diferentemente dos efeitos observados com extrato total, a peçonha bruta apresentou apenas 3 resultados positivos nos oito indivíduos testados, nos quais o sintoma observado foi morte rápida (em menos de 30 minutos).

Tabela 1. Resultados obtidos nos ensaios de injeção hemocélica em *C. danae*.

		Concentração (µg/g)			
		20	35	50	Total
Amostras	ExT	4A	1M - 3D	4M	8
	PeB	4A	2A - 2M	1M - 3A	3

Legenda - A= assintomático, D= dificuldade de retorno à posição normal, ou não retorno à posição normal, M= morte. Para cada grupo testado n=4. Última coluna representa o número total de efeitos considerados positivos.

Observando a tabela podemos perceber que o extrato total atua de maneira dose-dependente: na concentração intermediária, de 35µg/g, causou um efeito paralisante progressivo, levando à morte apenas um dos indivíduos testados no período de duas horas, enquanto que na concentração mais alta, 50µg/g, esse efeito levou todos os indivíduos à morte em uma hora e meia.

De maneira diferente os efeitos positivos causados pela peçonha bruta não parecem obedecer tal padrão. Duas mortes ocorreram na concentração intermediária, 35µg/g, e apenas uma na concentração mais alta e, ao contrário do observado com o extrato total, as mortes foram rápidas e não causadas por um efeito paralisante progressivo.

Citotoxicidade em Ovos de Ouriço (*L. variegatus*)

Os testes realizados em ovos de ouriço demonstraram a evidência de um potente efeito antimitótico presente no extrato total, com apenas 50µg/ml inibindo 70% das mitoses nos ovos de ouriços (fig.19). Apesar desse resultado interessante, outra característica marcante foi observada; a rápida perda da atividade do extrato total. Em apenas 24 horas a uma temperatura de – 20°C houve perda total da atividade antimitótica (fig.20). Esse resultado leva a crer que o efeito causado pelo extrato total nesse experimento seja devido a uma toxina diferente daquela observada nos ensaios hemolíticos e neurotóxicos. Outros testes em concentrações diferentes foram feitos na tentativa de se obter uma curva dose-resposta, mas tamanha é a instabilidade da molécula que os

resultados obtidos não foram reprodutíveis e, os dados mostrados abaixo apenas evidenciam seu efeito.

A peçonha bruta também foi testada em concentrações variadas, de 20 a 100µg/ml e, como esperado, devido ao tempo gasto no preparo da mesma, nenhum resultado positivo foi obtido.

Figura 19 - Atividade antimitótica causada pelo extrato total de *M. philippina* obtido momentos antes do ensaio. As barras indicam a % de inibição mitótica em relação ao controle (n=1).

Figura 20 - Atividade antimitótica causada pelo extrato total de *M. philippina* obtido 24 horas antes do ensaio. As barras indicam a % de inibição mitótica em relação ao controle (n=1).

Indução de Dor e Hiperalgesia

Os testes de limiar de dor e inflamação foram realizados apenas com a peçonha bruta. Dois modelos clássicos foram utilizados para comparar os efeitos obtidos pela peçonha bruta, hiperalgesia induzida por carragenina e nocicepção induzida por formalina.

A injeção de 382,5µg de peçonha bruta na pata de ratos apresentou um padrão completamente diferente daquele apresentado pela carragenina (fig.21). Enquanto a carragenina apresentou o patamar de hiperalgesia após 3 horas de injeção, a peçonha bruta apresentou uma ação muito mais rápida, atingindo seu patamar em apenas 1 hora ($p < 0,001$). Outra observação importante a ser feita é a

duração do efeito hiperalgésico. Nos animais injetados com carragenina, depois de atingido o patamar, o efeito hiperalgésico progressivamente diminuiu, voltando a valores próximos do controle em um período de 24 horas. Já nos animais injetados com a peçonha bruta esse patamar se manteve relativamente estável durante um período de 4 horas, após o qual, perdeu progressivamente seu efeito em um período de 24 horas.

Figura 21 - Comparação entre a hiperalgesia causada pela carragenina em vermelho e a peçonha bruta em azul. Pontos representam limiar nociceptivo (média $\pm$ EPM) ao longo de 24 horas (PeB n=5 e carragenina n=3). *P<0,05 para comparação de medidas obtidas num mesmo tempo.

Assim como no teste da carragenina, o teste com formalina 1% também apresentou algumas diferenças substanciais quando comparado ao da peçonha bruta (fig.22). A formalina apresentou duas fases distintas de indução de dor, representadas pelos dois picos em vermelho no gráfico abaixo: o primeiro, logo

após a injeção, e o segundo, entre 15 e 30 minutos. A peçonha bruta apresentou apenas uma fase de indução de dor que, apesar de um pouco mais prolongada foi menos intensa.

Figura 22 - Comparação entre a nocicepção induzida pela formalina em vermelho e a peçonha bruta em azul. Pontos representam número de flinches (média $\pm$ EPM) ao longo de 50 minutos (PeB n=5). *P<0,05 para comparação de medidas obtidas num mesmo tempo.

Produção intracelular de NO em Células Endoteliais

A peçonha bruta foi testada em três concentrações diferentes, 150, 250 e 700µg/mL feitas as devidas correções de concentração por placa, e o resultado pode ser observado no gráfico abaixo (fig.23).

Produção de NO induzida pela Peçonha Bruta de *M. philippina*

Figura 23 - Efeito da peçonha bruta na produção de NO em células endoteliais de ratos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM dos valores em porcentagem de fluorescência emitida pelo marcador de NO. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$)

Como pode ser observado no gráfico, a peçonha bruta gerou um efeito dose-dependente na liberação de NO em células endoteliais, atingindo, na concentração máxima, um aumento de produção de NO próximo a 250% em relação ao controle ($p<0,001$). As análises estatísticas mostraram, por mais característico que possa parecer o efeito dose-resposta obtido, uma significância limítrofe entre as duas concentrações mais altas (250 e 700µg/mL), o que sugere

que os valores máximos de produção de NO obtidos pela peçonha bruta sejam causados por concentrações próximas a 250µg/mL. Essa significância limítrofe pode ser melhor observada na figura abaixo (fig.24):

Figura 24 - Imagem representativa em microscopia confocal do aumento da produção de NO em células endoteliais induzido pela peçonha bruta. (A) controle, (B) PeB 150µg/ ml, (C) PeB 250µg/ml e (D) PeB 700µg/ml

DISCUSSÃO

Métodos de obtenção da peçonha

Os nematocistos são organelas relativamente grandes, seu tamanho varia de 20 a 200µm e podem ser facilmente vistos sob microscopia óptica. Dessa maneira sua eversão, ou o rompimento de sua cápsula, podem ser acompanhados e avaliados para determinação da eficiência dos métodos.

O método da homogeneização se baseia na maceração do animal como um todo ou de fragmentos dele, é um processo estritamente físico que causa o rompimento das membranas celulares e de suas organelas. Sua eficiência já está mais do que comprovada, não somente pelos dados apresentados por esta dissertação, mas pelas longas décadas de uso dessa técnica (ENDEAN; HENDERSON, 1969; MIDDLEBROOK *et al.*, 1971; WITTLE *et al.*, 1971; LONG-ROWE; BURNETT, 1994; WINTER *et al.*, 2000).

Apesar de eficiente, o problema inerente a essa técnica é que, juntamente com a peçonha obtida dos nematocistos do animal, um grande número de moléculas endógenas provenientes de “tecidos não nematocísticos” está presente no extrato. Como o principal objetivo no estudo toxinológico com cnidários é a caracterização e isolamento das toxinas presentes nessa organela, a presença de outras moléculas endógenas impossibilita a confirmação de que o efeito gerado seja causado exclusivamente pelas toxinas presentes nos nematocistos. Tal fato é comprovado nos estudos realizados com tentáculos de *C. fleckri* (Cubozoa)

(ENDEAN; HENDERSON, 1969; KEEN, 1972; ENDEAN *et al.*, 1993), onde foi detectada a existência de toxinas nos tecidos ao redor dos cnidócitos, assim como em cifozoários (MARIOTTINI *et al.*, 2002) e com o hidrozoário *Chlorohydra viridissima*, onde uma potente citolisina formadora de poro foi isolada da epiderme da cavidade gastrovascular desse animal (SHER; ZLOTKIN, 2009).

A estimulação elétrica, ao contrário do método da homogeneização, é um método mais “limpo”, tanto no sentido analítico, por estimular a liberação de toxinas presentes apenas nos nematocistos, quanto no sentido ecológico, onde os animais submetidos ao método podem ser devolvidos ao mar ou reutilizados após certo tempo. O uso de estímulos elétricos já possui registros desde a segunda metade do século XX para obtenção da peçonha de cnidários (KLINE, 1961) e, em nosso laboratório foi usado no início da década de 90 e padronizado por Malpezzi *et al.*, (1993). Essa metodologia nunca havia sido testada para hidróides coloniais bentônicos como *M. philippina*, mas se mostrou eficiente com apenas algumas alterações no procedimento. Sua eficiência se deve ao fato de que os cnidócitos estão intimamente associados com a rede neuronal que passa logo abaixo da epiderme desses animais (ANDERSON; BOUCHARD, 2009), assim como a outros cnidócitos e células sensoriais (OLIVER *et al.*, 2008) e servem tanto como elementos pré-sinápticos quanto elementos pós-sinápticos. Contudo, não se pode excluir a possibilidade da presença de substâncias endógenas na peçonha obtida através desse método tendo em vista as observações feitas durante o período de desenvolvimento do método.

Apesar da eficiência observada e comprovada da eversão dos nematocistos e conseqüente obtenção da peçonha de *M. philippina* em ambos os métodos, a

quantidade de peçonha obtida foi muito pequena, especialmente para a estimulação elétrica, o que dificultou em muito os estudos realizados com essa espécie.

Métodos de Purificação e Estabilidade da Peçonha

Toxinas podem ser moléculas extremamente lábeis e, dentre as quatro classes de cnidários citadas nesse estudo, apenas a Classe Anthozoa possui um grande número de toxinas isoladas e caracterizadas (SUPUT, 2009). Nas outras três Classes são freqüentes os relatos de perda de atividade encontrados na literatura. O principal problema é o tempo, pois mesmo congeladas após serem liberadas do nematocisto, algumas toxinas perdem sua atividade gradativamente. Endean (1987), registrou a perda gradativa da atividade do extrato dos tentáculos do cubozoário *C. fleckri* dentro de 2 a 3 dias, mesmo com todos os procedimentos sendo realizados a uma temperatura de 5°C, e a perda total da atividade letal contra camundongos dentro de 5 dias mesmo com seu armazenamento a -20°C. Marino *et al.* (2004), semelhantemente, demonstrou a perda quase total da atividade do extrato de *Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) num período de 5 dias mesmo quando armazenado a -20°C. Nos hidrozoários, um dos membros mais estudados dessa Classe, a hidra, possui toxinas extremamente lábeis em sua peçonha, o que faz com que a sua purificação, caracterização e identificação (sequenciamento) sejam processos extremamente difíceis de serem realizados (SHER; ZLOTKIN, 2009).

Processos de purificação de modo geral demandam muito tempo e possuem uma limitação na quantidade de amostra que pode ser injetada. A soma desses fatores pode levar estes processos a durarem dias ou até mesmo semanas para que quantidades de amostras significativas sejam obtidas para análises e ensaios posteriores, assim, exigindo que as toxinas submetidas a esses processos sejam relativamente estáveis.

Os ensaios realizados com as frações obtidas do extrato total e da peçonha bruta pelos métodos de gel-filtração e HPLC mostram que as toxinas presentes em ambos os métodos de extração não possuem tal estabilidade, pois nos três testes aos quais foram submetidos, citólise, neurotoxicidade e citotoxicidade, todas as frações coletadas não apresentaram nenhum tipo de resultado positivo. Tal fato foi confirmado posteriormente pelos testes farmacológicos realizados com o extrato total e a peçonha bruta não processados.

O exemplo mais claro pôde ser visto durante o teste em ovos de ouriço, onde o extrato total perdeu completamente sua atividade antimitótica em um período de 24 horas, mesmo quando armazenado a uma temperatura de -20°C. Na realidade, a toxina, ou toxinas responsáveis por esse efeito se mostraram tão instáveis que foi impossível a constituição de um padrão de ação com construção de curva dose-resposta e determinação da sua EC₅₀, fazendo assim, com que os dados obtidos nesse teste tenham um caráter apenas preliminar.

A perda de atividade também pôde ser observada nos testes com eritrócitos de camundongos. Os resultados mostrados nesse teste comprovam a existência de uma molécula com um caráter um pouco mais estável do que aquele citado no teste anterior. Contudo, esta molécula também apresentou uma redução de

potencial tóxico de aproximadamente 38% quando comparadas as EC₅₀ do primeiro e do segundo dia, e uma perda quase total de atividade no período de dezesseis dias.

Apesar da perda de atividade mostrada pelo extrato total, os efeitos mais intrigantes demonstrados nesse contexto foram obtidos pela peçonha bruta, ou na realidade, pela ausência desses efeitos. O que passou mais próximo se ser considerado um efeito positivo foram os dados obtidos no teste neurotóxico em *C. danae*, onde três mortes foram atribuídas ao seu efeito. Porém a distribuição dessas mortes, duas na concentração intermediária e uma na concentração máxima, e as concentrações utilizadas, que são consideradas extremamente altas, indicam que estas mortes provavelmente decorreram de erros no procedimento de injeção da amostra ou por debilidade prévia dos indivíduos testados.

Contudo, além do tempo, outros fatores ainda podem influenciar na estabilidade das toxinas, alguns óbvios como temperatura (TORRES *et al.*, 2001; UECHI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006a) e pH (WINTER *et al.*, 2007), e outros não tão óbvios como ciclos de congelamento, liofilização e tipo de solução diluente utilizada.

Endean (1987) demonstrou que a utilização do tampão fosfato 0,3 M mantém a atividade das toxinas de *C. fleckri*, enquanto que a utilização de tampão Tris-HCl 0,3 M (pH 7,4) fez com que toda atividade fosse perdida em duas horas. O acetato de amônio, eluente comumente utilizado em gel-filtração, também pode influenciar na atividade das toxinas, não no seu tempo de atividade, mas sim no seu potencial tóxico (COMIS *et al.*, 1989). Baxter e Marr (1969), registraram perda

de 50% da atividade das toxinas de *C. fleckeri* após três ciclos de congelamento da peçonha.

Para a peçonha obtida de *M.philippina* o principal fator atuante na perda de atividade das toxinas parece ser o tempo. Ressuspensões das frações em água destilada e tampão PBS (pH 7,4), assim como a troca do eluente durante os processos fracionamento por gel-filtração, de acetato de amônio por PBS, produziram frações igualmente inativas. O trabalho com o extrato total em diferentes dias e com diferentes ciclos de congelamento também parece não ter influenciado na atividade do mesmo. Apesar de nenhum desses testes ter sido devidamente registrado ou estudado com maior profundidade, este é um forte indício de que esses fatores não possuem influência na atividade da peçonha.

Comparação entre Extrato Total e Peçonha Bruta

O primeiro fator que devemos levar em conta quando pensamos na comparação entre os dois métodos de obtenção é o que representa cada amostra extraída: extrato total e peçonha bruta.

O extrato total representa um grupo mais heterogêneo de moléculas, sendo formado por uma maioria de moléculas endógenas do animal e uma pequena porção de toxinas presentes nos seus nematocistos. Já a peçonha bruta representa exatamente o oposto, é um grupo mais homogêneo de moléculas como mostrado pelos cromatogramas obtidos por gel-filtração, e é formado em sua totalidade, ou em sua maioria absoluta, por toxinas provenientes dos

nematocistos, já que não se pode garantir que a integridade de todos os pólipos (gastrozoóides) tenha sido mantida durante a execução do método.

Dessa maneira, o que se esperaria ver nos testes utilizados para essa comparação é uma atividade muito mais acentuada da peçonha bruta em relação ao extrato total. Contudo, os resultados obtidos contrariaram essa lógica. Três testes foram utilizados para essa comparação: hemólise em eritrócitos de camundongo, injeção hemocélica e citotoxicidade em ovos de ouriço; e nos três testes o que se viu foi exatamente o oposto do esperado, com a atividade do extrato total sendo mais acentuada do que atividade da peçonha bruta. Em verdade, poder-se-ia dizer que todos os ensaios realizados com a peçonha bruta deram negativo se levássemos em conta os erros de pipetagem, a sensibilidade dos métodos e os possíveis resquícios de moléculas endógenas presentes na amostra.

Diante dessas observações, os resultados nos levaram a duas conclusões: a primeira é o indicativo claro da presença de uma toxina de origem “não nematocística”, e a segunda é a alta instabilidade, ou mesmo a ausência de toxinas nos nematocistos que possam produzir efeitos positivos nos ensaios realizados.

Com relação à primeira conclusão, muitos relatos já foram feitos sobre toxinas em tecidos não relacionados aos nematocistos (BLOOM *et al*, 1998; MARIOTTINI *et al*, 2002), mas um deles merece maior atenção nessa discussão. Um estudo realizado com a espécie *Hydra viridissima* (ZHANG *et al.*, 2003) mostrou a presença de uma toxina, denominada hidralisina, produzida por células epiteliais da gastroderme desses animais. Essa toxina apresentou atividades

hemolíticas e neurotóxicas e foi caracterizada posteriormente como sendo uma citolisina pertencente ao grupo das β -perforinas (SHER *et al.*, 2005b).

O extrato total de *M. philippina* apresentou uma ação semelhante, produziu hemólise em eritrócitos de camundongos e um efeito paralisante em *C. danae*, sugerindo assim a presença de uma citolisina nesse extrato. As proteínas citolíticas formam uma importante parte do inventário tóxico dos cnidários. Elas atacam e se introduzem nas membranas celulares formando poros transmembrânicos, os quais eficientemente rompem as membranas celulares (KRISTAN *et al.*, 2009). Essas toxinas são encontradas em todas as classes de cnidários podendo causar efeitos sistêmicos como paralisia e dor (SHER *et al.*, 2005b). Apesar desse importante papel na captura de presas, não foi detectada a presença dessas toxinas nos nematocistos de *M. philippina*, o que sugere a possibilidade dessa toxina estar envolvida na digestão das presas capturadas por esse animal assim como a hidralisina (SHER; ZLOTKIN, 2009).

Com relação à segunda conclusão, se deixarmos de lado as análises farmacológicas e nos focarmos na morfologia e hábito alimentar desse animal, veremos que a espécie *M. philippina* é formada por colônias muito pequenas, não ultrapassando geralmente 12cm de altura (MIGOTTO, 1993), e compostas por milhares de pólipos extremamente pequenos que só podem ser vistos ao microscópio óptico. Seguindo esse raciocínio, é muito provável que esses animais sejam suspensívoros, ou seja, se alimentem de zooplânctons presentes na coluna de água, e que para isso por motivos óbvios, não precisem utilizar potentes citolisinas, e muito menos neurotoxinas para capturarem suas presas.

Partindo desse pressuposto, e adicionando a isso o fato de que o contato com esses animais gera uma sensação de dor forte, aguda e localizada, facilmente podemos hipotetizar que as toxinas presentes nos nematocistos de *M. philippina* possam ser única e exclusivamente utilizadas para defesa do animal.

A partir dessa hipótese, três ensaios com a peçonha bruta foram realizados na tentativa de comprová-la: indução de hiperalgesia por carragenina, indução de dor por formalina e produção de NO em células endoteliais. Os dois primeiros ensaios têm a função de comparar os efeitos da peçonha bruta com dois modelos clássicos de hiperalgesia por inflamação (carragenina) e indução de dor (formalina), enquanto que o último foi utilizado para verificar de fato a existência de moléculas na peçonha bruta que possam atuar diretamente em receptores específicos de células e gerar processos inflamatórios.

Análise da Peçonha Bruta

Indução de Hiperalgesia por Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo extraído de alga que induz uma resposta inflamatória característica, multimedida, com a presença de edema e hiperalgesia. A carragenina age de maneira lenta, atingindo o patamar de sensibilização do tecido, três horas após a injeção e retornando aos valores de controle em 24 horas. A sua cinética já é bem conhecida na literatura, ela age de maneira indireta no processo inflamatório induzindo hiperalgesia através da

liberação de uma cascata de citocinas, por células migrantes ou residentes do tecido, e iniciada pela produção de bradicinina (Cunha *et al.*, 2004).

O resultado observado na comparação entre a carragenina e a peçonha bruta sugere um mecanismo de ação diferente, pelo menos em parte, entre os dois. Como dito anteriormente, a carragenina age indiretamente através da indução da liberação de uma cascata de citocinas, e isso pode ser observado nos resultados pela lenta e progressiva sensibilização do tecido até que o patamar seja atingido. Em contra partida, a peçonha bruta agiu de maneira muito mais rápida, atingindo o patamar de sensibilização logo na primeira medição realizada (1 hora). Essa rápida sensibilização geralmente é atribuída a moléculas que agem diretamente na fibra nervosa e, dessa maneira, induzem dor. A manutenção do patamar hiperalgésico mostrado também é um indício de que as substâncias presentes na peçonha bruta possam agir induzindo a liberação de citocinas, porém, não necessariamente através dos mesmos mecanismos que a carragenina.

Nocicepção Induzida por Formalina

Para verificar a existência de uma substância que aja diretamente na fibra nervosa como sugeriram os resultados nos ensaios com carragenina, a ação da peçonha bruta foi comparada ao modelo de dor manifesta induzida pela administração tópica de formalina.

Injeções subcutâneas de formalina na pata posterior de camundongos promovem uma série de comportamentos estereotipados. Dentre eles temos os

“flinches”, parâmetro utilizado para avaliar a sensação dolorosa induzida pela peçonha da *M. philippina* nesse ensaio. O flinche consiste na elevação e encolhimento da pata tratada e é considerado um parâmetro real de dor (TAYLOR *et al.*, 1995). A resposta nociceptiva à formalina ocorre em duas fases distintas. A primeira fase ocorre logo após a injeção, com duração de 7 a 10min. É uma fase de dor aguda conhecida como fase neurogênica. A segunda fase ocorre logo após um breve período de descanso. Essa fase é conhecida como fase inflamatória e geralmente tem duração de 20 min, mas pode perdurar por até 1 hora (PARADA *et al.*, 2001).

A resposta aguda apresentada na primeira fase é resultado direto da ação da formalina nos receptores das fibras nervosas, enquanto que a segunda fase está associada com a liberação de mediadores endógenos locais como histamina e serotonina que sensibilizam as fibras nervosas (PARADA *et al.*, 2001).

Os dados apresentados nesse teste indicam que há na peçonha bruta uma molécula, ou moléculas, que interfere na sensibilidade nociceptiva dos animais, ou seja, podem agir diretamente nas fibras nociceptivas, as quais são responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo. Todavia, como apresentado na figura 20, não foi observada a presença do segundo pico. Deste modo podemos sugerir que a administração da peçonha bruta de *M. philippina* não induz a liberação de histamina e serotonina, que são neuromoduladores endógenos relacionados à segunda fase da dor manifesta induzida pela formalina.

Apesar da peçonha bruta não apresentar a segunda fase de indução de dor, o principal ponto a ser considerado nesse experimento, é a indução de dor da primeira fase, ou fase neurogênica. Esse é um forte indício de que esse animal

utilize seus nematocistos estritamente para defesa. Em se tratando de toxinas, induzir dor aparenta ser uma medida defensiva ideal, porém esse efeito não tem valor aparente na predação (CROMER; MCLNTYRE, 2007). Até o momento não existem relatos na literatura de toxinas de cnidários que ajam de maneira direta e agonística em receptores de dor. Um estudo realizado com o receptor de dor TRPV1 (CUYPERS *et al.*, 2006), mostrou que componentes da peçonha de cnidários potencializam a ação da capsaicina sobre esses receptores através da prevenção da dessensibilização dos mesmos. Contudo nenhuma ação direta desses componentes nos receptores TRPV1 foi demonstrada na ausência de capsaicina. Assim os dados obtidos nesse ensaio podem indicar a presença de uma nova categoria de toxinas presentes nos nematocistos de cnidários, responsável pela indução direta de dor nas fibras nervosas.

Produção de NO em Células Endoteliais

Esse foi o último ensaio realizado para análise da peçonha bruta e tinha como objetivo evidenciar a existência de substâncias que pudessem atuar desencadeando processos inflamatórios.

Durante uma infecção, as células endoteliais são um dos primeiros alvos para os patógenos circulantes na corrente sanguínea e estão altamente susceptíveis aos danos que podem ser causados por estes. Já foi comprovado que injúrias causadas a essas células provocam um grande aumento na liberação de óxido nítrico (NO), que é citotóxico e citostático (TAMURA *et al.*, 2009).

O NO pode ser sintetizado a partir de três isoformas da enzima NOS (sintase do óxido nítrico): duas isoformas constitutivas, a NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS); e uma isoforma induzível (iNOS). As células endoteliais expressam tanto eNOS quanto iNOS, sendo esta última responsável pelo aumento de NO durante os processos de infecção (TAMURA *et al.*, 2009). O aumento da produção de NO causado pela peçonha bruta sugere que ela contenha substâncias que interajam com receptores de membranas das células endoteliais de maneira semelhante ao LPS, um lipopolissacarídeo que é o componente majoritário da parede celular de bactérias gram-negativas (TAMURA *et al.*, 2009). O LPS se liga a receptores TLR4 presentes na membrana das células endoteliais, e ativa a expressão da iNOS através de uma série de reações em cadeia. A ativação da expressão da iNOS é caracterizada pelo aumento extremo na produção de NO (aproximadamente 200% em relação ao controle) como já foi registrado para o LPS (TAMURA *et al.*, 2009) e demonstrado agora pela ação da peçonha bruta. Apesar das semelhanças com o LPS outras análises seriam necessárias para se avaliar a ação da peçonha bruta de forma definitiva. O aumento da produção de NO pela eNOS também não pode ser descartado, porém parece improvável, pois essa enzima depende do aumento intracelular de Ca^{+2} por agonistas como bradicinina, histamina, carbachol e ATP. Essas moléculas geram aumentos rápidos e que dificilmente atingem valores de produção de NO nas células endoteliais acima de 20% (TAMURA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

M. philippina é uma espécie interessante do ponto de vista toxinológico. As análises realizadas com os dois métodos de obtenção de peçonha mostram uma marcante diferença de composição entre eles. Os resultados sugerem a presença de uma ou mais toxinas, no extrato total, não relacionadas aos nematocistos. Provavelmente uma citolisina formadora de poros, cuja ação poderia ser responsável pelo efeito neurotóxico e hemolítico observados. Já na peçonha bruta, essas toxinas parecem estar envolvidas em processos inflamatórios e de indução de dor. Essas diferenças, provavelmente, refletem o estilo de vida dessa espécie, onde as toxinas presentes no extrato total ocupariam um papel fundamental nos processos digestivos do animal, enquanto que as toxinas presentes na peçonha bruta preencheriam o papel de defesa da colônia. Apesar das evidências citadas, muitos outros ensaios seriam necessários para que se comprovasse de fato o papel dessas toxinas na fisiologia do animal. O primeiro passo a ser dado nessa direção seria a purificação do material, porém como relatado nessa dissertação, essa é uma tarefa extremamente árdua devido à instabilidade e a quantidade de toxinas obtida nos métodos de extração. Mesmo através do desenvolvimento de um método eficiente de extração da peçonha diretamente dos nematocistos de *M. philippina* (adaptado de Malpezzi *et al.*, 1993), as quantidades obtidas de peçonha questionam a viabilidade desses processos.

Assim como em *M. philippina*, muitos outros cnidários compartilham as mesmas dificuldades de trabalho, o que reflete a necessidade do desenvolvimento

de novas técnicas de purificação assim como a descoberta de novas substâncias que possam atuar na estabilização dessas toxinas. Dessa maneira, esse importante grupo poderá ser estudado com maior profundidade sob o ponto de vista toxinológico e poderá revelar todo o potencial farmacológico de suas toxinas.

BIBLIOGRAFIA

- BAXTER, E. H.; MARR, A. G. M. Sea wasp (*Chironex fleckeri*) venom: letal, hemolytic and dermonecrotic properties." **Toxicon**, 07: 195-210, 1969
- BLOOM, D.A.; BURNETT, J.W.; ANDERSLADE, P. Partial purification of Box jellyfish (*chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. **Toxicon**, 36: 1075-1085, 1998.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, 1990. 922pp
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**, 2.ed. Guanabara Roogan, Rio de Janeiro, 2007. 968pp
- BURNETT, J.W.; GABLE W.D. A Fatal Jellyfish Envenomation by the Portuguese Man-of-War. **Toxicon**, 27(7): 823-824, 1989.
- BURKS, R.L.; LODGE D.M. Cued in: advances and opportunities in freshwater chemical ecology. **Journal of Chemical Ecology**, 28: 1901-1917, 2002.
- CARRETTE, T.; SEYMOUR J. A rapid and repeatable method for venom extraction from Cubozoan nematocysts. **Toxicon**, 44: 135-139, 2004.
- CHEN, S.F.; FEI, X.; LI, S.H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvascular Research**, 50(1): 119-128, 1995.

- COMIS, A.; HARTWICK R. F.; HOWDEN M. E. H. Stabilization of Lethal and Hemolytic Activities of Box Jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom. **Toxicon**, 27(4): 439-447, 1989.
- KRISTAN, C. K. *et al.* Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. **Toxicon** (2009).
- CROMER, B. A.; MCLINTYRE, P. Painful toxins acting at TRPV1. **Toxicon**, 51: 163-173, 2008.
- CUNHA, T. M. *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**. 102(5): 1755-1760, 2005
- CUYPERS, E. *et al.* Jellyfish and others cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. **FEBS Lett.**, 580(24): 5728-5732, 2006.
- EDEAN, R.; HENDERSON, L. Further studies of toxic material from nematocysts of cubozoan *Chironex fleckeri*. **Toxicon**, 7: 303-314, 1969.
- ENDEAN, R. Separation of two myotoxins from nematocysts of the box jellyfish (*Chironex fleckeri*). **Toxicon**, 25: 483-492, 1987
- ENDEAN, R.; SZEMORE, D.J. The effectiveness of antivenom in countering the actions of Box-jellyfish (*Chironex fleckeri*). **Toxicon**, 26: 425-431, 1987.
- ENDEAN, R.; MONKS, S. A.; CAMERON, A. M. Toxins from the box jellyfish *Chironex fleckeri*. **Toxicon**, 31: 397-410, 1993.
- EDWARDS, L.; HESSINGER, D. A. Portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom induces calcium influx into cells by permeabilizing plasma membranes. **Toxicon**, 38: 1015-1028, 2000.
- FAUTIN, D. G. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. **Toxicon** (2009) in press.
- FREITAS, J.C.; SCHIOZER, W.A.; MALPEZZI, E. L. A. A case of envenoming by man-of-war from the Brazilian coast. **Toxicon**, 33(7): 859-861, 1995
- HADDAD, V. *et al.* A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. **Toxicon**, 40(10): 1445-1450, 2002.
- IBARRA-ALVARRO, C. *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 146: 511-518, 2007.

- ISHIKAWA, T. *et al.* Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom: studies of mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system. **Toxicon**, 44: 895-899, 2004.
- KEN, T. E. B. Surface properties of the haemolytic fraction derived from the tentacle extract of *Chironex fleckri*. **Toxicon**, 10: 587-596, 1972.
- KLINE, E. S. Chemistry of nematocyst capsule and toxin of *Hydra littoralis*. In: Lenhoff, H. M., Loomis, W. F. (Eds.), **The Biology of Hydra and some others Coelenterates**. University of Miami Press, Coral Gables, Florida: 153-169, 1961.
- KLUG, M.; WEBER J.; TARDENT, P. Hemolytic and Toxic Properties of *Hydra attenuata* Nematocysts. **Toxicon**, 27(3): 325-339, 1989.
- LONG-ROWE, K. O.; BURNETT, J. W. Sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) lethal factor: purification by recycling on m-aminophenyl boronic acid acrylic beads. **Toxicon**, 32(4): 467-478, 1994.
- LOTUFO, C. M. *et al.* Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B₄. **European Journal of Pharmacology**, 534(1-3): 258-263, 2006.
- MACEK, P.; LEBEZ D. Isolation and Characterization of 3 Lethal and Hemolytic Toxins from the Sea-Anemone *Actinia-Equinia* L. **Toxicon**, 26(5):441-451, 1988.
- MALPEZZI, E. L. A. *et al.* Characterization of peptides in sea anemone venom isolated by a novel procedure. **Toxicon**, 31: 853-864, 1993.
- MARINO, A.; MORABITO, R.; LA SPADA, G. Factors altering the haemolytic power of crude venom from *Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) nematocysts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, 152: 418-422, 2009.
- MARINO, A. *et al.* Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 139: 295-301, 2004.
- MARIOTTINI, G. L. *et al.* Cytotoxicity of the venom of *Pelagia noctiluca* forskal (Cnidaria: Scyphozoa). **Toxicon**, 40: 695-698, 2002.

- MARQUES, A.C.; JUNIOR V.H.; MIGOTTO, A. E. Evenomation by a benthic Hydrozoa (Cnidaria): the case of *Nemalécium lighti* (Haleciidae). **Toxicon**, 40:213-215, 2002.
- MIDDLEBROOK, R. *et al.*, Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. **Toxicon**, 9: 333-336, 1971.
- MIGOTTO, A. E. **Hidróides (Hydrozoa, Cnidaria) Marinhos Bentônicos da Região Costeira do Canal de São Sebastião**: Descrição *Macrorhynchia philippina* (Kirchenpauer, 1872). São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993. 258pp.
- NOGUCHI, K. *et al.* Cardiovascular effects and lethality of venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-Hurage) in anaesthetized rats. **Toxicon**, 45: 519-526, 2005.
- OLIVEIRA, J. S. *et al.* Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: Purification and biological characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1760: 453-461, 2006a.
- OLIVEIRA, J. S. *et al.* BcIV, a new paralyzing peptide from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1764: 1592-1600, 2006b.
- OLIVER, D. *et al.* Hydrozoan nematocysts send and receive synaptic signals induced by mechanical stimuli. **The Journal of Experimental Biology**, 211: 2876-2888, 2008.
- PARADA, C. A. *et al.* The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, 102(4): 937-944, 2001.
- RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, 111(4): 409-19, 1957.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**, 6.ed. Roca, São Paulo, 1996. 1029pp.
- RUTHER, J.; MEINER, T.; STEIDLE, J. L. M. Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of Kairomones. **Chemoecology**, 12: 161-167, 2002.

- SHER, D., *et al.* Hydralisins, a New Category of β -Pore-forming Toxins in Cnidaria. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(24): 22847-22855, 2005b.
- SHER, D. *et al.* Toxic polypeptides of the hydra – a bioinformatic approach to cnidarian allomones. **Toxicon**, 45: 865-879, 2005a.
- SHER, D.; ZLOTKIN, E. A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. **Toxicon** (2009).
- SILVA, C. L. M. *et al.* Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, 151: 195-205, 2007.
- SUPUT, D. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. **Toxicon** (2009).
- TAMURA, E. K.; SILVA, C. L. M.; MARKUS, R. P. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production *in vitro*. **Journal of Pineal Research**, 14: 267-274, 2006.
- TAMURA, E. K. *et al.* Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. **Journal of Pineal Research**, 46, 268-274, 2009.
- TARDENT, T. **BioEssays**, 17: 351-362, 1995.
- TORRES, M. *et al.* Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the *Cassiopea xamachana*. **Toxicon**, 39: 1297-1307. 2001.
- TURK, T.; KEM, W. R. The phylum cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. **Toxicon** (2009).
- UECHI, G. *et al.* Biochemical and physiological analyses of a hemolytic toxin isolated from sea anemone *Actinaria villosa*. **Toxicon**, 45: 761-766, 2005
- WILSHIRE, C. J. *et al.* Optimization and preliminary characterization of venom isolated from 3 medically important jellyfish: the box (*Chironex fleckeri*), Irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish. **Wilderness & environmental medicine**, 11(4): 241-250, 2000.
- WINTER, K. L. *et al.* An in vivo examination of the stability of venom from the Australian box jellyfish *Chironex fleckeri*. **Toxicon**, 49: 804-809, 2007.
- WITTLE, L. W.; MIDDLEBOOK, R.; LANE, C. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. **Toxicon**, 9: 327-331, 1971.

ZHANG, M. *et al.* Hydralysin, a novel Animal Group-selective Paralytic and Cytolytic Protein from a Nonnematocystic Origin in Hydra. **Biochemistry**, 42: 8939-8944, 2003.