

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Cod. Ac.: 39482
R. 1173510/99
03/30/99

R. 1173510
03/30/99

PURIFICAÇÃO E ESTUDO FARMACOLÓGICO DA ATIVIDADE
PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UM FATOR EXTRAÍDO DA PELE DE
Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)

MARIA LURDEMILER SABÓIA MOTA

FC-00006262-1

Fortaleza-Ceará

1999



D
615.242
M878
1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**PURIFICAÇÃO E ESTUDO FARMACOLÓGICO DA ATIVIDADE
PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UM FATOR EXTRAÍDO DA PELE DE**
Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)

ORIENTADORA: PROFA. GERLY ANNE DE CASTRO BRITO

MARIA LURDEMILER SABÓIA MOTA

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Fortaleza - Ceará

1999



B862p
1999

Mota, Maria Lurdemiler Sabóia

Purificação e Estudo Farmacológico da Atividade Pró-Inflamatória de um Fator Extraído da Pele de *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix,1824)/ Maria Lurdemiler Sabóia Mota. – Fortaleza,1999.

99p.: il.

Orientadora: Gerly Anne de Castro Brito

Tese (Mestrado) - Universidade Federal Do Ceará

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

1.*L.labyrinthicus* 2.Mastócitos 3. Edema I. Título

CDD 616.0473

PURIFICAÇÃO E ESTUDO FARMACOLÓGICO DA ATIVIDADE
PRÓ-INFLAMATÓRIA DE UM FATOR EXTRAÍDO DA PELE DE
Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

“EU LUTO,

Sim, desde a escola primária o Poeta me ensinou que “a vida é combate que aos fracos abate. Viver é lutar”. Aprendi a cumprir honestamente meu trabalho. Mas já perdi algumas coisas e pessoas por que, por quem lutei. Agora, faço a minha parte e espero que a sorte faça a sua. Não cruzo os braços, mas não me torturo para alcançar o que pode parecer impossível”.

(Milton Dias)

.. “Para ser grande, sê inteiro: nada Teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive...”

(Do poema “Para Ser Grande” de Ricardo Reis – Fernando Pessoa)



Ao Senhor meu Deus, que me presenteou com a vida, mais que um agradecimento: meu louvor e honra; pois só Dele procede toda sabedoria, é por Ele que tudo eclode em vida e esperança, é por Ele que amo e é para Ele que um dia haverei de retornar purificada e ciente do cumprimento de minha missão. Assim, que a minha vida seja uma oferta contínua e que sempre lembre de dizer, obrigada Pai!

A minha mãe Luzanira Sabóia (in memoriam), que apesar do pouco tempo de convivência, deixou-me lições imprescindíveis sobre o tempo, o criar, o sentido da existência e sobretudo acerca do respeito ao próximo, da fé, da caridade, da liberdade e do amor.

AGRADECIMENTOS

À professora Gerly Anne de Castro Brito, minha orientadora, pelo incentivo, competência, paciência e acolhida em todos os momentos difíceis, fatos que me permitiram desenvolver este trabalho.

Ao professor Krishnamurti de Moraes Carvalho pela contribuição científica e principalmente pela delicadeza com que me acolheu em seu laboratório.

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro por ceder gentilmente o seu laboratório para a realização deste trabalho.

A Victor Hugo M. Alencar, mais que um amigo, um destes anjos que Deus envia para nos ajudar por saber que em alguns momentos precisamos de ajuda para conseguirmos andar.

À coordenadora do curso de pós-graduação em Enfermagem, Raimunda Magalhães da Silva pela solidariedade expressa através do carinho com o qual sempre me acolheu.

À Ana Roberta e Walma Laena, secretárias da pós-graduação em Enfermagem, que me ensinaram ser a paciência virtude imprescindível para a realização de qualquer trabalho.

À Maria Silvandira França, pela prontidão e diligência com que sempre ajudou nos experimentos de purificação.

À Falba Bernadete, Ianna Lacerda e Lygia França, amigas de todas as horas, pela imprescindível ajuda em todos os momentos em que necessitei.

Aos amigos Ana Paula, Aronai, Amália, Antero, Carlos, Luilma, Luis Fernando, Gonzalez, Milena, Mariana, Ronaldo e Victor Hugo por partilharem seus conhecimentos nas disciplinas que cursamos.

À Artemisia e Sobrinho pelo pronto atendimento as minhas solicitações ao biotério.

A Samuel, Haroldo e Paulo pela presteza com que sempre me atenderam.

À Silvia de Lima e Beatriz, pessoas singulares, pela paciência e amizade.

À Mirna Marques, a quem tive o privilégio de acompanhar enquanto aluna de iniciação científica, por seu estímulo em todos os momentos.

A todos os amigos de laboratório: Mirian, Iberê, Denise, Andrea, Alfredo, Profª Rita e Roberta que dotados do dom da compreensão tornaram menos penosa essa batalha.

À Ana Paula Mesquita, Paulo César Cavalcante e Listo P. Lira pela presteza e abnegação de serem sempre amigos.

Às professoras Gisela Costa Camarão e Elisabete Moraes pelo apoio e solidariedade que me fizeram acreditar que valia a pena o esforço para fazer sempre o melhor possível em todas as coisas

Ao amigo e professor José G. de Magalhães pela solidariedade e companheirismo.

Aos meus irmãos que com o silêncio e a distância me inspiram o trabalho árduo. Em especial, a Estênio e Elias que me ensinam, a cada dia, que mesmo o mais simples dos gestos pode tornar-se grandioso se nele houver paixão.

Ao profº Carlos Alberto Flores (in memoriam), de quem sinto enorme saudade e com quem aprendi que o trabalho e esforço em demasia não são percebidos pelo corpo físico se na alma existir amor pelo que se faz. A ele, um dos mentores intelectuais deste trabalho, dedico o meu esforço para realizá-lo.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
α	Alfa
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato da adenosina
β	Beta
BK	Bradicinina
C	Controle
C5a	Quinto componente do complemento
Ca ⁺⁺	Cálcio
cav	Cavidade peritoneal
Cipro	Cipro-heptadina
DAG	Diacilglicerol
Dexa	Dexametasona
e.v.	Endovenoso
EPM	Erro padrão da média
EBL	Extrato Bruto de <i>Leptodactylus</i>
Fr	Fração
g	Gramas
H	Horas
HE	Hematoxilina e eosina
Hoe	D-Arg-[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,D-Tic ⁷ ,Oic ⁸]bradykinin
i.p.	Intraperitoneal
IgE	Imunoglobulina E
Indo	Indometacina
IP ₃	Trifosfato de inositol

K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma(s)
LtB ₄	Leucotrieno B ₄
μ	Micro
M	Molar
Mep	Mepiramina
Mepa	Mepacrina
Met	Metisergida
mg	Miligrama
μg	Micrograma
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mm	Milímetro(s)
mm ³	Milímetro(s) cúbico(s)
°C	Grau(s) centígrado(s)
PAF	Fator ativador de plaqueta
PBS	Solução Salina Tamponada
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PIP ₂	Bifosfato de fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinase C
PM	Peso molecular
PMNs	Polimorfonucleares
S	Salina
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TFA	Ácido trifluoracético
u	Unidade(s)
48/80	N-metil-p-metoxi-feniletilamina

RESUMO

A pele de anfíbios é capaz de sintetizar vários compostos biologicamente ativos os quais por se assemelharem a mediadores de mamíferos podem ser usados como ferramentas farmacológicas para o estudo de funções fisiológicas nesta classe. O objetivo desse estudo foi caracterizar farmacologicamente substâncias extraídas da pele de *Leptodactylus labyrinthicus* utilizando-se modelos clássicos de inflamação.

O extrato de pele foi purificado em HPLC e liofilizado. Para o estudo farmacológico foram utilizados os seguintes modelos: edema de pata medido em pletismógrafo, peritonite e permeabilidade vascular medida pelo extravasamento de azul de Evans em ratos Wistar (*Ratus norvegicus*).

Os resultados demonstraram que o extrato bruto do veneno, assim como todas as suas frações, a exceção da fração 14, induziram edema ($p < 0,05$), 30 minutos após injeção subcutânea intraplantar e com pico na primeira hora. Prosseguiu-se o estudo com uma das frações (Fr 5), cujo peso molecular aqui determinado foi 2490 D. Antagonistas de histamina e bradicinina bloquearam parcialmente porém significativamente ($p < 0,05$) o edema de pata induzido por Fr 5. O bloqueador de serotonina foi mais eficaz em inibi-lo. A cipro-heptadina, que é antagonista das três substâncias, o inibiu quase por completo.

Antagonista seletivo de fosfolipase A₂ inibiu ($p < 0,05$) apenas o pico do edema, enquanto que dexametasona inibiu ($p < 0,05$) de forma dose-dependente, este edema nas fases precoce e tardia. Antagonista seletivo de lipoxigenase também inibiu o edema de Fr 5 ($p < 0,05$) em vários pontos da curva. No entanto, o antagonista de ciclooxigenases, não foi capaz de inibi-lo.

Ademais, a fração 5 foi capaz de degranular mastócitos significativamente ($p < 0,05$) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Fr 5 induziu

migração de eosinófilos ($p < 0,05$) e uma discreta, mas também significativa migração de neutrófilos, além de induzir aumento de permeabilidade vascular para a cavidade peritoneal, cujo pico coincidiu com o pico da degranulação de mastócito.

Estes dados sugerem que o aumento de permeabilidade vascular, a migração de eosinófilos e neutrófilos induzidos por Fr 5 são mediados por substâncias oriundas da ativação e/ou degranulação de mastócitos.

A descoberta de substâncias como Fr 5, cuja ação parece ocorrer em uma etapa específica do processo alérgico e o uso de modelos animais experimentais, podem se constituir em ferramentas de valor inestimável para a compreensão da fisiopatologia de processos dessa natureza.

ABSTRACT

The amphibian skin synthesizes several biologically active substances. These substances resemble mediators of mammals and are used as pharmacological tools for studies of the physiologic functions in this class. This study consists on evaluating the ability of these substances, extracted from the skin of frog (*Leptodactylus labyrinthicus*), to induce inflammation in rat and to determine the mechanisms involved on it.

Extract of skin were submitted to a reverse-phase high performance chromatography and tested in classical inflammation models: rat paw edema, inflammation in peritoneal cavities and increase of vascular permeability measured by Evans blue extravazation.

Our results demonstrated that the poison extract, as well as all fractions (Fr), exception the fraction 14, were capable to induce edema ($p < 0,05$) 30 minutes after the subplantar injection, with peak activity at 1 hour. It was choose the Fr 5, which molecular weight determined by this study, was about 2490 D, to continue the investigation. Histamine and bradykinin antagonists blocked partially, even so significantly ($p < 0,05$) the paw edema induced by Fr 5. Serotonine antagonist was more efficient in inhibiting that edema. The cypro-heptadin that is antagonist of the three substances, inhibited the edema induced by Fr 5 almost completely.

Antagonist selective for phospholipase A_2 was capable to inhibit significantly ($p < 0,05$) just the peak of the paw edema induced by Fr 5. Dexamethasone inhibited significantly ($p < 0,05$) and in a dose-dependent way, the paw edema induced by this fraction in the precocious and late phases. Antagonist selective for lipoxigenase also inhibited this edema ($p < 0,05$) in several points of the curve, the same not happened with ciclooxigenase antagonist, indomethacin that was not capable to inhibit it.

Furthermore, Fr 5 was capable to significantly ($p < 0,05$) induces mast cell degranulation in *in vitro* and *in vivo* models. Fr 5 induced significant eosinophil migration ($p < 0,05$) and a discreet, but also significant neutrophil migration, besides significant increase of vascular permeability to the peritoneal cavity whose peak, coincided with the peak of the mast cell degranulation.

The data suggest that the increase in vascular permeability, eosinophil and neutrophil migration induced by Fr 5 is mediated by substances originating from of the activation and/or mast cell degranulation.

The discovery of substances like Fr 5, whose action seems to occur in a specific stage of the allergic process and the use of experimental animal models may be tools of great value for the understanding of the allergic processes physiopathology.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	18
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ANFÍBIOS	18
1.1.1. INTER-RELAÇÕES ENTRE ANFÍBIOS E SOCIEDADE HUMANA:	18
1.1.2. EVOLUÇÃO	19
1.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA RÃ <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	21
1.2.1. ASPECTO EXTERNO	21
1.2.2. GLÂNDULAS DE VENENO	21
1.3. DISTRIBUIÇÃO	24
1.4. CLASSIFICAÇÃO	25
1.5. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	26
1.6. PERMEABILIDADE VASCULAR E EDEMA	27
1.7. A BIOLOGIA DOS MASTÓCITOS	29
1.7.1. ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS E LIBERAÇÃO DE MEDIADORES	30
1.7.2. MASTÓCITOS COMO FONTE DE CITOCINAS	34
1.7.3. IMPORTÂNCIA DOS MASTÓCITOS NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA	35
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. ANIMAIS	40
2.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS	40
2.3. SOLUÇÕES, DROGAS E CORANTES UTILIZADOS	42
2.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL - PARTE 1	45
2.4.1. EXTRÇÃO DO VENENO	45
2.4.2. PURIFICAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DO VENENO EM HPLC COM COLUNA PREPARATIVA	46
2.4.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA "FRAÇÃO 5" EM HPLC COM COLUNA ANALÍTICA	47
2.4.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	47
2.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL - PARTE 2	48
2.5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA	48
2.5.2. EDEMA DE PATA EM RATOS	48
2.5.3. INIBIÇÃO DO EDEMA DE PATAS INDUZIDO PELA Fr5 POR MEPIRAMINA, CIPROHEPTADINA, DEXAMETASONA, MK886, MEPACRINA, INDOMETACINA OU HOE140.50	48
2.5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA Fr5 DA PELE DE <i>L. labyrinthicus</i>	49
2.5.5. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS IN VITRO	50
2.5.6. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR ASSOCIADO A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS IN VIVO E MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS	51

2.5.7. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EOSINÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL.....	51
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
3.RESULTADOS.....	54
3.1. EXTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE VENENO DA PELE DA RÃ <i>L. labyrinthicus</i>	54
3.2. PURIFICAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DO VENENO EM HPLC COM COLUNA REPARATIVA.....	54
3.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DE Fr5 EM HPLC COM COLUNA ANALÍTICA	55
3.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.....	56
3.5. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO PELO EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL) EM PATA DE RATO.....	56
3.6. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO POR FRAÇÕES EXTRAÍDAS DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL) EM PATA DE RATO.....	56
3.7. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO POR Fr5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL) EM PATA DE RATO.....	57
3.8. CINÉTICA DA INIBIÇÃO POR MEPIRAMINA, METISERGIDA, HOE 140 E CIPROHEPTADINA DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL) EM PATA DE RATO.....	57
3.9. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL) EM PATA DE RATO APÓS DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS PELO COMPOSTO 48/80.....	58
3.10. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> (EBL), COMPOSTO 48/80 OU SOLUÇÃO SALINA 0,9% NA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO DA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS IN VITRO.....	58
3.11. CINÉTICA DA INIBIÇÃO POR DEXAMETASONA, MK 886, MEPACRINA E INDOMETACINA DO EDEMA INDUZIDO PELA Fr5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> EM PATA DE RATO.....	59
3.12. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> OU SOLUÇÃO SALINA 0,9 % NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR, DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS E MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS IN VIVO.....	59
3.13. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA EXTRATO BRUTO DE <i>L. labyrinthicus</i> OU SOLUÇÃO SALINA 0,9 % NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS IN VIVO.....	60
4.DISSCUSSÃO.....	80
5.CONCLUSÕES.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ANFÍBIOS

1.1.1. INTER-RELAÇÕES ENTRE ANFÍBIOS E SOCIEDADE HUMANA.

Os primeiros registros acerca dos efeitos de substâncias extraídas de plantas ou animais, embora conhecidos desde a pré-história, datam do aparecimento da escrita cuneiforme entre Assírios e Babilônios, sendo que a mais antiga alusão a utilização de anfíbios é dita anterior, em cerca de quatro séculos, a tal fato tendo sido documentada pelos próprios Assírios e Babilônios, bem como pela liturgia sagrada dos jesuítas e medicina folclórica Chinesa (Lee & Chen, 1951; Wallnofer & Von Rottauscher, 1965).

Papiros Assírios descrevem como remédio para conjuntivite uma mistura de bile de rã com leite azedo. Os Chineses e mais tarde os Romanos administravam pele de anfíbio e secreção de glândulas parótidas para regular funções internas do corpo e fertilidade ou como uma panacéia para mordida de cachorro e para curar uma grande variedade de doenças pela ingestão ou aplicação tópica (Lee & Chen, 1951; Wallnofer & Von Rottauscher, 1965).

Na Idade Média, marcada pelo obscurantismo nas artes e ciência, a secreção da pele de anfíbios era empregada na elaboração de venenos que compunham poções capazes de determinar a morte rápida ou lenta. Tais animais também estiveram presentes na história da humanidade de outras formas: como oferendas aos deuses em cultos religiosos, na literatura, nas artes (pinturas e esculturas), nos esportes (como atrativos para caças) e por fim como fonte direta de alimentação através da utilização de algumas espécies de rãs (Lazarus & Attila, 1993).

A presença de peptídeos com ação antimicrobiana e antiviral na secreção de glândulas parótidas de rãs (Stone et al., 1992) tornam viáveis muitas das crenças postas ao longo da história. No Oeste e no Sudeste da Ásia, utiliza-se há séculos os venenos de sapos no tratamento de sinusites, resfriados, inflamações locais e dores de dente, sendo este o primeiro e mais antigo uso de veneno de origem animal na terapêutica (Sebben et al., 1993).

1.1.2. EVOLUÇÃO

O nome *Amphibio* deriva do grego (*Amphi*, duas + *bios*, vida), acuradamente define animais ditos de vida dupla, ou seja, aqueles que vivem parcialmente na água doce e na terra (Duellman, 1992). Muito provavelmente se originaram de peixes aparentados aos dipnóicos atuais e representam na escala evolutiva o grupo de transição entre peixes e répteis (Marcondes & Lammoglia, 1981).

Atualmente são conhecidas cerca de 4.550 espécies de anfíbios agrupados em três ordens: Gymnophiona (anfíbios desprovidos de membros, vulgarmente conhecidos por cobra-cega); Caudata ou Urodela (salamandras e tritões); e Anura (sapos e pererecas) (Marcondes & Lammoglia, 1981).

Primeiros vertebrados a iniciar a conquista terrestre, passaram por muitas mudanças evolucionárias quando emergiram provenientes dos mares Devonianos no final da era Paleozóica há 300-350 milhões de anos atrás. Porém, as características que permitiram a sobrevivência desses animais em ambiente seco não são adaptações perfeitas; por esse motivo, são considerados um grupo de transição entre a vida aquática e a vida na terra. São os primeiros vertebrados tetrápodos, aquisição fundamental para a locomoção na terra e no estágio larval respiram por brânquias; os adultos têm respiração pulmonar e cutânea (Modificado de Lazarus & Attila, 1993).

Os pulmões, nesse grupo de vertebrados, são considerados estruturas pouco eficientes, visto possuírem uma superfície interna limitada com alvéolos simples. Desta forma, a pele dos anfíbios, permeável, úmida, sem escamas e bem irrigada por vasos sanguíneos assume importância especial nas trocas gasosas. Por outro lado a presença de uma pele tão permeável traz problemas que dificultam a sobrevivência no ambiente terrestre: a perda de grande quantidade de água por transpiração pode ocasionar desidratação. Tal fato, poderia explicar a estreita dependência dos anfíbios em relação a água e sua preferência por lugares úmidos. Além disso, um outro motivo os escraviza à água, é o tipo de reprodução. Os ovos, sem casca, apenas com um envoltório gelatinoso, só se mantêm viáveis em meio aquático (Storer et al, 1985).

O esqueleto dos anfíbios apresenta uma *cintura escapular*, dianteira e uma *cintura pélvica*, posterior nas quais se inserem as extremidades locomotoras. O crânio tem duas saliências, ou *côndilos*, que se articulam com a primeira vértebra; assim, esses animais conseguem movimentar a cabeça para cima e para baixo, mas não para os lados.

Apresentam a boca sem dentes, todavia possuem língua bem desenvolvida. O sistema digestivo consta de um grande estômago, fígado com vesícula biliar, pâncreas e intestino, com o tubo digestivo terminando numa região chamada *cloaca*, onde também desembocam os canais geniturinários.

O coração é tricavitário, compondo-se de dois átrios e um ventrículo, no qual se misturam os sangues venoso e arterial. As hemácias são nucleadas.

Os olhos são desenvolvidos e adaptados à visão de objetos em movimento. Possuem ouvidos médio e interno com tímpanos ao nível da pele, logo atrás dos olhos. As fossas nasais dispõem de epitélio olfativo (Storer et al, 1985; Lazarus & Attila, 1993).

1.2.ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA RÃ *Leptodactylus labyrinthicus*

1.2.1.ASPECTO EXTERNO

A pele é mole, lisa e úmida com uma tonalidade escura indo do castanho ao negro e produzida pela melanina, usualmente encontrada nos melanóforos. A cabeça apresenta uma ampla boca, pequenas narinas valvulares, grandes olhos esféricos e atrás de cada olho um tímpano achatado ou membrana timpânica. Cada olho possui uma pálpebra superior carnosa e opaca e uma inferior menor. Internamente a elas, existe uma terceira pálpebra transparente que se assemelha funcionalmente à membrana nictante dos vertebrados superiores. Ela move-se para cima sobre o globo ocular para conservá-lo úmido no ar e para protegê-lo dentro da água (Stebbins & Cohen, 1995).

Na extremidade posterior, situa-se o ânus ou abertura cloacal, no meio do corpo existe uma corcunda sacral onde a cintura pélvica se articula com o sacro. A pata anterior curta compõe-se de braço, ante-braço, pulso e mão; esta tem quatro dedos e um polegar vestigial. A pata posterior é formada por coxa, perna, tornozelo (região dorsal) e pelo longo pé com sola (metatarso) estreita e cinco artelhos delgados, ligados por palmouras largas e finas. As palmas e as solas apresentam tubérculos cornificados que protegem os pés contra a abrasão e que fornecem tração em superfícies úmidas e escorregadias (Stebbins & Cohen, 1995).

1.2.2.GLÂNDULAS DE VENENO

A pele dos anfíbios é rica em glândulas que elaboram secreções cujo significado biológico tem sido destacado em alguns trabalhos. Deve-se ressaltar que, de modo geral, elas intervêm na respiração, na reprodução e na

proteção desses vertebrados contra predadores, dessecação e proliferação de microorganismos na superfície do corpo (Toledo & Jared, 1989).

As glândulas multicelulares cutâneas dos anfíbios adultos são fundamentalmente de dois tipos: as mucosas e as granulosas. As glândulas mucosas, em geral, ocorrem em maior número e são menores que as granulosas. O muco por elas produzidos intervém, em diversas atividades funcionais, por exemplo: respiração cutânea, termorregulação, defesa e reprodução (Toledo, 1986).

As glândulas granulosas ou de veneno elaboram uma secreção tóxica para muitas espécies de vertebrados sendo, por isso importantes para defesa passiva dos anfíbios. Ressalta-se que na espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, de habitat em regiões semi-áridas ou secas há secreção, através de suas glândulas, de substâncias serosas que são usadas para reter água em sua pele (Toledo & Jared, 1989)

A origem e função dos venenos e substâncias tóxicas encontrados na pele de anfíbios é apenas parcialmente conhecida. Porém, estudos têm demonstrado que a secreção venenosa elaborada pelas glândulas granulosas é bastante diversificada quanto a composição química, funcionando desta forma, como um verdadeiro arsenal de produtos químicos naturais com variadas atividades biológicas (Mills & Prum, 1984).

Segundo Lazarus e Áttila, (1993) as glândulas granulosas de anfíbios sintetizam histamina e estocam produtos para a secreção, nos quais incluem-se cinco grupos de espécies químicas: 1) Peptídeos, sendo um grupo com atividade antimicrobiana e outro com princípios ativos diversos; 2) Proteínas, substâncias proteináceas e enzimas; 3) Esteróides cardiotônicos e não cardiotônicos; 4) Alcalóides e 5) Aminas biogênicas.

Os tipos de substâncias biologicamente ativas encontradas na pele de anfíbios parecem ter significância filogenética. Desta maneira, alquilaminas

inólicas são tipicamente encontradas em grande número de sapos da família *Bufo* e particularmente nos do gênero *Bufo*; aminas fenólicas em rãs do gênero *Leptodactylus*; peptídeos vasoativos em muitas variedades de rãs e nas glândulas paratóides de sapos do gênero *Bufo*; alcalóides lipofílicos e também o alcalóide hidrossolúvel tetrodotoxina são encontrados na família das salamandras; muitas aminas, incluindo algumas bem conhecidas como a serotonina, tiramina e derivados são encontrados em vários sapos e rãs, bem como muitos peptídeos vasoativos, como a bradicinina, sauvagenina, ceruleína, bombesina, dermofinas, etc (Daly, 1995).

Em termos de atividade farmacológica os peptídeos isolados da pele de rãs podem ser classificados em vários grupos e, de modo geral, possuem semelhanças com peptídeos de diversos órgãos de mamíferos, que funcionam, nestes vertebrados, como hormônios gastrointestinais, autacóides, neurotransmissores e fatores de liberação (Mignogna et al, 1997).

Peptídeos com atividade farmacológica equivalente podem ser encontrados em diferentes espécies de anfíbios, porém suas seqüências de aminoácidos raramente são idênticas. Peptídeos análogos da pele de rãs são freqüentemente encontrados no sistema nervoso central e células neuroendócrinas e nervos do trato gastrointestinal e respiratório de mamíferos. Como exemplo, citam-se análogos da bombesina, colescistoquinina e ceruleína, além da bradicinina (BK), um nonapeptídeo, encontrado em grandes quantidades na pele de *Rana temporaria*. (Bevins & Zasloff, 1990)

Estudos realizados por Conlon e Aronsson, (1997) confirmam que a BK presente na pele de *R. temporaria* é idêntica a BK encontrada em mamíferos, inclusive quanto aos efeitos fisiológicos, sendo que sua função nos anfíbios seria a de proteção contra os predadores, já que a BK foi encontrada no lúmen do estômago destes e esta agiria como estimulante da

motilidade gástrica, que ativaria o reflexo do vômito do predador facilitando desta forma a ejeção da presa.

As aminas biogênicas encontradas na pele de algumas espécies de rãs são divididas em três grupos: 1) O das indolalquilaminas, que inclui a 5-hidroxitriptamina (5-HT); 2) Imidazolalquilaminas, que tem como principal representante a histamina; 3) Hidroxifenilalquilaminas, que inclui a leptodactilina. (Clarke, 1997).

No tegumento de espécies da família *Leptodactylidae* foram identificados aminas biogênicas como a 5-HT, a histamina e a leptodactilina. Algumas destas aminas têm ações farmacológicas bem conhecidas. A leptodactilina por exemplo é bloqueadora da transmissão sináptica neuromuscular, provocando efeitos semelhantes aos do curare. (Toledo & Jared, 1989).

A histamina tem uma ação acentuadamente relaxante sobre os músculos dos vasos sanguíneos mais delgados, reduzindo a pressão sanguínea sistêmica. Entretanto em alguns animais como coelhos e roedores, age como constritora de vasos sanguíneos maiores. Essa amina biogênica intensifica a contração dos músculos atrial e ventricular por intensificar o fluxo dos íons cálcio. Além disso, liga-se a receptores que participam da ativação de células parietais do estômago. Também está envolvida em reações de hipersensibilidade e, ainda, com impulsos sensoriais cutâneos que provocam prurido e dor (Douglas, 1996 & Guo et al, 1997).

1.3.DISTRIBUIÇÃO

Os anfíbios conseguem sobreviver em todas as regiões do mundo, exceto na Antártida e Groenlândia. Vivem principalmente na água ou em

lugares úmidos, nunca no mar. São comuns em regiões temperadas úmidas e mais abundantes em florestas tropicais, embora algumas espécies de rãs atinjam o círculo polar ártico (Storer et al, 1985).

A família *Leptodactylidae* é encontrada no ocidente da Índia e do sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. O gênero *Leptodactylus*, por sua vez, é encontrado em toda a América do Sul e do México até o Texas. No Brasil, a espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), está distribuída no cerrado, na caatinga do Nordeste, no Norte (Roraima) e em algumas regiões do Sudeste.

1.4.CLASSIFICAÇÃO

A rã da espécie *L. labyrinthicus* (figura 1) tem como “habitat” típico o estado do Rio de Janeiro, onde foi originalmente classificada como:

reino - *Animalia*

filo - *Chordata*

subfilo - *Vertebrata*

classe - *Amphibia*

subclasse - *Salentia*

ordem - *Anuran*

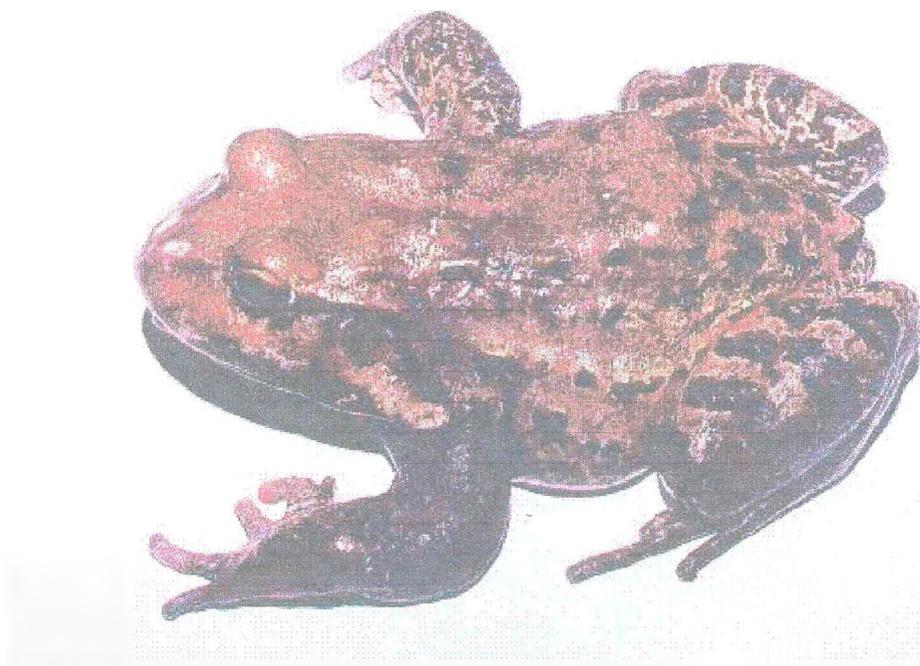
família - *Leptodactylidadae* (Berg, 1896)

subfamília - *Leptodactylinae* (Berg, 1896)

gênero - *Leptodactylus* (Fitzinger, 1896)

grupo - *Pentadactylus*

espécie - *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Giulio & Eugênio, 1980)



Rã da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*

1.5. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os primeiros relatos sobre inflamação datam de 3.000 a.C., porém foi Cornelius Celsus que, no início da era Cristã, descreveu os quatro sinais cardeais da resposta inflamatória: rubor, tumor, calor e dor. Mais tarde, a perda de função foi acrescentada por Virchow, como o quinto sinal da inflamação (citado por Rocha e Silva, 1978).

A inflamação é uma complexa reação de defesa do organismo, mais especificamente dos tecidos vascularizados, em resposta a uma lesão, trauma ou infecção (Robbins et al, 1994). Estímulos físicos, químicos ou biológicos são suficientes para ativar, na área lesada, uma série de fenômenos, que microscopicamente envolvem: a) vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente aparecimento de sinais como calor e rubor; b)

aumento de permeabilidade venular e exsudação de proteínas plasmáticas e plasma, o que resulta em edema; c) migração de leucócitos (Sedgwick & Willoughby, 1985).

A reação inflamatória pode ter duas fases, a primeira denominada aguda e a segunda, denominada crônica. A fase aguda é caracterizada pela curta duração, exsudação de fluido e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Em geral, como resultado da reação inflamatória ocorre a prevenção da progressão da lesão (resolução), sendo o processo de reparo iniciado já nas primeiras fases da inflamação, atingindo seu clímax após ter sido neutralizado o estímulo agressor. Apesar de ser um mecanismo de defesa, desvios na intensidade desta reação podem causar sérios danos ao organismo. Em casos de uma resposta diminuída o risco de infecções recorrentes e severas aumenta, como por exemplo na doença granulomatosa crônica. A situação oposta também é indesejável, ou seja, quando ocorre uma resposta exarcebada, podem haver lesões tissulares com comprometimento funcional importante como na artrite reumatóide, rejeição de enxertos, etc. (Robbins et al., 1994). O desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas necessita, pois, da compreensão plena dos fenômenos inflamatórios agudos ou crônicos.

1.6. PERMEABILIDADE VASCULAR E EDEMA

O aumento de permeabilidade vascular leva ao escape de fluido rico em proteína (exsudato) para o interstício, o que resulta em diminuição da pressão oncótica do plasma e aumento da pressão oncótica do fluido intersticial. Este fato, juntamente com o aumento da pressão hidrostática

causada pela vasodilatação, produz saída de fluido do meio intravascular e sua acumulação no tecido, o que resulta em edema (Robbins et al., 1994).

São conhecidos cinco mecanismos para o aumento de permeabilidade do endotélio (Majno, 1992):

1. Contração da célula endotelial, alargando as junções intercelulares - É o mecanismo pelo qual histamina, bradicinina e leucotrienos agem. O aumento de permeabilidade ocorre rapidamente após a exposição ao mediador e é de curta duração (15 a 30 minutos). Este mecanismo afeta somente vênulas, provavelmente pela maior densidade de receptores para os mediadores no endotélio venular (Majno & Palade, 1961);
2. Reorganização do citoesqueleto com retração endotelial - pode ser induzida *in vitro* por IL-1, TNF e IFN γ . É um efeito retardado (4 a 6 horas) e de longa duração (24 horas ou mais). Se esse mecanismo contribui para o aumento de permeabilidade *in vivo* ainda é incerto (Brett citado por Robbins, 1994, p. 56);
3. Necrose da célula endotelial em queimaduras e infecções bacterianas líticas;
4. Aumento de permeabilidade vascular mediada por leucócitos - as substâncias leucotáticas C5a, LtB4 e fMLP não foram efetivas em produzir aumento de permeabilidade vascular em animais injetados com mostarda nitrogenada, usada para depletar leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Esses resultados sugerem que, ao contrário da histamina e bradicinina, que aumentam a permeabilidade vascular, agindo diretamente sobre as células endoteliais, as substâncias C5a, LtB4 e fMLP agem somente na presença de leucócitos PMNs. O modo pelo qual os leucócitos PMN aumentam a permeabilidade vascular, permanece incerto. Porém, existem hipóteses de que durante sua passagem pela parede do vaso eles secretam enzimas, que quebram as junções entre as células endoteliais ou que atuam sobre a membrana basal. Os leucócitos polimorfonucleares podem, ainda, secretar substâncias que afetam as células endoteliais, causando contração.

Apesar dos leucócitos PMNs estarem presentes em grande quantidade no tecido depois de várias horas do início da resposta inflamatória, evidências sugerem que essas células interagem com o endotélio vascular para regular a permeabilidade, poucos minutos após o estímulo inflamatório (Wedmore & Williams, 1981); 5. Permeabilidade aumentada de capilares em regeneração (angiogênese), até a formação das junções intracelulares definitivas (Robbins et al., 1994).

A bradicinina, um nonapeptídeo, causa vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular. Porém, o mecanismo para tal efeito ainda não foi completamente esclarecido. Embora, trabalhos recentes demonstrem que em pele de ratos essa ação deva-se ao fato de que bradicinina pode agir degranulando mastócitos e promovendo a liberação de histamina. Entretanto, sua ação vasodilatadora pode também ser devido ao fato de que, ao agir sobre células endoteliais, ela estimula a FLA₂ gerando PgI₂ e também provoca a liberação de óxido nítrico que é um importante agente vasodilatador. A bradicinina é um potente produtor de dor, um efeito que é potenciado pelas prostaglandinas. O efeito, semelhante ao da histamina e da serotonina em algumas espécies, é exercido nas pequenas vênulas e envolve a separação das junções entre as células endoteliais. Isto, junto com um aumento do gradiente de pressão hidrostática, provoca edema (Goodman & Gilman, 1997).

1.7. A BIOLOGIA DOS MASTÓCITOS

Todos os mastócitos são derivados de progenitores presentes na medula óssea e expressam na sua superfície o receptor FcεRI que é responsável pela grande afinidade da porção Fc do anticorpo IgE. São considerados células enigmáticas do organismo, por serem responsáveis pela

secreção de um grande número de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a manutenção de estados inflamatórios crônicos como: úlcera intestinal induzida por estresse, artrite reumatóide, cistite intersticial, escleroderma e doença de Crohn. São proeminentes também no desenvolvimento da anafilaxia, e a despeito dos efeitos negativos de suas secreções, mastócitos ou células mastócitos símile têm sido descritos em muitas ordens de animais de modo que essa persistência filogenética através da evolução sugere que eles desempenhem também papel benéfico em algum tipo de doença (Abraham et al., 1997).

Na espécie humana os mastócitos são seletivamente encontrados em número relativamente grande, adjacente aos vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, sendo também predominantes na superfície epitelial da pele e mucosas geniturinária, gastrointestinal e do trato respiratório. Estima-se que as concentrações dessas células sejam 500 a 4000 por mm^3 no pulmão; 7000 a 12000 por mm^3 na pele e 20000 por mm^3 no trato gastrointestinal (Galli, 1993).

1.7.1. ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS E LIBERAÇÃO DE MEDIADORES.

Os mastócitos são altamente especializados na síntese e secreção de um grande número de substâncias farmacologicamente ativas, sendo essas substâncias categorizadas em duas classes distintas de mediadores. Uma que inclui aqueles ditos pré-formados, tais como histamina, heparina e serino proteases. Outra incluindo os mediadores oriundos da chamada síntese *de novo*, que ocorre quando do estímulo de células, tais como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos. Dependendo da natureza do agonista os produtos da ativação de mastócitos podem ser liberados por diferentes mecanismos de exocitose (Abraham et al., 1997).

Estudos ultraestruturais dos mecanismos de exocitose de mastócitos realizados por Dvorak (1997) têm revelado dois mecanismos básicos: um referido como de liberação lenta dos mediadores e outro como de liberação rápida, também chamado de degranulação anafilática. A primeira consiste em um esvaziamento lento dos grânulos na ausência de fusão intergranular; já a segunda é descrita como explosiva, consistindo de eventos de secreção rápida que se completam minutos após a estimulação e que parecem ser iniciados pela fusão coordenada e concomitante secreção dos mediadores dos grânulos através de degranulação intracitoplasmática (Dvorak, 1997).

Os passos bioquímicos que envolvem a degranulação anafilática são parcialmente conhecidos, mas supõe-se que a ligação cruzada das IgEs ligadas, pelo antígeno, ative uma proteína (G) de ligação do trifosfato de guanosina (GTP), que por sua vez provoca a ativação de uma fosfolipase C específica para o bifosfato de fosfatidil-inositol (PIP_2). Esta enzima catalisa a liberação do trifosfato de inositol (IP_3) e do DAG do PIP_2 de membrana. IP_3 provoca a liberação do cálcio intracelular do retículo endoplasmático. O cálcio no citoplasma ativa diretamente certas enzimas, como a fosfolipase A_2 e em complexo com a calmodulina, ativa outras enzimas, como a cinase da cadeia leve de miosina. Cálcio e DAG combinam-se com fosfolipídeos de membrana, para a ativação da proteína cinase C (PKC). Estes eventos intracelulares são similares aos que ocorrem nos linfócitos T e B, em resposta à ligação cruzada de seus receptores antigênicos. Nos mastócitos, o resultado da ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D_2 (PGD_2) ou leucotrieno C_4 e a exocitose de grânulos secretórios (Abbas et al, 1997).

Os mastócitos são heterogêneos, ou seja, nem todos liberam os mesmos mediadores, ou as mesmas combinações de mediadores. Os seus grânulos contêm mediadores vasoativos não-lipídicos de baixo peso

molecular, sendo o mediador protótipo desta classe a histamina, mas em certos roedores a serotonina pode ter importância igual ou superior especialmente na mucosa do pulmão e serosa de roedores (Galli, 1993).

A histamina, uma amina básica encontrada em muitos tecidos do corpo e em grandes concentrações nos pulmões, na pele e trato gastrintestinal, é liberada pelos mastócitos por um processo secretor durante reações inflamatórias ou alérgicas. Os estímulos para esta secreção incluem a interação dos componentes do complemento C3a e C5a com receptores específicos na superfície celular ou a interação de antígenos com anticorpos IgE fixos aos mastócitos. O processo secretor é desencadeado por uma elevação do cálcio intracelular. Isso se segue a uma ligação cruzada dos receptores (IgE), feita pelo antígeno, que ocasiona um aumento na permeabilidade ao cálcio e a liberação de cálcio pelas reservas intracelulares (Rang et al., 1997)

O aumento de permeabilidade vascular induzido pela histamina é atribuído a sua ação sobre receptores H_1 localizados nas células endoteliais, especialmente nas vênulas pós-capilares (Atkinson et al., 1992). Estudos em tecidos intactos e em células endoteliais em cultura, demonstram que a ligação da histamina ao receptor resulta na mudança de forma (contração) da célula endotelial e formação de espaços de $1\mu\text{m}$ de diâmetro entre células adjacentes. Esses espaços levam ao extravasamento de macromoléculas. A estimulação de receptores H_1 em células umbilicais humanas em cultura, está associada com a hidrólise de fosfatidilinositol e aumento do Ca^{++} intracelular, proveniente inicialmente dos estoques intracelulares, mas que requer Ca^{++} extracelular para sustentar a resposta. O fato da citocalasina B, que inibe a polimerização da actina, bloquear a resposta da histamina em aumentar a permeabilidade, sugere que a contração da célula endotelial é essencial para obtenção desse efeito (Gallin et al, 1992). Nas células endoteliais vasculares,

a ligação da histamina conduz à retração e a um vazamento paracelular do plasma para os tecidos. A histamina também faz com que as células endoteliais sintetizem miorelaxantes da musculatura lisa vascular, como a prostaciclina e o óxido nítrico, o que provoca vasodilatação. Estas ações da histamina produzem a resposta de eritema-edema da hipersensibilidade imediata (Lukacs et al, 1996).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um segundo mediador vasoativo pré-formado e apresenta ações semelhantes às da histamina. Encontra-se presente nas plaquetas e células enterocromafínicas e nos mastócitos de roedores, embora não nos de seres humanos (Goodman & Gilman, 1996).

Os grânulos dos mastócitos contêm também diversas enzimas, como as serino-proteases e a aril sulfatase, bem como proteoglicanos como heparina encontrada no pulmão e serosas das cavidades do corpo e o sulfato de condroitina encontradas na mucosa do trato gastrointestinal (Abbas et al., 1997).

Há ainda três classes de mediadores lipídicos sintetizados por essas células ativadas. Em geral, estas reações são todas iniciadas pelas ações da fosfolipase A_2 , que libera substratos dos fosfolipídeos precursores armazenados em membranas nos corpos lipídicos. O primeiro mediador lipídico descrito foi a prostaglandina D_2 (PGD_2) que liga-se a receptores nas células da musculatura lisa, atuando como vasodilatador e broncoconstritor. Uma segunda classe de mediadores, derivados do ácido araquidônico e provenientes da degranulação de mastócitos, são os leucotrienos, sendo os principais o LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 e em menores proporções o LTB_4 . O terceiro mediador lipídico produzido por basófilos, e provavelmente por mastócitos, é o fator de ativação de plaquetas (PAF), que pode ter uma importância particular nas reações de fase tardia, onde atuaria ativando leucócitos. Porém,

em tal situação a principal fonte de PAF seria a superfície de células endoteliais estimuladas pela histamina e não os mastócitos (Galli, 1993).

1.7.2. MASTÓCITOS COMO FONTE DE CITOCINAS

A descoberta de que mastócitos são uma potencial fonte de citocinas tem, nos últimos anos, sugerido a existência de novos caminhos que levam a crer na ativação de mastócito como passo importante no desenvolvimento da fase tardia do processo inflamatório, bem como na manutenção de estados inflamatórios persistentes.

Galli e colaboradores (1993) demonstraram que a estimulação de mastócitos de ratos *in vitro* por FcεRI ou por outros mecanismos induzem o crescimento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm), a secreção de substâncias pró-inflamatórias e também o surgimento de citocinas mitogênicas como interleucina 1, 3, 4 e 6; fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; interferon gama; membros da família de integrinas (proteínas pró-inflamatórias de macrófagos 1α e 1β, antígeno ativador de células T e JE); e fator de necrose tumoral- α (TNF-α). Em conjunto estas citocinas não regulam unicamente a produção de IgE e outras respostas imunes, mas também afetam a resposta inflamatória, hemostasia, hematopoese, angiogênese, remodelação tecidual e desenvolvimento de tumor ou resistência ao tratamento do mesmo (Galli, 1993).

Estudos desse mesmo autor, têm demonstrado que mastócitos convenientemente estimulados liberam TNF-α pré-formado e sintetizam novo TNF-α proporcionando uma rápida exposição dos tecidos próximos, a quantidades significantes desse mediador (Galli et al., 1991)

1.7.3. IMPORTÂNCIA DOS MASTÓCITOS NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA.

Os mastócitos eram vistos, até pouco tempo, unicamente como as células que desencadeavam as reações de alergias agudas ou eram capazes de gerar alguns metabólitos do ácido araquidônico. Todavia, hoje têm se revelado como células capazes de orquestrar um grande número de reações inflamatórias liderando, em alguns casos, a infiltração de leucócitos, sendo este efeito desencadeado em período de algumas horas e citocina dependente (Galli, 1993).

Segundo a literatura, em certos eventos inflamatórios IgE dependentes os mastócitos podem simplesmente iniciar a resposta inflamatória, mas em outros casos podem influenciar o processo de outra forma, ou seja, iniciar ou propagar mecanismos independentes da sua ativação direta. Por exemplo, muitas evidências sugerem que mastócitos participariam da estimulação de células T, que por sua vez, contribuiriam de forma importante, para o desenvolvimento da asma alérgica crônica (Schwartz et al., 1984)

A consideração de que citocinas liberadas por mastócitos podem ser responsáveis por consequências clínicas importantes em determinados estados patológicos também é fato marcante. Além disto mastócitos têm sido implicados em várias doenças que são acompanhadas por neovascularização e o exato mecanismo que envolve mastócitos e angiogênese ainda não é claro, mas há indício de que o fator de crescimento endotelial/ fator de permeabilidade vascular (VEGF/VPF) de linhagem de mastócitos da pele humana HMC-1 possam estar implicados nesse fato (Grützkau et al., 1998).

Mastócitos são, enfim, considerados como células amplificadoras da reação inflamatória por liberarem ou estimularem a produção de muitos mediadores que por sua vez podem atuar aumentando a permeabilidade

vascular ou mais tardiamente contribuindo para a migração e infiltração neutrofílica (Galli, 1993).

A identificação do papel específico desta célula no processo inflamatório, pode ser bastante complexa. O desenvolvimento de drogas ou mesmo o descobrimento de ferramentas farmacológicas que permitissem estudos *in vivo* mais precisos sobre o real papel dessas células no organismo, poderia contribuir significativamente para a solução definitiva ou melhor manipulação terapêutica de condições patológicas comuns como asma alérgica aguda e crônica ou condições mais específicas como angiogênese e crescimento tumoral.

É de conhecimento comum que durante a reação inflamatória uma variedade de substâncias são formadas e liberadas concomitante ou sequencialmente no local da agressão. Esses mediadores inflamatórios estão envolvidos na síntese e/ou manutenção dos eventos característicos do processo inflamatório. Muitos desses mediadores são de natureza protéica. Entre esses citam-se a histamina, serotonina e bradicinina (BK), taquicininas (substância P, neurocininas A e B) e citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, etc.), componentes do sistema de coagulação/fibrinólise e do complemento (C3a e C5a) além das prostaglandinas da série E (PGE) e prostaciclina (PGI) que são importantes mediadores da inflamação, sendo a terapêutica antiinflamatória atual baseada fundamentalmente na inibição da geração destes metabólitos do ácido araquidônico.

Assim, mesmo sendo, a reação inflamatória considerada um fenômeno estereotipado, hoje em dia são inúmeras as evidências mostrando que existem complicações, que justificam, o estabelecimento de terapêuticas específicas. Desta forma, acreditamos que a utilização de modelos animais que permitam ampliar os conhecimentos sobre a fisiopatologia da inflamação, nos quais possamos utilizar ferramentas de baixo custo e oriundas do nosso próprio

meio, é fundamental. Portanto, a utilização de agentes injuriantes, como toxinas protéicas, peptídeos ou outras substâncias químicas, extraídas por exemplo, da pele da *L. labyrinthicus*, animal típico da nossa região, podem potencialmente ativar etapas específicas e se constituir em ferramentas de valor inestimável.

Sabemos que muito ainda há a esclarecer sobre a secreção cutânea dos anfíbios e em particular desse animal. Estudos têm demonstrado que há uma grande diversidade de compostos já conhecidos química e farmacologicamente. Todavia, são ainda muitas as correlações a serem feitas entre estes compostos e as funções fisiológicas em mamíferos. Cumpre, então, ressaltar que a descoberta de novos componentes químicos na pele desses animais ou mesmo o aprofundamento dos estudos sobre os já existentes, possibilitará a obtenção de ferramentas de importantes aplicações farmacológicas. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

2. OBJETIVOS

GERAIS

- Isolar e avaliar os efeitos pró-inflamatórios de substâncias extraídas da pele da *Leptodactylus labyrinthicus*.
- Estudar o efeito pró-inflamatório destes fatores em modelos clássicos de inflamação experimental.

ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito dos fatores isolados sobre eventos inflamatórios como edema e permeabilidade vascular;
- Investigar o efeito de um fator isolado sobre a atividade pró-inflamatória com relação a migração de neutrófilos, e eosinófilos;
- Investigar o mecanismo envolvido na possível atividade pró-inflamatória, utilizando um fator isolado.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS

Foram utilizadas rãs *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) capturadas na cidade de São Gonçalo do Amarante, no estado do Ceará e transportadas em caixas perfuradas para o laboratório de Neurobiologia Molecular Humana, no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - UFC.

Utilizou-se também ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, adultos, ambos os sexos, com pesos entre 150 a 200g, procedentes do biotério central do Campus do Pici - UFC e do biotério setorial da instituição supracitada. Todos os animais foram mantidos em condições ambientais semelhantes antes do uso, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*.

2.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- HPLC - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência; modelo SCL-10^A, SPD-10AV, LC-10AS, Shimadzu - Japão.
- Chromatopac C-RGA, Shimadzu - Japão
- HPLC; modelo SPD - 10A, LCAS, Shimadzu - Japão
- Chromatopac C - R6A, Shimadzu - Japão
- Registrador EGB - SP, Brasil
- Centrífuga Excelsa Baby I; modelo 206 (FANEM)
- Centrífuga refrigerada Beckman; modelo J- 212 C, Beckman instruments, USA.
- Coluna Shim - pack prep. ODS (H)
- Coluna C - 18 LC shim-pack CLC-ODS

- Liofilizador Metal lux
- Balanças analíticas (Metler e Marte)
- Capela de Fluxo Laminar (VECO)
- Espectrofotômetro (Spectronic Instruments ou Spectronic 20 GenesysTM, USA).
- Pletismógrafo (UGO BASILE)
- Microscópio óptico binocular (NIKON)
- Medidor de pH
- Autoclave (SOC. FABRE)
- Câmaras de Neubauer (0,100/0,0025mm²)
- Agulhas fenestradas
- Lâminas para microscopia
- Papel filtro qualitativo (REAGEN - QUIMIBRAS)
- Alicates para deslocamento cervical
- Seringas de 1, 5, 10 e 20 ml (B-D-PLASTIPAK)
- Tubos de polipropileno para centrifuga (GIBCO) de 12 ml e 15ml
- Tubos de ensaio
- Micropipetas (LABSYSTEMS ou GILSON)
- Material cirúrgico (pinças e tesouras)
- Placas de Petri
- Balão volumétrico
- Becker
- Erlenmayer

2.3-SOLUÇÕES, DROGAS E CORANTES UTILIZADOS

- Salina tamponada com fosfato (PBS):

Cloreto de sódio P.A	8,0g
Cloreto de potássio P.A	0,2g
Fosfato de sódio dibásico P.A	1,15g
Fosfato de sódio monobásico P.A	0,2g
Água destilada	1,0 litro
O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl	

- Solução de Albumina 3% (REAGEN):

Albumina bovina	3,0g
Água destilada	100,0 ml

- Solução de Ringer - Locke

Cloreto de Sódio P.A.....	9,0g
Cloreto de Potássio P.A.....	0.42g
Cloreto de Cálcio P.A.....	0.23g
Carbonato de Sódio P.A.....	0.15g
Glicose.....	0.99g
Água destilada.....	1,0 litro

- Solução para Pletismógrafo

Cloreto de Sódio P.A	45,0 mg
Solução padrão (.....)	0.3 ml
Água destilada.....	100,0 ml

- Solução de Acetonitrila

Acetonitrila (CARLO HERBA)	1,0 litro
Ácido Trifluoracético P.A (MERCK).....	0,2 ml

- Solução de Ácido Trifluoracético

Ácido Trifluoracético P.A (MERCK).....	0,5 ml
Água bidestilada	1,0 litro

- Solução de Azida**- Solução de Adrenalina****-Azul de Toluidina**

Azul de Toluidina.....	100,0 mg
Álcool Etilico P.A	70,0 ml
Água destilada.....	30,0 ml

O pH foi ajustado para 1.8 - 2.0 com HCl (5 ml/l).

- Azul de Evans

Azul de Evans	100,0 mg
Salina 0.9%.....	2,0 ml
Água destilada.....	2,0 ml

- Líquido de Turk

Ácido acético glacial P.A	20, 0 ml
Violeta de genciana	2,0 ml
Água destilada	1,0 litro

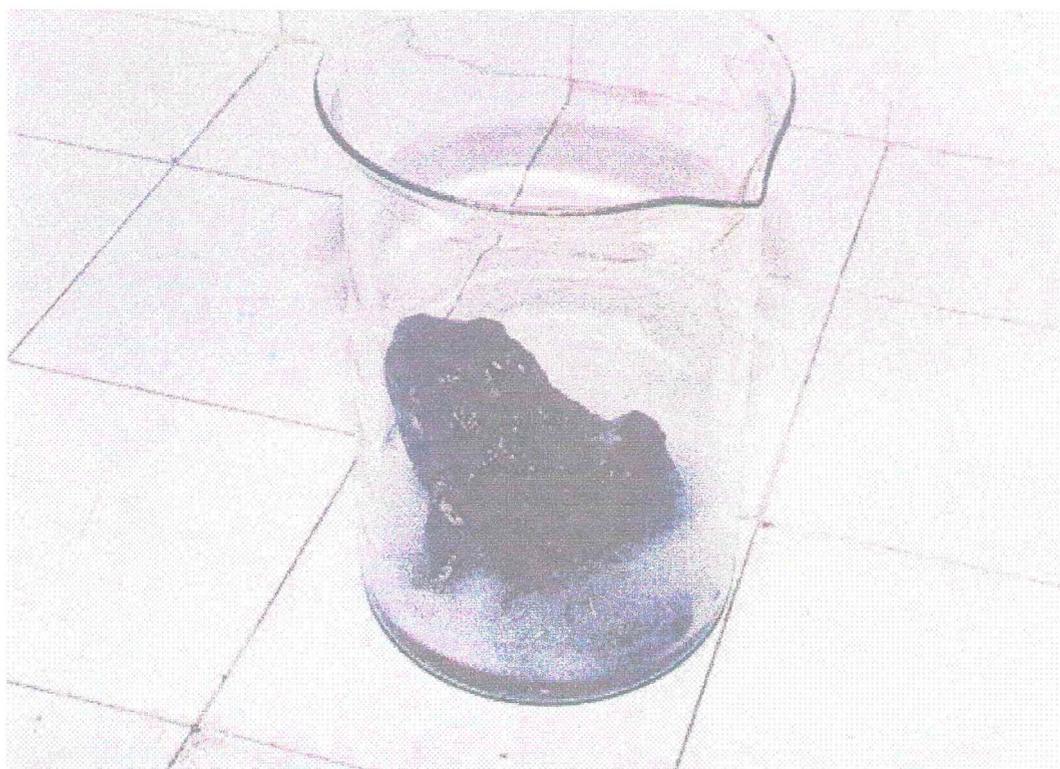
As diluições foram feitas em solução salina 0,9% estéril.

- **Dextrana** (Dextran 70, PHARMACIA, UPPSALA);
 - **Leucotrieno B₄** (SIGMA): solução de estoque de 3×10^{-4} M em etanol;
 - **Ciproheptadina** (PRODOME);
 - **Acetato de dexametasona**(PRODOME);
 - **Indometacina** (SIGMA);
 - **Mepiramina** (SIGMA);
 - **Mepacrina** (SIGMA);
 - **Composto 48/80** (SIGMA);
 - **HOE-140** (SIGMA); **MK-886** (SIGMA);
 - **Metisergida** (SIGMA).
-
- **Corante rápido HEMA 3**
 - **Hematoxilina** (REAGEN)
 - **Eosina** (MERCK)

2.4..PROTOCOLO EXPERIMENTAL - PARTE 1

2.4.1. EXTRAÇÃO DO VENENO

A *Leptodactylus labyrinthicus* foi banhada com água destilada e em seguida foi injetada no seu dorso, por via subcutânea, 1 ml de adrenalina 100µg/ml em ácido clorídrico 0,01N, ficando então em repouso por 20 minutos. Após esse período as rãs são massageadas para aumentar o estresse e facilitar a liberação do veneno pelas glândulas granulosas como mostra a figura abaixo. Solução de azida foi adicionada à esta secreção e colocada sob refrigeração à 4°C por um período de 24 horas, após o qual o material foi centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada, sendo o sobrenadante liofilizado e o precipitado descartado.



Liberação de secreção venenosa pelas glândulas granulosas da pele de *L. labyrinthicus*

2.4.2. PURIFICAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DO VENENO EM HPLC COM COLUNA PREPARATIVA

O extrato bruto de veneno, após liofilização, foi ressuspenso com água bidestilada acrescida de TFA a 0,05% e centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi então fracionado em HPLC acoplado a coluna preparativa C-18 (Shim pack prep. ODS 2,5x30 cm), eluído com um fluxo de 5 ml/min e um gradiente de acetonitrila variando de 5 a 80% em 103 minutos, seguindo-se um programa específico.

O HPLC utilizado era dotado de um detector de absorção de luz ultravioleta (com comprimento de onda de 214 nm e sensibilidade de 500 Hz), acoplado a um registrador. As frações ou picos eram coletados, no instante em que apareciam no registrador, liofilizados, pesados e armazenados ou ressuspenso em água bidestilada para testes farmacológicos.

	TEMPO	FUNÇÃO	GRADIENTE
0	0,01	T.Flow	1,00
1	0,01	B.Conc	5,00
2	5,00	T.Flow	5,00
3	20,00	B.Conc	10,00
4	33,00	B.Conc	10,00
5	36,00	B.Conc	27,50
6	54,00	B.Conc	30,00
7	68,00	B.Conc	30,00
8	75,00	B.Conc	45,00
9	78,00	B.Conc	80,00
10	88,00	B.Conc	80,00
11	93,00	B.Conc	5,00
12	103,00	B.Conc	5,00
	$\lambda = 214 \text{ nm}$	T.Flow = Tempo de Fluxo	
	$f = 500 \text{ Hz}$	B.Conc = Concentração de Acetonitrila	

2.4.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA “FRAÇÃO 5” EM HPLC COM COLUNA ANALÍTICA.

Uma alíquota da Fr 5 foi injetada no HPLC em uma coluna fina analítica específica, obedecendo-se as seguintes condições:

- Injeção: 20µl da solução de 10 mg/ml
- Coluna utilizada: coluna fina analítica
- Eluente: acetonitrila
- Gradiente: 20%
- Tempo de retenção: 40min
- Fluxo: 1ml/min
- Detector: absorção de luz ultravioleta com comprimento de onda de 214 nm.
- Programa: descreve-se abaixo

#	TEMPO	FUNÇÃO	GRADIENTE
0	0,01	T.Flow	1,00
1	0,01	B.Conc	0,00
2	40,00	B.Conc	20,00
3	43,00	B.Conc	0,00
4	53,00	B.Conc	0,00

2.4.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A massa da substância natural foi determinada em colaboração com a Universidade Nacional de Brasília por espectrometria de massa usando um Perkin Elmer-Sciex API 300 electrospray-triple quadrupole mass spectrometer de acordo com a metodologia utilizada por Kalume et al., 1995.

2.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL - PARTE 2

2.5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA

Os estudos da atividade pró-inflamatória iniciaram-se na forma de “screening”, para o qual sendo tomados inicialmente o extrato bruto do veneno (EBL) e cinco frações isoladas e denominadas: Fr 1, Fr 5, Fr 6, Fr 7 e Fr 14. Como a “fração 5” apresentou atividade edematogênica significativa visível e mensurável nos primeiros 30 minutos e na cromatografia em coluna preparativa apresentava-se mais isolada e com menor probabilidade de contaminação, foi escolhida para aprofundamento dos estudos farmacológicos.

2.5.2. EDEMA DE PATA EM RATOS

Os animais foram pesados e divididos em grupos de 6 animais cada. Tendo suas patas direitas traseiras marcadas a nível da borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e medido seus volumes em pletismógrafo (método adaptado de Winter et al., 1962). A seguir os animais foram tratados com 0,1ml/pata do extrato bruto de veneno (1:20, 1:5 ou puro) ou das frações purificadas (Fr) puras ou diluídas, através de uma injeção subcutânea na região plantar. O volume da pata foi medido em pletismógrafo (UGO BASILI, ITALY) antes e 30 min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após injeção da Fr. O volume do edema foi dado pela diferença entre o volume final e o volume inicial (antes da injeção do estímulo) das patas medidas. Em seguida os animais foram sacrificados e a pele e subcutâneo da região plantar dos animais tratados com a Fr 5 foi retirada, fixada em formol a 10% e processadas pelo método de coloração pela hematoxilina e eosina.

2.5.3-INIBIÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA Fr₅ POR MEPIRAMINA, CIPROHEPTADINA, DEXAMETASONA, MK886, MEPACRINA, INDOMETACINA OU HOE140

Os animais foram pesados e divididos em grupos de 6 animais cada. Tendo suas patas direitas traseiras marcadas a nível da borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e medido seus volumes em pletismógrafo (método adaptado de Winter et al., 1962). Em seguida receberam injeção prévia, 1 hora antes de mepiramina na dose de 5 ou 10mg/kg por via intraperitoneal; ciproheptadina na dose de 6mg/kg por via intraperitoneal; dexametasona na dose de 0,5 ou 1mg/kg por via subcutânea; MK 886 na dose de 1mg/kg por via intraperitoneal; mepacrina na dose de 20mg/kg por via subcutânea; indometacina na dose de 2mg/kg por via subcutânea; Hoe na dose de 0,6 ou 1mg /kg por via endovenosa; ou solução salina 0,9%-0,1ml/animal pela via correspondente.

Após 1 hora todos os animais receberam uma injeção subcutânea na região plantar das patas direitas traseiras, de 0,1ml de Fr 5, na dose de 800mg/ml. O volume da pata foi medido em pletismógrafo (UGO BASILI, ITALY) antes e 0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 horas após injeção da Fr 5. O volume do edema foi dado pela diferença entre o volume final e o volume inicial das patas medidas antes da injeção da fração.

2.5.4- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA Fr 5 DA PELE DE *L. LABYRINTHICUS*.

Os animais foram pesados e divididos em quatro grupos de seis animais cada. Após pesados foram tratados duas vezes ao dia em intervalos regulares de doze horas com 0,6 mg/kg de composto 48/80 ou salina por via intraperitoneal. No quarto dia de tratamento os animais receberam 1,2 mg/kg

2.1173910/99
de composto 48/80 ou salina. No quinto dia os animais foram tratados com 800mg/0,1ml de Fr 5 ou 100mg/0,1ml de dextrana. O volume da pata foi medido em pletismógrafo (UGO BASILI, ITALY) antes e 0,5, 1, 2, 3, 4 horas após injeção da Fr 5 ou dextrana. O volume do edema foi dado pela diferença entre o volume final e o volume inicial das patas medidas antes da injeção da fração.

2. 5.5-DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS *IN VITRO*.

Ratas Wistar foram sacrificadas e cortes do mesentério foram retirados e colocados em solução de Ringer-Locke. As peças de mesentério foram incubadas por 30 minutos em 20ml de solução de Ringer-Locke, contendo as frações de veneno a serem testadas (200, 400 e 800 $\mu\text{g/ml}$). Como controle positivo de degranulação foi utilizado o composto 48/80, na dose de 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Após o período de incubação as peças permaneceram em placa de Petri a temperatura ambiente. Após 30 minutos o tecido foi retirado das placas e colocado sobre lâmina, após secagem, corado com azul de toluidina por 2 min, lavado com água destilada e colocado para secar. Após a secagem a gordura foi retirada do tecido com auxílio de uma lâmina de bisturi. Foram contadas 100 células em diferentes campos com auxílio de microscópio óptico (aumento de 400 vezes). O percentual de degranulação foi considerado tomando-se por base o grupo controle que recebeu apenas salina 0,9%.

2.5.6-AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR ASSOCIADO A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS *IN VIVO* E MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.

Os animais foram previamente tratados com 1ml da fração 5 ou salina por via intraperitoneal. Em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento. Estes animais receberam azul de Evans, por via endovenosa, 30 minutos antes do sacrifício.

Em seguida a cavidade peritoneal foi lavada com 10ml de solução de PBS, contendo 5 ui/ml de heparina. O exsudato colhido foi utilizado para medida da quantidade de azul de Evans em espectrofotômetro a 600nm e para avaliação da migração de neutrófilos conforme o item 5.3.7. A quantidade de azul de Evans presente foi calculada com base na equação da reta, construída com diluições conhecidas de azul de Evans. O abdome do animal foi aberto para retirada do mesentério que foi corado pelo azul de toluidina por 2 min, lavado com água destilada e colocado para secar. Após a secagem a gordura foi retirada do tecido com auxílio de uma lâmina de bisturi. Foram contadas 100 células em diferentes campos com auxílio de microscópio óptico (aumento de 400 vezes). O percentual de degranulação foi considerado tomando-se por base o grupo controle que recebeu apenas salina 0,9%.

2.5.7-AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EOSINÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL

Os animais foram previamente tratados com 1ml do estímulo inflamatório (Fr 5) ou salina por via intraperitoneal. Foram sacrificados por deslocamento cervical 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento quando se

desejou avaliar migração de neutrófilos e 24 horas após o tratamento, quando se desejou avaliar migração de eosinófilos.

Em seguida a cavidade peritoneal foi lavada com 10ml de solução PBS, contendo 5 ui/ml de heparina. O abdômen do animal foi agitado levemente e foram coletados cerca de 5ml de fluido da lavagem com agulha fenestrada, conectada a uma seringa de 10ml. As contagens total e diferencial foram realizadas baseadas no método de Souza e Ferreira (1985).

Do exsudato colhido, 20 μ l foram diluídos em 380 μ l de líquido de Turk (diluição 1:20) e usados para contagem total de células em câmara de Neubauer.

Para a contagem diferencial de células, 30 μ l do exsudato foi colocado em citocentrífuga por 10 minutos a 2.800rpm. As lâminas retiradas da citocentrífuga foram coradas com corante rápido HEMA 3. A leitura foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). Foram contadas 100 células em cada orifício (200 células /lâmina). O total foi dividido por 2, resultando na percentagem de cada tipo de célula. O número total de neutrófilos e eosinófilos foi estimado calculando-se as percentagens do número total de células encontradas.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm EPM de um certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA). A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey. Nos experimentos de cinética usamos análise de variância para medidas repetidas a fim de avaliar a diferença entre as curvas.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. EXTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE VENENO DA PELE DA RÃ *Leptodactylus labyrinthicus*

Da excreção da pele das rãs *Leptodactylus labyrinthicus* foi obtido, por liofilização, um pó branco posteriormente ressuspense para purificações sucessivas em HPLC.

3.2. PURIFICAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DO VENENO EM HPLC COM COLUNA PREPARATIVA

Uma alíquota de 2,5ml do extrato bruto, ressuspense em água bidestilada na proporção de 20mg/ml, foi submetida à HPLC com coluna preparativa. O material resultante, dividido em vários picos, foi coletado e submetido a posterior liofilização.

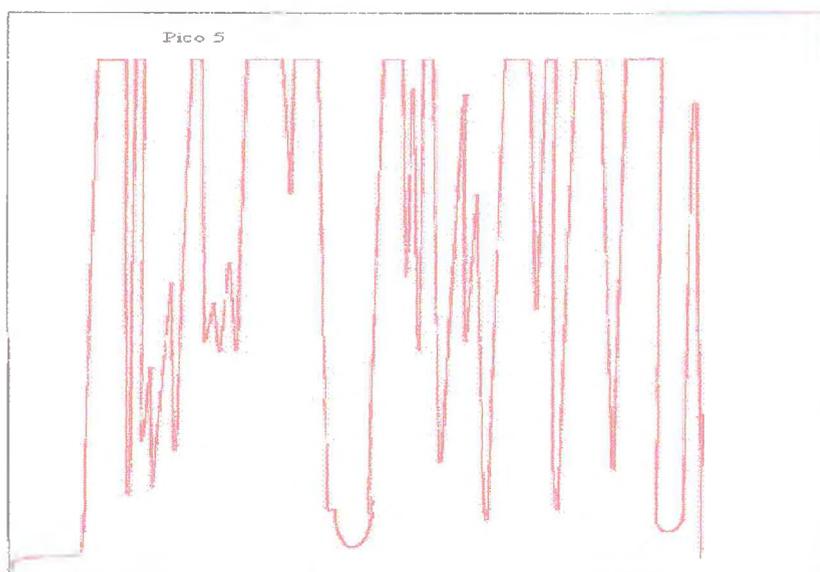


Figura 1. Perfil de eluição dos diversos picos obtidos a partir do extrato bruto de pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* em coluna preparativa.

3.3.DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DA FRAÇÃO 5 EM HPLC COM COLUNA ANALÍTICA.

A fração 5, correspondente ao pico 5, foi escolhida para aprofundamento de estudos farmacológicos após a realização dos primeiros ensaios, por apresentar atividade pró-inflamatória com um edema mensurável já nos primeiros 30 minutos e que perdurava por 24 horas o que sugere a participação de outros mediadores inflamatórios que não aminas vasoativas, bem como por apresentar-se mais facilmente purificável quando da análise do cromatograma oriundo da passagem por coluna preparativa. O cromatograma da coluna analítica, mostra uma substância completamente pura ($\cong 99\%$ de pureza), conforme demonstrado abaixo.



Figura 2. Perfil de eluição da fração 5 obtida a partir do extrato bruto de pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* em coluna analítica.

3.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A massa molecular de Fr 5, determinada por espectrometria está em torno de 2490 D.

3.5. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO PELO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* (EBL) EM PATA DE RATO.

O EBL injetado por via subcutânea intraplantar induziu edema significativo ($p < 0,05$) já nos primeiros 30 minutos após a injeção; com pico em 2 horas quando injetado bruto e em 1 hora quando injetado nas diluições 1:5 e 1:20. Como se pode observar na figura 3.

3.6. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO POR FRAÇÕES EXTRAÍDAS DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* (EBL) EM PATA DE RATO.

As frações 1, 5, 6, 7 e 14 (2mg/kg administradas por via subcutânea intraplantar induziram edema significativo ($p < 0,05$) já nos primeiros 30 minutos após a injeção; com pico em 1 hora, sendo apenas a fração 14 desprovida de qualquer efeito edematogênico. Como é mostrado no gráfico 4.

3.7. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* EM PATA DE RATO.

A fração 5 (400 μ g, 800 μ g e 2mg/kg) administrada por via subcutânea intraplantar induziu edema significativo ($p < 0,05$) já nos primeiros 30 minutos após a injeção; com pico em 1 hora para as diferentes doses. Como se pode observar no gráfico 5.

A figura 6 mostra em microfotografia o edema significativo induzido pela injeção de Fr 5 após 30 minutos de sua injeção, bem como o infiltrado celular inflamatório presente já na 2^a hora.

3.8. CINÉTICA DA INIBIÇÃO POR MEPIRAMINA, METISERGIDA, HOE 140 E CIPRO-HEPTADINA DO EDEMA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* EM PATA DE RATO.

A administração de Mepiramina (5 e 10mg/Kg) ou HOE 140 (0,6 e 1mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) e de forma dose dependente, o edema induzido pela fração 5 (800 μ g/Kg), como é mostrado nos gráficos 7 e 10. A administração de Cipro-heptadina (6mg/Kg) e Metisergida (0,3 e 1mg/Kg) foi eficaz em inibir quase que completamente o edema induzido pela fração 5 como mostram os gráficos 8 e 9.

3.9. CINÉTICA DO EDEMA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* (EBL) EM PATA DE RATO APÓS DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS PELO COMPOSTO 48/80.

O pré-tratamento dos animais, por via intraperitoneal, por quatro dias consecutivos duas vezes ao dia com composto 48/80 (0,6mg/Kg nos três primeiros dias e 1,2mg/Kg no quarto dia) resultou em uma inibição significativa ($p < 0,05$) do edema induzido pela Fr 5 (800 μ g/Kg) ou do edema induzido por Dextran (100 μ g/0,1ml) como é mostrado na figura 11.

3.10. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS*, COMPOSTO 48/80 OU SOLUÇÃO SALINA 0,9% NA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO DA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS *IN VITRO*.

A fração 5 (200, 400 e 800 μ g/ml) induziu degranulação significativa $p < 0,05$ de mastócitos quando comparada ao grupo que recebeu salina e degranulação equivalente ao composto 48/80 especialmente quando a incubação do mesentério foi feita com a maior dose (800 μ g/ml). Conforme se pode observar na figura 12.

A figura 13 mostra em microfotografia, o efeito significativo sobre a degranulação de mastócitos quando da incubação do mesentério do animal com a Fr 5 (800 μ g/ml) ou composto 48/80.

3.11. CINÉTICA DA INIBIÇÃO, POR DEXAMETASONA, MK 886, MEPACRINA E INDOMETACINA, DO EDEMA INDUZIDO PELA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* EM PATA DE RATO.

A administração de Dexametasona (1mg/Kg) por via subcutânea ou MK 886 (1mg/Kg) por via intraperitoneal inibiu significativamente ($p < 0,05$) edema induzido pela fração 5 (800 μ g/Kg), como é mostrado nos gráficos 14 e 15. A administração de Dexametasona (0,5mg/Kg) ou Mepacrina (20mg/Kg) inibiu significativamente $p < 0,05$ apenas o pico do edema como se pode perceber pelas figuras 14 e 15. A injeção subcutânea de Indometacina (2mg/Kg) não inibiu o edema de pata induzido pela Fr 5. Como mostra a figura 16.

3.12. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* OU SOLUÇÃO SALINA 0,9% NO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR, DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITO E MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS *IN VIVO*.

A administração, por via intraperitoneal, da fração 5 (800 μ g/ml), induziu significativo ($p < 0,05$) extravasamento de azul de Evans para a cavidade peritoneal de ratos sacrificados 30 minutos após a administração do mesmo e 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com Fr 5, com pico em uma hora. Como pode ser observado na figura 17. A mesma cinética foi observada em relação a degranulação de mastócitos (figura 18). A

administração, por via intraperitoneal, da fração 5 (800 μ g/ml), induziu uma discreta porém significativa ($p < 0,05$) migração de neutrófilos (figura 19).

3.13. EFEITO DA FRAÇÃO 5 EXTRAÍDA DO EXTRATO BRUTO DE *L. LABYRINTHICUS* OU SOLUÇÃO SALINA 0,9% NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS *IN VIVO*.

A administração, por via intraperitoneal, da fração 5 (800 μ g/ml), ou de leucotrieno B₄ (25ng) induziu uma significativa ($p < 0,05$) migração de eosinófilos (figura 20).

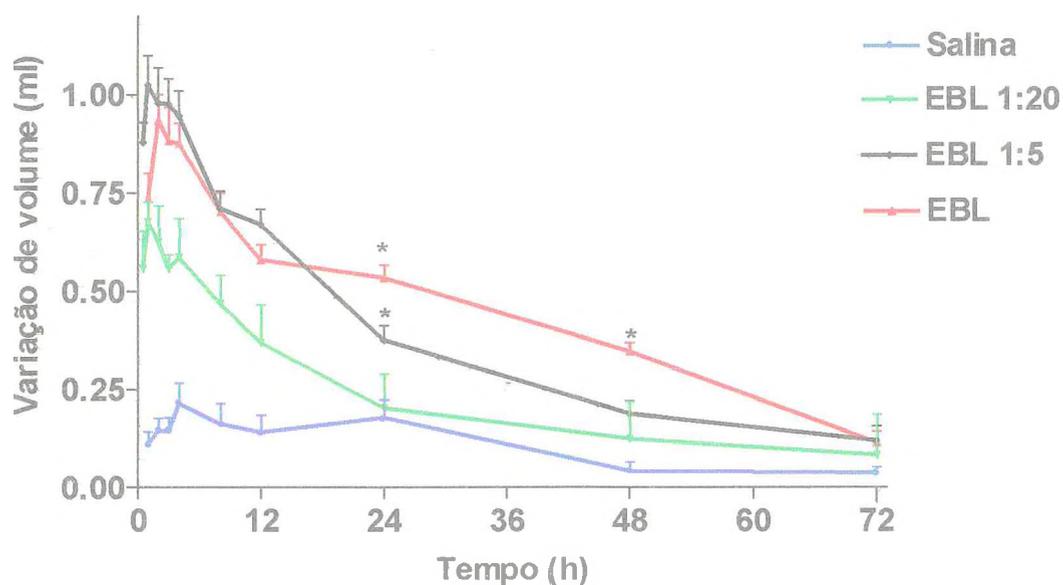


Figura 3. Cinética do edema induzido pelo extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. EBL(puro, 1:5, 1:20) ou salina foram administradas por via subcutânea intraplantar. O edema foi medido 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

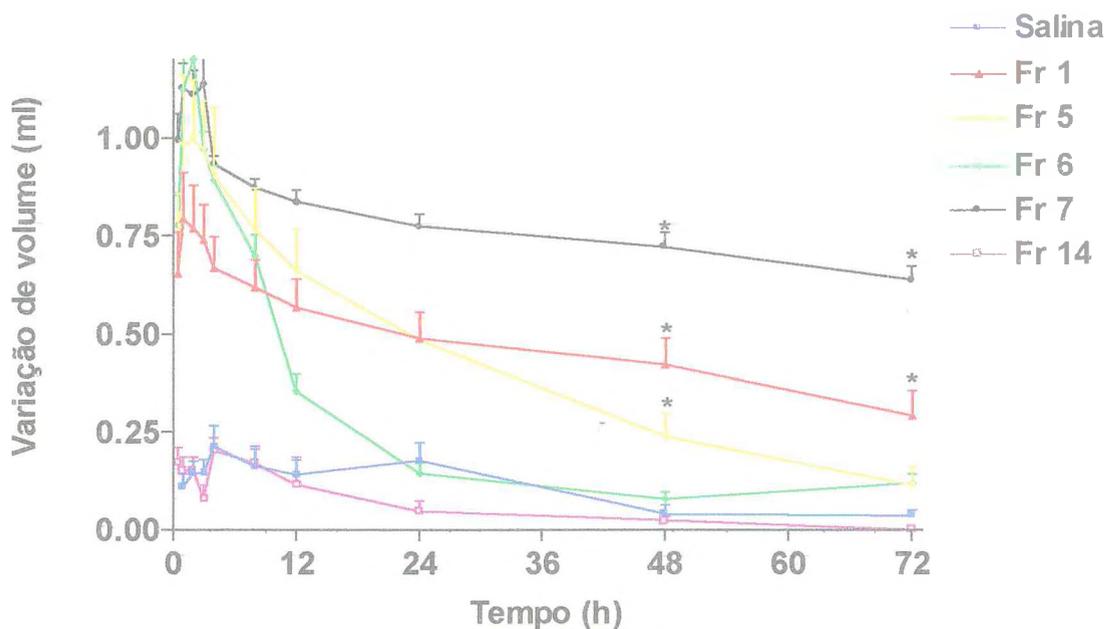


Figura 4. Cinética do edema induzido por frações extraídas do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. As frações 1, 5, 6, 7 e 14 (2mg/kg) ou salina foram administradas por via subcutânea intraplantar. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), $n = 6$. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

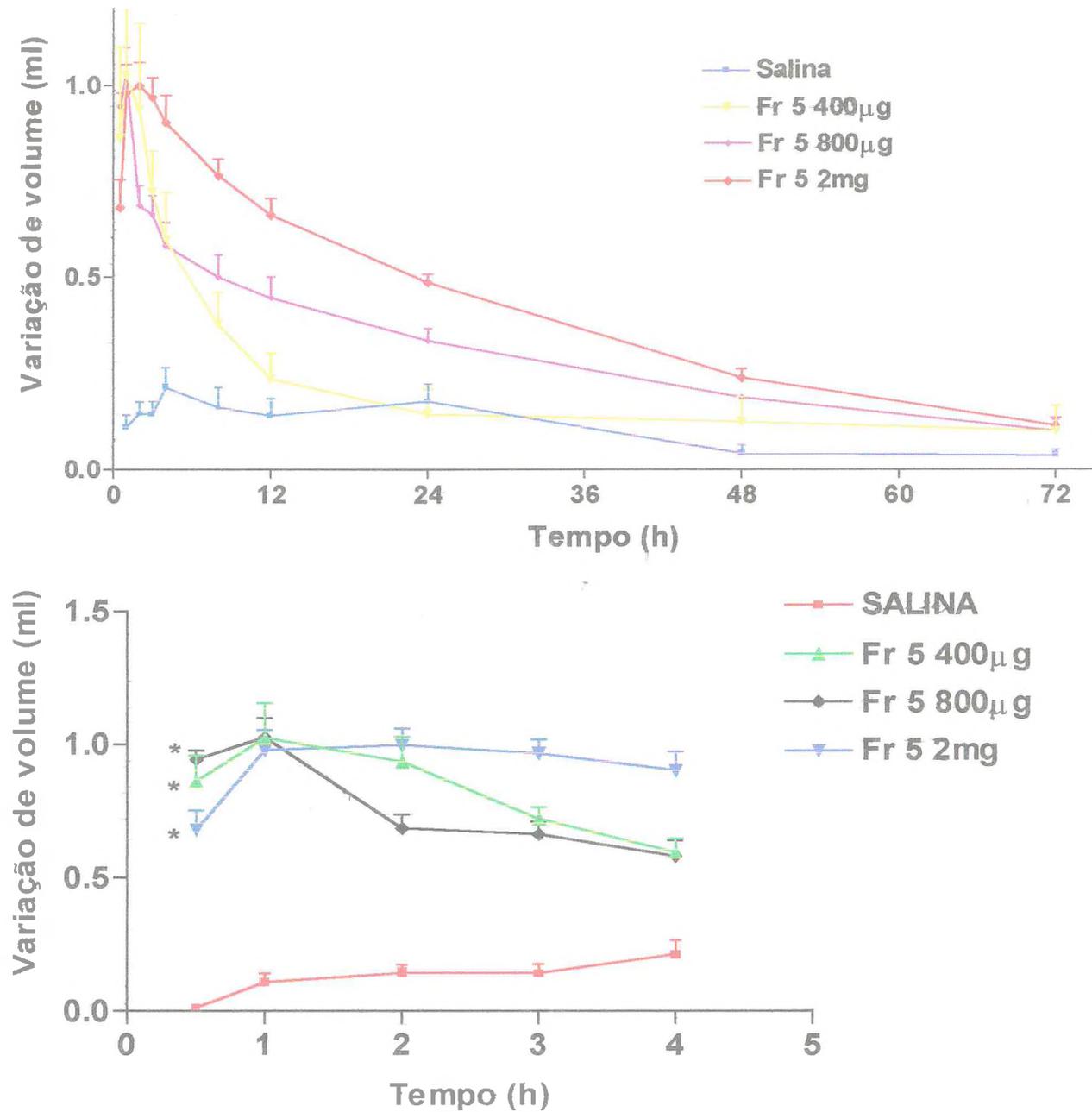


Figura 5. Cinética do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (400µg, 800µg e 2mg) ou salina foram administradas por via subcutânea intraplantar. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas). O segundo gráfico representa uma amplificação do curso do edema de F5 até 4 horas.

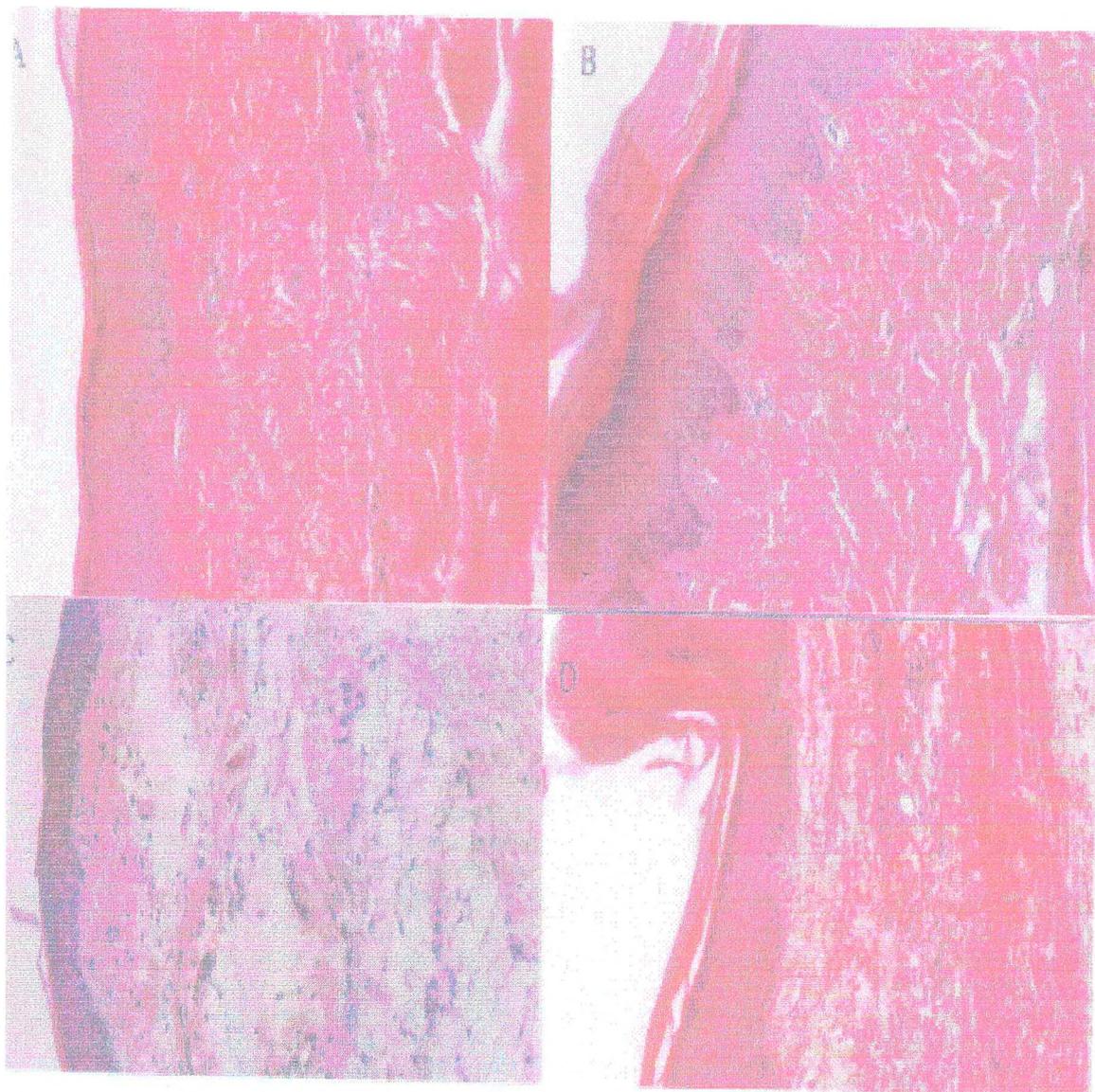


Figura 6. Microfotografia da pele e tecido celular subcutâneo da região plantar da pata traseira de ratos. Observa-se claramente um acentuado edema na pata dos animais, 30 minutos após a injeção intraplantar da fração 5 (C), quando comparado com a pata de um animal que recebeu solução salina 0,9% ipl (A). Após 2 horas da injeção do estímulo observa-se ainda edema e presença de infiltrado celular inflamatório nas patas dos animais que receberam a fração 5 (D), quando comparados com os animais que receberam salina 0,9%(B). HE, 100x.

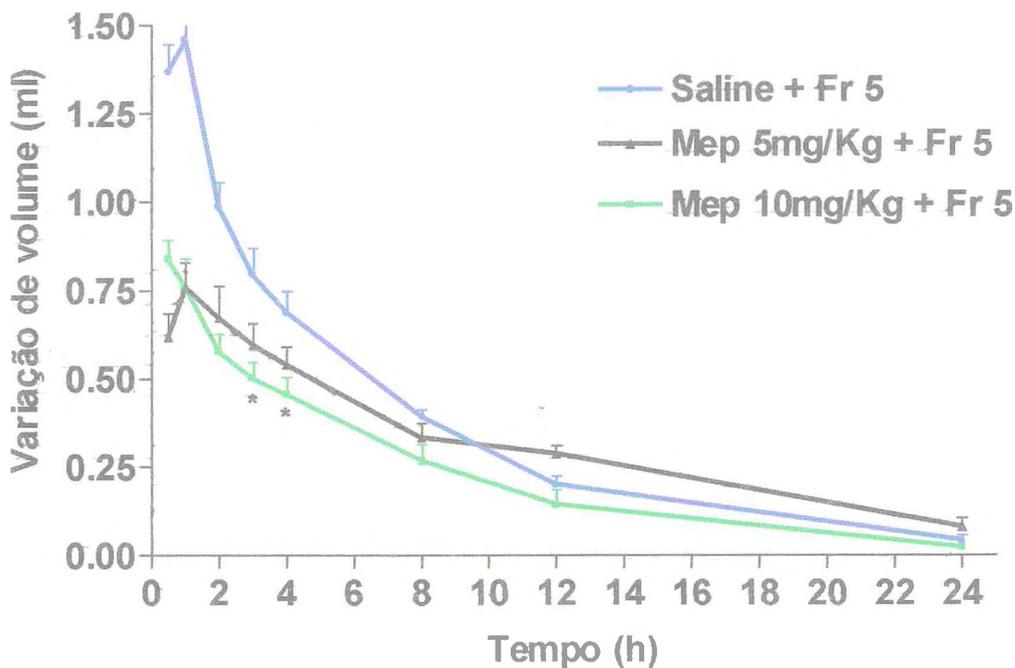


Figura 7. Cinética da inibição por Mepiramina (Mep) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de Mepiramina (5mg/Kg e 10mg/Kg) por via intraperitoneal. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

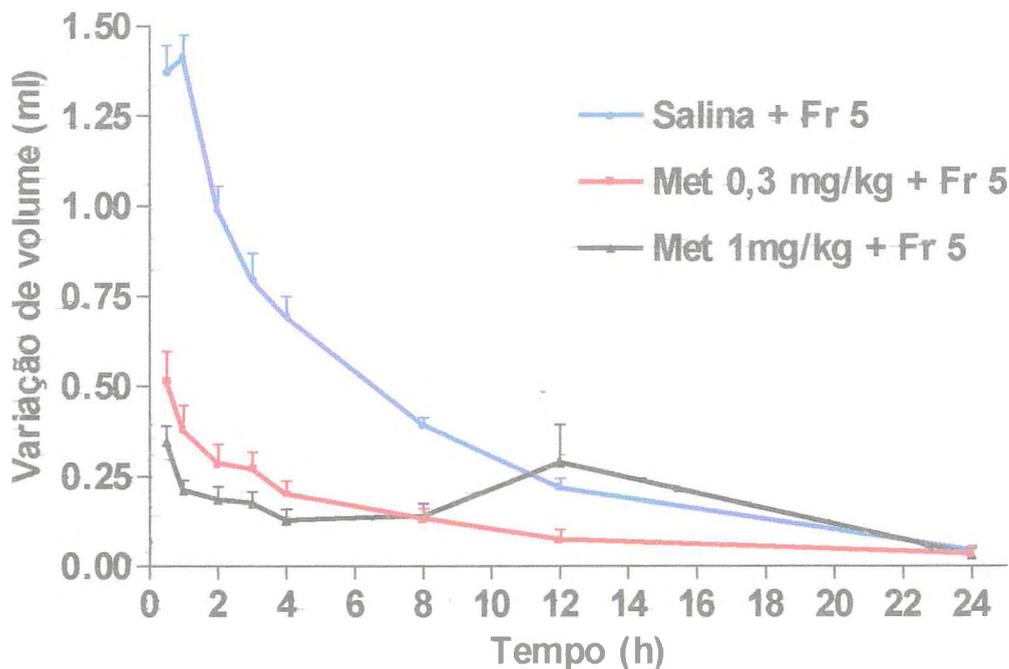


Figura 8. Cinética da inibição por Metisergida (Met) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de Metisergida (0,3mg/Kg e 1mg/Kg) por via intraperitoneal. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

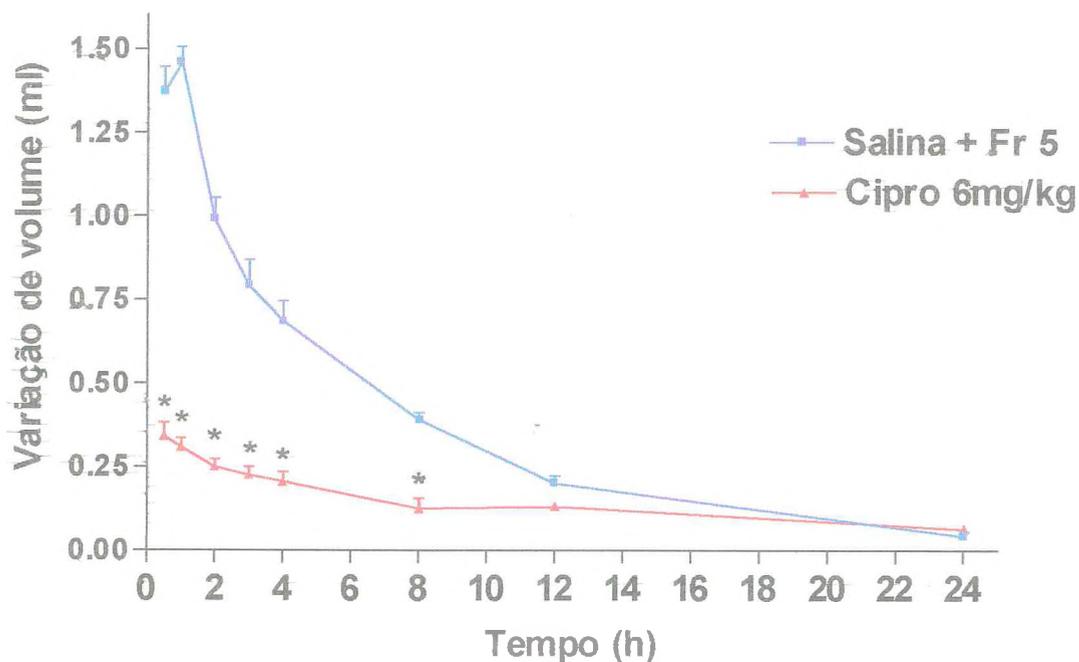


Figura 9. Cinética da inibição por Cipro-heptadina (Cipro) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de Cipro-heptadina (6mg/Kg) por via intraperitoneal. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

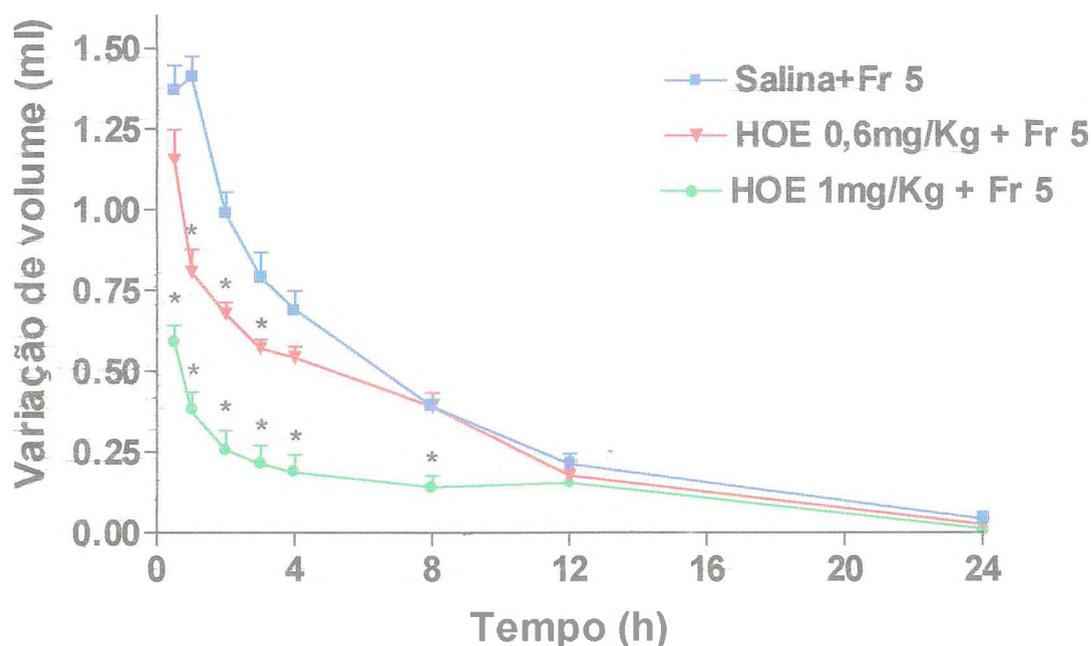


Figura 10. Cinética da inibição por HOE 140 do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) foi administrada por via subcutânea intraplantar 30 minutos após a injeção de HOE 140 (0.6mg/Kg e 1mg/Kg) por via endovenosa. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas)

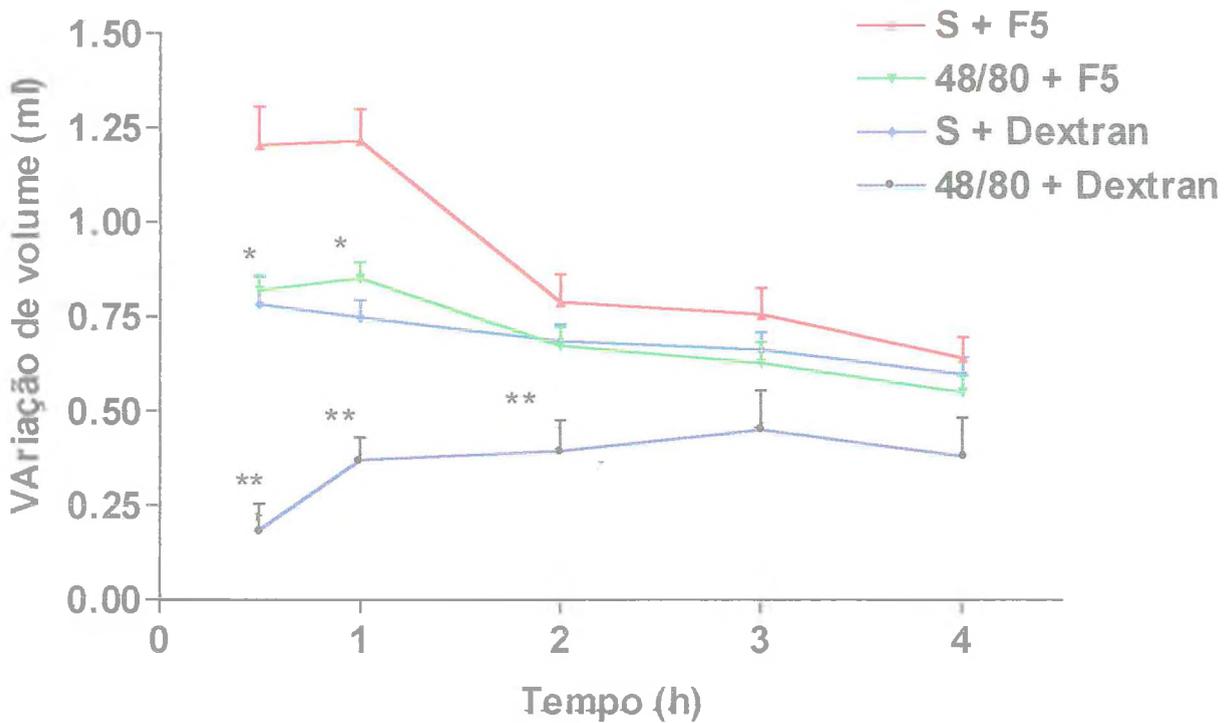


Figura 11. Cinética do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato após depleção de mastócitos pelo composto 48/80. A fração 5 (800 μ g/Kg) ou Dextran (100 μ g/0,1ml) foram administradas por via subcutânea intraplantar no quinto dia após tratamento consecutivo dos animais com composto 48/80. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3 e 4 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo correspondente (Fr 5 ou Dextran) e que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

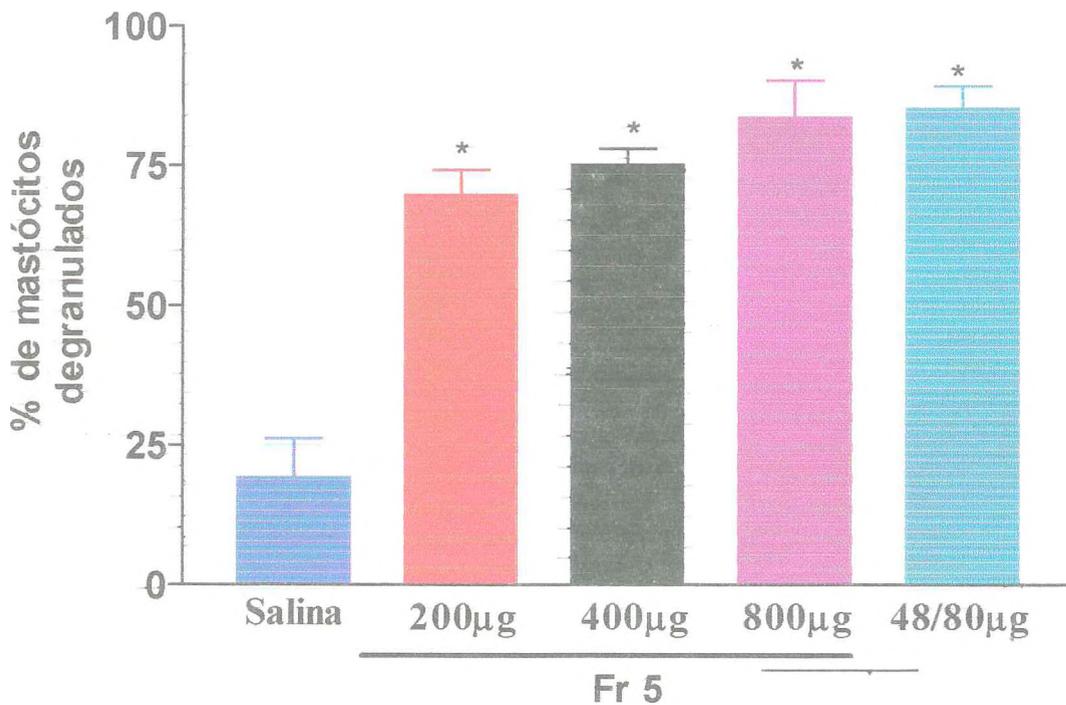


Figura 12. Efeito da fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL), composto 48/80 ou solução salina 0,9% na degranulação de mastócitos do mesentério de ratos *in vitro*. A fração 5 (200, 400 e 800µg/ml), composto 48/80 (0,8µg/ml) ou solução salina foram adicionados à solução nutritiva de Ringer-Locke contendo pedaços de mesentério e incubados por 30 minutos. Os valores representam a média \pm EPM da percentagem de mastócitos degranulados obtidos por contagem microscópica de 100 células. $n = 6$. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas)

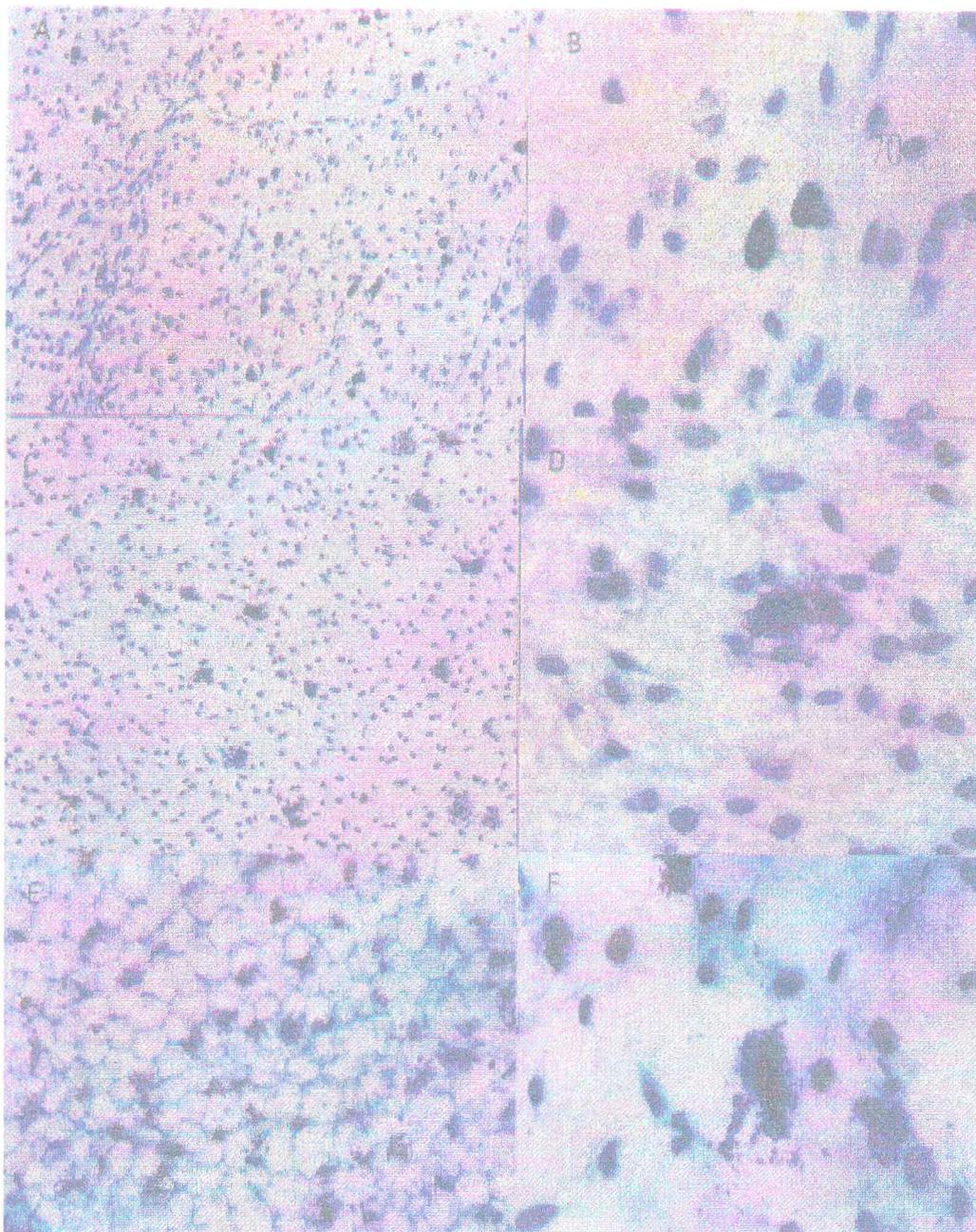


figura 13. Microfotografia de mesentério de ratos tratados com solução salina 0,9%, fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) ou composto 48/80. Nota-se claramente uma grande quantidade de mastócitos degranulados pela fração 5 (800 μ g/ml – C e D) comparável a observada no mesentério de animais incubado com composto 48/80 (0,8 μ g/ml – E e F). Observe a diferença em relação ao controle (A e B). Azul de toluidina, 100 e 400 X.

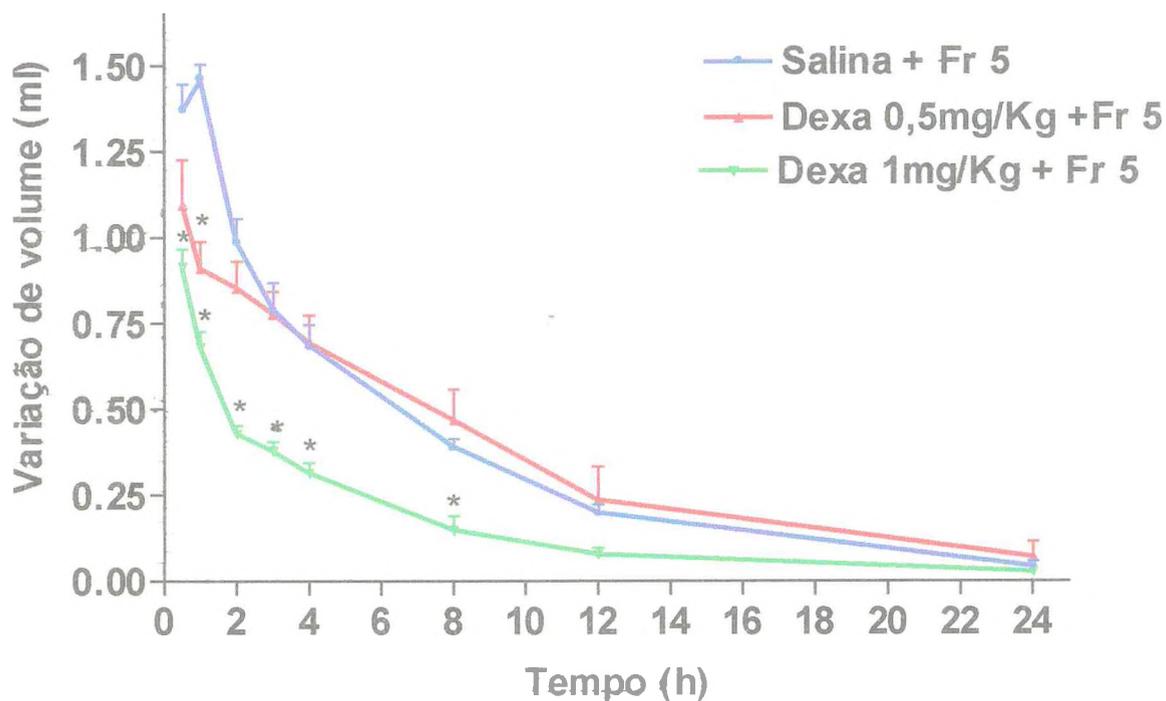


Figura 14. Cinética da inibição por Dexametasona (Dexa) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de Dexametasona (0,5mg/Kg e 1mg/Kg) ou salina por via subcutânea. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12, e 24 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

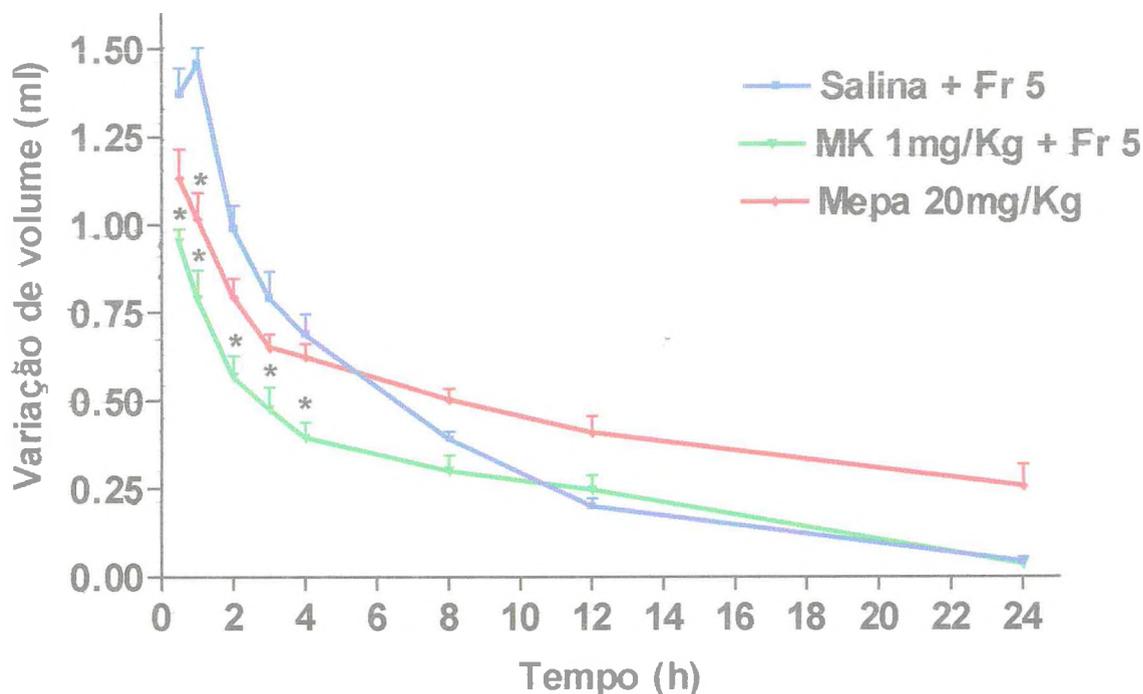


Figura 15. Cinética da inibição por MK 886 (MK) e Mepacrina (Mepa) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) ou salina foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de MK 886 (1mg/Kg) por via intraperitoneal ou Mepacrina (20mg/Kg) por via subcutânea. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

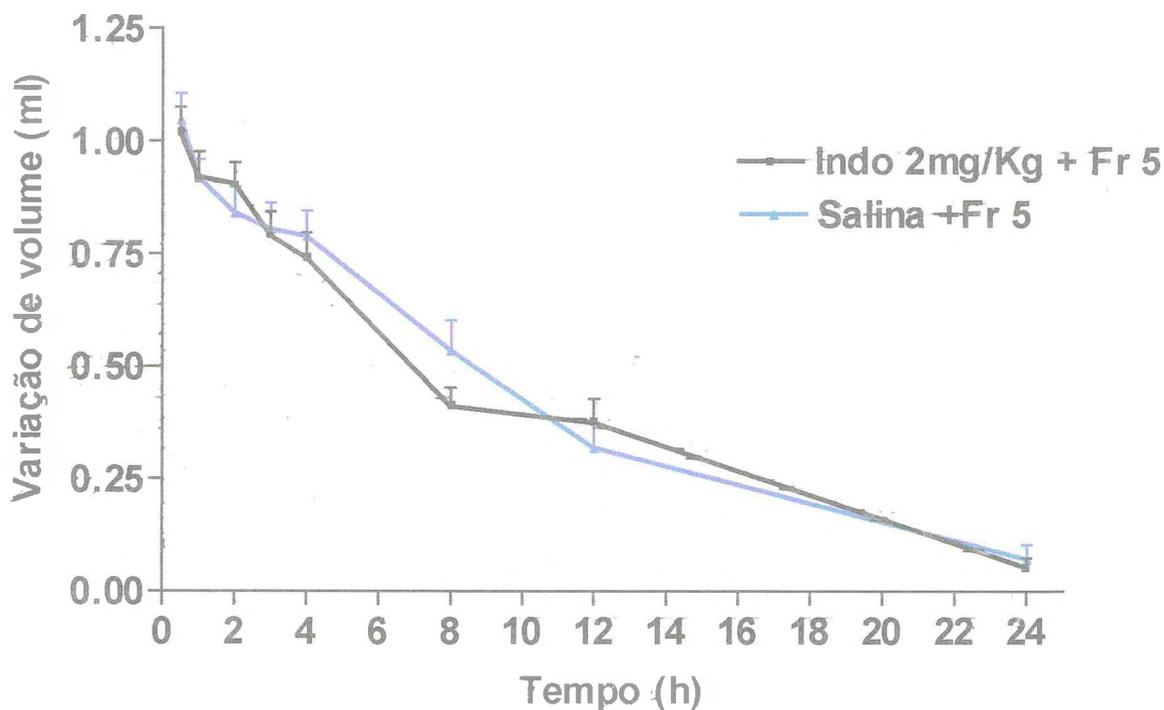


Figura 16. Cinética da inibição por Indometacina (Indo) do edema induzido pela fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) em pata de rato. A fração 5 (800 μ g/Kg) ou salina foi administrada por via subcutânea intraplantar 1 hora após a injeção de Indometacina (2mg/Kg) por via subcutânea. O edema foi medido 30min, 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 horas após, em pletismômetro. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de volume (Δ de volume = volume após injeção de EBL – volume antes da injeção), n = 6. ANOVA (medidas repetidas) e Tukey.

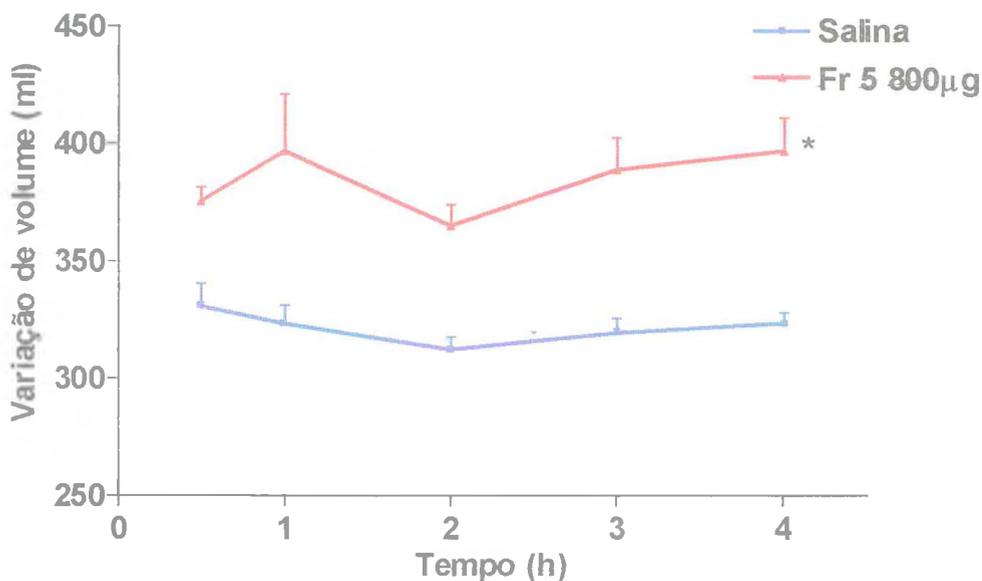


Figura 17. Cinética da permeabilidade vascular induzida pela Fração 5 de *L. labyrinthicus* para cavidade peritoneal de ratos Wistar. Fr 5 (800µg) ou solução salina estéril foram administradas por via intraperitoneal (i.p) e 30 minutos antes do sacrifício foi injetado azul de Evans (25mg/Kg) por via endovenosa (e.v). O aumento de permeabilidade foi avaliado pela quantidade de azul de Evans extravasado para a cavidade peritoneal medido em espectrofotômetro a 600 nm. Os pontos representam a média \pm EPM da quantidade de azul de Evans por ml de exsudato. $n = 6$. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (Tukey).

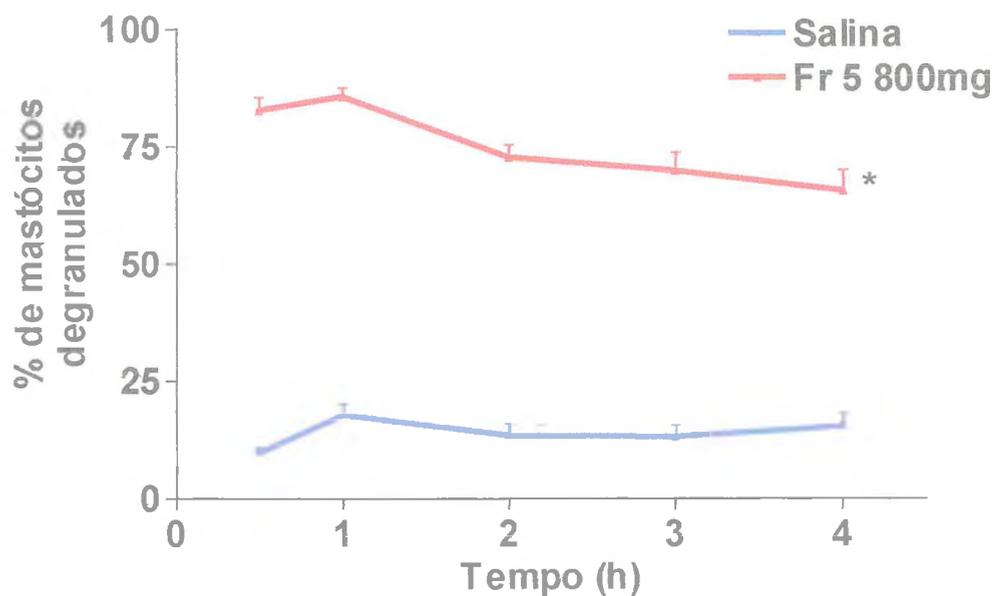


Figura 18. Efeito da fração 5 extraída do extrato bruto de *L. labyrinthicus* (EBL) ou solução salina 0,9% na degranulação de mastócitos do mesentério de ratos *in vivo*. A fração 5 (800 μ g/ml), ou solução salina foram administradas, por via intraperitoneal e os animais foram sacrificados 30min, 1, 2, 3 e 4 horas após. O azul de Evans (25mg/kg) foi injetado por via endovenosa 30 min antes do sacrifício. Os pontos representam a média \pm EPM da quantidade de azul de Evans por ml de exsudato. n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (Tukey).

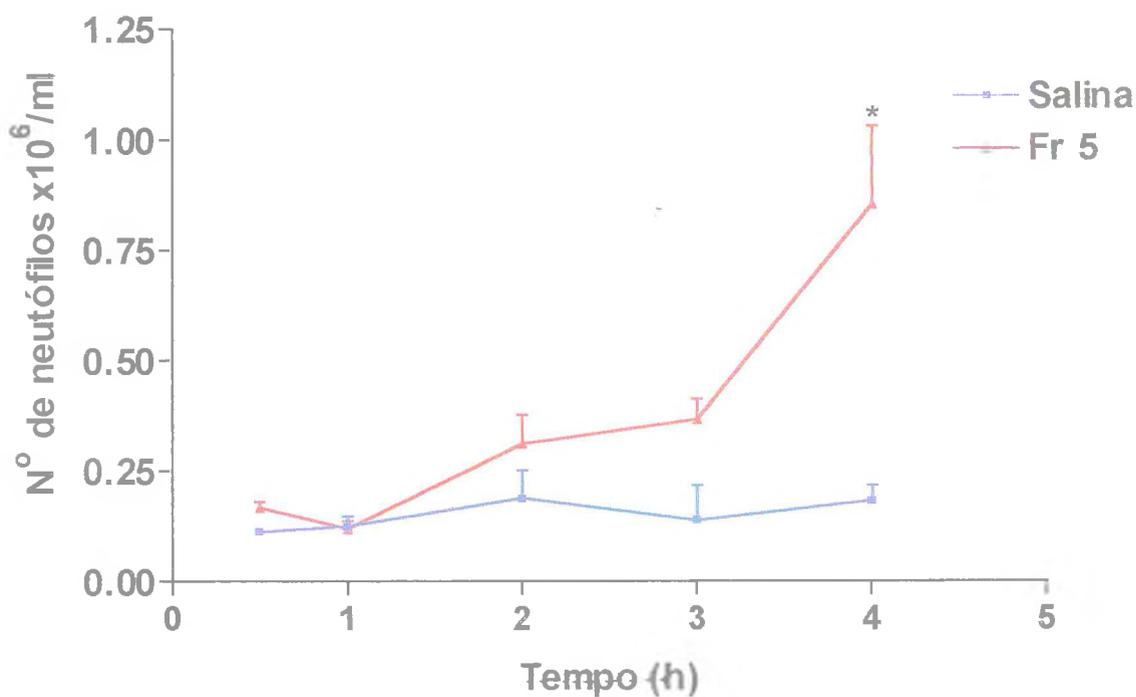


Figura 19. Efeito da Fração 5 de *L. labyrinthicus* em induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos Wistar. Fr 5 (800µg) ou salina estéril foram administradas por via intraperitoneal (i.p.). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas depois. Os pontos representam a média ± EPM do número de neutrófilos/ml. n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (Tukey).

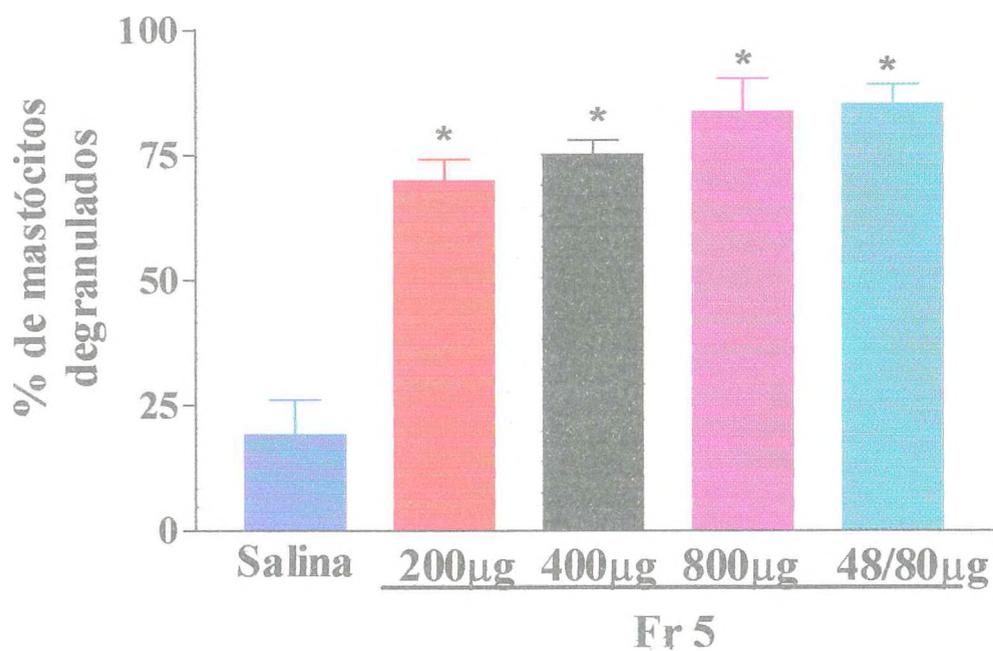


Figura 20. Efeito da Fração 5 de *L. labyrinthicus* em induzir migração de eosinófilo para a cavidade peritoneal de ratos Wistar. Fr 5 (800µg), LtB₄ (25ng) ou salina estéril foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) A migração de eosinófilo para a cavidade peritoneal foi avaliada 24 horas depois. Os pontos representam a média ± EPM do número de eosinófilos/ml. n = 6. (*) p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu salina. ANOVA (Tukey).

4.DISCUSSÃO

4.DISCUSSÃO

A inquietação pela pouca compreensão do mecanismo gerador de alguns estados patológicos ou mesmo pelo fato de alguns desses males apresentarem-se como incuráveis, tem levado vários grupos de pesquisa a buscar nos animais e plantas, fontes naturais de novos compostos químicos, novas drogas ou novas ferramentas que permitam a solução e/ou melhor compreensão de patologias que até então encontram-se sem soluções clínicas definitivas. Nesse contexto, os anfíbios surgem como fontes potenciais desses novos compostos químicos, e a reação inflamatória, enquanto resposta efetiva do hospedeiro à danos teciduais ou infecções, como objeto de investigação.

Considerando, então, que no repertório altamente complexo dos passos bioquímicos que constituem a resposta do hospedeiro ao patógeno invasor, o papel exato dos diversos mediadores envolvidos ainda não foi completamente descrito e sabendo que a pele de anfíbios constitui-se de um verdadeiro arsenal químico, resolveu-se traçar uma investigação que iniciou-se com a extração da secreção venenosa das glândulas de *L. labyrinthicus* com o auxílio de uma solução de adrenalina (100µg/ml), injetada por via subcutânea. Após 24 horas o material foi centrifugado e o sobrenadante liofilizado.

Após liofilização ressuspendeu-se o pó obtido em água bidestilada acrescida de TFA a 0,05%, centrifugou-se e submeteu-se o sobrenadante a análise cromatográfica em HPLC acoplado a coluna preparativa.

A cromatografia em HPLC utiliza instrumentos muito sofisticados, que são automatizados. Ela realiza separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Guimarães & Collins, 1990; Lindsay, 1992).

Dessa análise foram obtidos diversos picos ou frações com os quais iniciamos um “screening” de farmacológico. Porém, antes de serem iniciados os testes farmacológicos com as frações, foi testada a ação edematogênica do extrato bruto do veneno. Verificou-se que este era capaz de induzir um edema significativo, visível já nos primeiros 30 minutos após sua injeção subcutânea intraplantar. O mesmo aconteceu quando se testou as diluições do EBL (1:5 e 1:20).

Notamos claramente um acentuado edema com pico na segunda hora quando da injeção do EBL e com pico na primeira hora quando da injeção de suas diluições. Tal edema mantém-se elevado até 48 horas com o EBL e até 24 ou 12 horas quando da injeção das diluições 1:5 e 1:20 respectivamente.

Relatos clássicos da literatura dão conta de que da pele de anfíbios já foram isolados, até o momento, mais de 300 compostos bioativos, pertencentes a grupos químicos distintos: aminas biogênicas, peptídeos, proteínas hemolíticas, alcalóides e esteróides (Sebben et al, 1993). Vialli, 1933 e Erspamer, 1937 identificaram a “enteramine”, substância idêntica a 5-hidroxitriptamina, um neurotransmissor presente em mamíferos. Erspamer et al., 1962b relataram também a presença de bradicinina na pele de várias espécies de *phylomedusa* e *ranas* sul americanas. Assim, baseados nesses relatos e sabendo que um edema tão precoce poderia ser proveniente da ação de substâncias desse tipo, resolvemos investigar a ação edematogênica dos extratos provenientes do fracionamento do EBL.

Foram testadas cinco das oito frações purificadas e confirmou-se ação edematogênica em quatro delas, sendo apenas a fração 14 isenta de qualquer efeito. Percebemos também que o pico de ação coincidia para todas as frações em 1 hora e que o edema decaía rapidamente, ou seja, nas primeiras 24 horas para as frações 6 e 7, mas mantinha-se alto para fração 5 até 48 horas e até 72 horas para fração 1. O fato do edema persistir quando da

injeção da fração 1 pode ser explicado pela presença de sal nesta fração, uma vez que é a primeira a sair durante o processo de cromatografia.

De posse dos dados acima, optou-se então pela escolha de apenas uma das frações para aprofundamento dos estudos farmacológicos. Desta forma, analisou-se cuidadosamente o cromatograma e decidiu-se a favor da fração 5 por esta apresentar-se em posição privilegiada quando comparada às outras, ou seja, por apresentar-se isolada, dificilmente sofreria alguma contaminação pelas circunvizinhas durante o processo de purificação. Desta forma, teria-se certeza de estarmos trabalhando com apenas uma substância.

Testou-se então três doses distintas da fração 5 e verificou-se coincidência dos picos de ação na primeira hora, bem como um edema duradouro, persistente até a 48^a hora para as doses mais elevadas.

Sabe-se, pela literatura, que o edema que aparece precocemente deve-se a contração da célula endotelial com alargamento das junções intercelulares (Brett citado por Robbins, 1994, p. 56). Este é o mecanismo pelo qual histamina, bradicinina e leucotrienos agem. O aumento da permeabilidade vascular ocorre rapidamente após a exposição ao mediador. O edema em pata de rato gerado por bradicinina, por histamina ou serotonina é precoce, iniciando-se nos primeiros 15 minutos para histamina e bradicinina e mantendo-se acentuado ainda na 1^a hora, no entanto, o edema por ação da histamina decai mais rapidamente do que o da bradicinina. Já o edema ocasionado pela injeção de serotonina mantém o pico de ação na 1^a hora e ainda é acentuado na 4^a hora após a injeção (Rocha e Silva, 1970 e Malling et al, 1974).

Como a fração 5 extraída da pele de *L. labyrinthicus* mostrou-se capaz de induzir um edema precoce, com pico na primeira hora resolveu-se, no presente trabalho, investigar o efeito de uma série de potenciais bloqueadores da atividade de substâncias de ação precoce.

Os resultados aqui apresentados mostraram que mepiramina, um anti-histamínico derivado da etilenodiamina e seletivo por receptores do tipo H₁ da histamina (Korolkovas et al, 1988), inibiu significativamente e de forma dose dependente, embora não tenha inibido completamente o edema de pata induzido pela fração 5. O mesmo ocorrendo com a metisergida (1mg/Kg), um alcalóide semi-sintético derivado do esporão do centeio e antagonista da serotonina (Korolkovas et al, 1988). Observou-se que a metisergida foi mais potente em inibir o edema de pata induzido pela Fr 5 que a mepiramina, sugerindo uma participação maior da serotonina em relação à histamina no edema de pata de rato induzido por essa fração. Corroborando com esta idéia, Maling et al, 1974 demonstrou que o edema de pata em ratos, induzido por composto 48/80, conhecido por liberar histamina de mastócitos (Paton, 1951, 1957; Feldberg e Talesnik, 1953; Riley e West, 1956), pode cursar com a liberação de mediadores vasoativos e que dentre estes mediadores destaca-se a serotonina, posto ser tal edema bloqueado em mais de 70% quando da injeção de metisergida, um bloqueador específico de sua ação. Quando utilizou-se a cipro-heptadina (6mg/Kg), um anti-histamínico H₁ (Maling et al, 1974) que tem estrutura analóga aos fenotiazínicos, possuindo também atividade anti-serotoninérgica (Maling et al, 1974), observou-se uma inibição quase total do edema de pata induzido pela F5. Estes dados sugerem uma participação importante da histamina e da serotonina na fase precoce deste edema. Como estes dois mediadores estão presentes em grânulos de mastócitos presentes na pele de ratos é razoável supor que a Fr 5 possa estar agindo ao nível dessas células induzindo extrusão dos seus grânulos.

Quando utilizamos o HOE 140, um bloqueador para receptores do tipo B₂ da bradicinina, verificou-se que no pico do edema ambas as doses utilizadas (0,6 e 1mg/Kg) foram capazes de inibi-lo significativamente e de forma dose dependente, porém não de forma completa. Sugerindo que a

fração 5 utilizada neste trabalho, também atua em receptores B_2 de bradicinina. Dados recentes de literatura demonstram que o aumento de permeabilidade vascular induzido pela injeção de bradicinina em pele de ratos, se deve principalmente a liberação de mediadores vasoativos como histamina de mastócitos (Morishita et al, 1996). Portanto, pode-se supor que a fração em estudo, possua alguma semelhança estrutural com BK, a ponto de atuar diretamente em seus receptores do tipo B_2 , podendo também estar agindo degranulando mastócitos, como citado na literatura. Cumpre-se ressaltar também, que a cipro-heptadina além de possuir efeito antihistamínico e antiserotoninérgico, é também bloqueador de receptores B_2 da bradicinina (Maling et al, 1974), o que poderia explicar o potente efeito inibitório desta substância no edema da fração testada.

Apesar da possibilidade da existência de uma semelhança estrutural entre a substância aqui estudada e a bradicinina, podemos afirmar que a Fr 5 não é a própria bradicinina, tendo em vista, que já dispomos de seu peso molecular que é em torno de 2490 D e o da bradicinina é 1060,2 D. Portanto não se tratam de uma mesma substância.

Dessa forma, não seria de todo estranho, imaginar que na pele de um anfíbio pudesse ser encontrado um agente degranulador de mastócitos, visto existirem na literatura relatos de que substância com ação semelhante já foi isolada, por exemplo, do veneno da *apis mellifera* (Stansfeld et al, 1987).

Tal relato vem, então corroborar os dados por nós apresentados. Assim sendo, resolveu-se investigar a possibilidade da participação de mastócitos no edema de pata induzido pela Fr 5.

Utilizou-se o tratamento repetido com composto 48/80 para depleção experimental de mastócitos descrito por Di Rosa et al, 1971. Os nossos dados demonstram uma inibição significativa da ação de Fr 5 em animais pré-tratados com composto 48/80, quando comparados aos animais que

receberam salina. Este resultado, é semelhante ao que ocorreu com a dextrana, agente que conhecidamente induz um edema precoce, que decorre da degranulação de mastócitos (Wedmore & Williams, 1981) e cujo edema foi também inibido pelo pré-tratamento com o 48/80. Para confirmação deste dado foi também feita degranulação de mastócitos do mesentério de ratos *in vitro* e os resultado mostram que a fração 5 é capaz de degranular estas células sendo o seu efeito semelhante ao composto 48/80 quando da utilização da maior dose (800µg/Kg).

Como pode-se observar, apesar do edema induzido pela Fr 5 ter o pico na primeira hora, ele manteve-se significativo até a oitava hora após sua administração. Para justificar o curso deste edema portanto, é possível que dois mecanismos estejam presumivelmente envolvidos. Primeiro, a Fr 5 atuaria, a exemplo de outras substâncias (Santos et al, 1997 e 1998), degranulando mastócitos o que explicaria a fase precoce do edema. Segundo, esta substância poderia agir estimulando a síntese de novo de outros mediadores que poderiam ser responsáveis pela sustentação da reação edematogênica. Estas proposições ganham respaldo na literatura onde encontramos a afirmação de que os mastócitos quando ativados, não liberam unicamente mediadores pré-formados como histamina e serotonina, mas sintetizam ou estimulam a síntese de vários outros mediadores incluindo metabólitos derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas e leucotrienos e de outros mediadores não provenientes deste ácido como PAF, adenosina e inclusive de citocinas (Befus et al, 1988).

Desta forma resolveu-se utilizar outros bloqueadores assim dispostos: 1) um bloqueador de ciclooxigenase; 2) um bloqueador de lipoxigenase; 3) um bloqueador de fosfolipase A₂ e citocinas; 4) um bloqueador específico de fosfolipase A₂. Os dados revelam que a indometacina (2mg/Kg), um derivado do ácido indolacético e bloqueador de ciclooxigenases (Korolkovas et al,

1988), não bloqueou o edema induzido pela Fr 5, sugerindo que a síntese de prostaglandina não se constitui um evento importante no edema induzido por Fr 5. Entretanto, quando injetou-se dexametasona, um corticosteróide que atua inibindo a ação de fosfolipase A_2 , mas que também atua inibindo a síntese e atividade de algumas citocinas (Korolkovas et al, 1988; Beutler et al, 1986; Bochner et al, 1987), verificou-se inibição significativa do edema induzido por Fr 5 apenas no pico, quando da injeção de 0,5mg/Kg e uma inibição significativa porém, não completa, até a 8ª hora após a injeção da dose de 1mg/Kg.

Existem relatos prévios da ineficiência da cortisona e fenilbutazona em modificar o edema induzido por dextran, no qual histamina e serotonina apresentam papel predominante (Stucki e Thompson, 1958). Entretanto, o fato de no presente trabalho a dexametasona ter inibido o edema pode estar relacionado ao seu efeito em inibir síntese de leucotrienos em virtude de sua ação inibitória sobre fosfolipase A_2 , ou seu efeito inibitório sobre síntese e atividade de citocinas. Utilizou-se portanto, a mepacrina, um bloqueador específico de fosfolipase A_2 e demonstrou-se que o mesmo inibiu o edema nas suas fases iniciais, sendo esta inibição significativa apenas no pico. Provavelmente a utilização de uma dose maior, levaria a um efeito mais pronunciado e duradouro. Já quando da utilização de MK 886, um bloqueador de lipoxigenase, observou-se inibição significativa em todos os pontos da curva até a 4ª hora após a injeção da Fr 5. Tal fato pode ser explicado com base em trabalhos anteriores que dizem que a injeção subcutânea de LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 em pele humana causa uma reação semelhante a da histamina porém, cerca de 100 vezes mais potente e com duração bem mais prolongada (Austen, 1982; Lewis, 1981, Stolc, 1982). Segundo esses autores, que citam trabalhos realizados em cobaias e hamster, a ação desses leucotrienos culmina com vasodilatação arteriolar e aumento de

permeabilidade venular. Assim é presumível que também esses leucotrienos possam estar envolvidos no edema de pata induzido pela Fr 5.

As evidências indicam então, que a Fr 5 atua induzindo degranulação de mastócitos e que o edema precoce induzido por essa fração é dependente, pelo menos parcialmente, de fatores liberados nessa degranulação como histamina e serotonina, e da síntese de novo de leucotrienos. Como o edema se manteve significativo até a oitava hora, resolveu-se investigar a participação de neutrófilos na sua fase tardia. Assim sendo, realizou-se uma cinética de permeabilidade vascular medida pela concentração de azul de Evans no exsudato peritoneal de animais tratados com a fração, ao mesmo tempo em que se analisava a degranulação de mastócitos e a migração de neutrófilos. Observou-se que o pico de permeabilidade vascular ocorria na primeira hora, o que coincide com os resultados obtidos no edema de pata. Este pico também coincidiu com o tempo em que se observou a maior degranulação de mastócitos, confirmando dados anteriores que demonstraram a participação importante de mediadores oriundos desta célula no aumento de permeabilidade vascular induzido pela Fr 5.

Da mesma forma que no edema de pata, o aumento de permeabilidade vascular induzida por Fr 5 e medido pela concentração de azul de Evans, permanecia elevada nas primeiras 4 horas. A manutenção deste aumento de permeabilidade vascular poderia ser explicado pela participação de citocinas quimiotáticas para neutrófilos como TNF- α IL1 e IL6. Corroborando com esta hipótese, Galli e colaboradores, 1993 demonstraram que a estimulação de mastócitos de ratos *in vitro* por Fc ϵ RI ou por outros mecanismos induzem a secreção de substâncias pró-inflamatórias e também o surgimento de citocinas como: interleucina 1, 3, 4 e 6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Em conjunto estas citocinas não regulam unicamente a produção de IgE e outras respostas imunes, mas também induzem migração de leucócitos.

A hipótese da participação de neutrófilos neste edema foi confirmada pela demonstração no presente trabalho, de uma migração discreta porém significativa, de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos tratados com a Fr 5, o que poderia explicar a fase mais tardia do edema induzido por esta fração.

Tem sido demonstrado na literatura que nas doenças alérgicas e parasitárias a ativação de mastócitos precede a liberação por estas células de IL4 que induz uma migração seletiva de eosinófilos através da indução da expressão de VCAM na superfície da célula endotelial (Abbas et al, 1997). Estas informações nos fizeram supor que a fração testada neste trabalho e que vinha demonstrando um potente ação sobre mastócitos, poderia também atuar induzindo migração de eosinófilos. Os dados obtidos neste trabalho confirmam esta hipótese e demonstram que a Fr 5 foi capaz de induzir migração de eosinófilos a exemplo do já conhecido efeito do leucotrieno B₄, utilizado como controle positivo.

Em conjunto os dados obtidos aqui, sugerem que a fração 5 obtida da pele de *Leptodactylus labyrinthicus* se constitui em um potente ativador da atividade e degranulação de mastócitos.

O principal objetivo da terapêutica das desordens atópicas, como a rinite alérgica é bloquear a produção ou a liberação de mediadores oriundos de mastócitos ou antagonizar a ação do mediador na célula alvo. No entanto, os mediadores de mastócitos envolvidos nas diversas desordens alérgicas, inclusive no choque anafilático não são completamente conhecidos. A descoberta de substâncias como a Fr 5 do *L. labyrinthicus*, animal típico da nossa região, capaz de atuar em uma etapa específica do processo alérgico e o uso apropriado de modelos animais experimentais, podem se constituir em ferramentas de valor inestimável para a compreensão da fisiopatologia dos processos alérgicos e para uma melhor abordagem terapêutica.

5. CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES:

- A fração 5 isolada da pele de *Leptodactillus labyrinthicus* é uma substância de peso molecular em torno de 2490 D, capaz de induzir um acentuado aumento de permeabilidade vascular;
- A fase precoce do edema induzido por Fr 5 é mediado por histamina, serotonina e leucotrienos, mas também decorre de sua ação em receptores B₂ de bradicinina;
- A Fr 5 induz um edema sustentado que possivelmente é mediado por uma discreta migração de neutrófilos;
- A Fr 5 também induz migração de eosinófilos para o tecido;
- Esta substância é um potente indutor da degranulação de mastócitos.
- Podemos sugerir que esta substância poderá ser utilizada como ferramenta para estudo da fisiopatologia de processos alérgicos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., et al. **Cellular and Molecular Immunology**. W. B. Saunders Company, p. 306-310, 1997.
- ABRAHAM, S. N., MALAVIYA, R., Mast cells in infection and immunity. **Infection and Immunity**. 65(9): 3501-3508, 1997.
- APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, S. K., JULIANO, R. L., Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacologic. Rev.** 50(2): 197-261, 1998.
- ATKINSON, T. P., WHITE, M. V., KALINE, M. A., Histamine and serotonin. In: Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. (ed.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, p. 123-138, 1992.
- AUSTEN, K. F., The leukotrienes: their potential role in allergic mechanisms. **Am. Acad. Allergy Postgraduate Course Syllabus**, p. 48-57, 1982.
- BEFUS, D., FUJIMAKI, H., LEE, T. D. G., SWIETER, M., Mast cell polymorphisms. Present concepts, future directions. **Digestive Diseases of Sciences**. 33(3): 16S-24S, 1988. Supplement.
- BEUTLER, B., MAHONEY, J., TRANG, N. L., et al., Purification of cachetin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin induced raw 264-7 cells. **J. Exp. Med.** 161: 984-995, 1985.
- BEVINS, C. L., ZASLOFF, M., Peptides from frog skin. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 395, 1990.
- BOCHNER, B. S., CHARLESWORTH, E. N., LICHTENSTEIN, L. M., et al., Interleukin-1 is released at sites of human cutaneous allergic reaction. **J. Allergy Clin. Immunol.** 86: 820-839, 1990.
- BOESIGER, J., TSAI, M., MAURER, M., YAMAGUCHI, M., BROWN, L. F., CLAFFEY, K. P., DVORAK, H. F., GALLI, S. G., Mast cells can

- secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of Fce receptor I expression. **J. Exp. Med.** 188(6): 1135-1145, 1998.
- CLARKE, B. T., The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.** 72: 365-379, 1997.
- CONLON, J. M., ARONSSON, ULRIKA, Multiple bradykinin-related peptides from the skin of the frog, *Rana temporaria*. **Peptides.** 18(3): 361-365, 1997.
- COSTA, A. C., CHAVES, P. R., **Manual de Técnica Histológica: Guia de Trabalhos Práticos.** 3^a edição, Lisboa: Portugalia, p. 380-382, 1943.
- DALY, J. W., The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92: 9-13, 1995. Colloquium paper.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D. ^a, Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.** 104, 15-29, 1971.
- DOUGLAS, W. W., Histamine and -hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonist. In: Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W., Murad, F. (org.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** New York: Macmillan Publishing Company, 9th edition, p. 605-639, 1996.

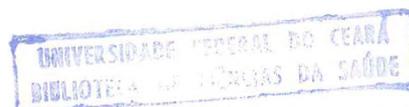
- DUELLMAN, W. E. Reproductive strategies of frogs. **Sci. Am.** 267: 80-87, 1992.
- DVORAK, A. M., New aspects of mast cell biology. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 114: 1-9, 1997.
- ERSPAMER, V., BERTACCINI, G., CEI, J. M., Occurrence of bradykinin-like substances in the amphibian skin. **Experientia.** 18: 563-564, 1967.
- FELDBERG, W., TALESNIK, J., Reduction of tissue histamine by compound 48/80. **J. Physiol. (London).** 120: 550-568, 1953.
- FROST, D. R., Amphibian species of the world: a taxonomic and geographical reference.
- GALLI, S. J., GORDON, J. R., WERSHIL, B. K., Cytokine production by mast cells and basophils. **Curr. Opin. Immunol.** 3: 865-872, 1991.
- GALLI, S. J., New concepts about the mast cell. In: Flier, J. S., Underhill, L. H. (eds.). **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston.** The New England Journal of Medicine, v. 328, n. 4, p. 257-265, 1993
- GALLIN, J. I., GOLDSTEIN, I. M., SNYDERMAN, R., **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.** New York: Raven Press, 1186p, 1992.
- GIULIO, C., EUGÊNIO, F., *Monitore zoologico italiano.* **Italian Journal of Zoology.** 502, 1980.
- GRÜTZKAU, A., KRÜGER-KRASAGAKES, S., BAUMEISTER, H., SCHWANZ, C., KÖGEL, H., WELKER, P., LIPPERT, U., HENZ, B. M., MÖLLER, A., Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF. **Jog. Mol. Biol. Cell.** 4: 875-884, 1998.

- GUO, Y., MOCHIZUKI, T., MORII, E., KITAMURA, Y., MAEYAMA, K.,
Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: A
microdialysis study. **Eur. J. Pharmacol.** 331: 237-243, 1997.
- KALUME, D. E., SOUSA, M. U. I., MORPHYLE, Purification,
characterization, sequence, determination in mass spectrometric analyze
of a trypsin inhibitor from seeds of the Brazilian tree *Dypteryx alata*
(*Leguminosae*). **Journal of Protein Chemistry**, 14: 685-693, 1995.
- KARALLIEDDE, L., Animal toxins. **Br. J. Anaesth.** 74: 319-327, 1995.
- KAY, A. B., "Helper" (CD₄⁺) T cells and eosinophils in allergy and asthma.
Am. Rev. Respir. Dis. 145: 522-526, 1992.
- KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H., **Química Farmacêutica**. Rio
de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 347-492, 1988.
- LAZARUS, L. H., ATTILA, M., The toad, ugly and venomous, wears yet a
precious jewel in his skin. **Prog. Neurobiol.** 41: 473-507, 1993.
- LEE, H. M., CHEN, K. K., The occurrence of nor-epinephrine in the Chinese
toad venom. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 102, 286-290, 1951.
- LEWIS, R. A., AUSTEN, K. F., Mediation of local homeostasis and
inflammation by leukotrienes and other mast cells-dependent compounds.
Nature, 293: 103-108, 1981.
- LINDSAY, S., **High Performance Liquid Chromatography**. London:
Thames Polytechnic, 1992.
- LUKACS, N. W., STRIETER, R. M., CHENSUE, S. W., KUNKEL, S. L.,
Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation.
J. Leukoc. Biol. 59: 13-17, 1996.
- MALING, H. M., WEBSTER, M. E., WILLIAMS, M. A., SAUL, W.,
ANDERSON JR, W., Inflammation induced by histamine, serotonin,

- bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 191(2): 1974.
- MARCONDES, A. C., LAMMOGLIA, D. A., **Zoologia e Botânica**. São Paulo: Atual, 1981.
- MIGNOGNA, G., SEVERINI, C., ERSPAMER, G. F., SICILIANO, R., KREIL, G., BARRA, D., Tachykinins and other biologically active peptides from the skin of the Costa Rican phyllomedusid frog *Agalychnis callidryas*. **Peptides**. 18(3): 367-372, 1997.
- MILLS, J. W., PRUM, B. E., Morphology of the exocrine glands of the frog skin. **The American Journal of Anatomy**. 171: 91-106, 1984.
- MORISHITA, M., SAKAMOTO, T., ITO, K., TORII, S., Role of bradykinin B₂ receptors and mast cells in the bradykinin-induced skin response in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 298: 149-154, 1996.
- NORTON, S., Quantitative determination of mast cell fragmentation by compound 48/80. **Br. J. Pharmacol.** 9: 494-497, 1954.
- PATON, W. D. M., Compound 48/80, a potent histamine liberator. **Brit. J. Pharmacol.** 6: 499-508, 1951.
- PATON, W. D. M., Histamine released by compounds of simple chemical structure. **Pharmacol. Rev.** 9: 269-328, 1957.
- RANG, H. P., DALE, M. M., Hormônios locais, inflamação e alergia. In **Farmacologia**. 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c. 11, p. 170-193, 1997.
- RILEY, J. F., WEST, G. B., Skin histamine: its location in the tissue mast cells. **Arch. Dermatol.** 74: 471-478, 1956.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V., **Pathologic Basis of Diseases**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1400p, 1994.

- ROCHA E SILVA, M. **Kinin Hormones with Special Reference to Bradykinin and Related Kininia**. Charles C. Thomas Publisher, p. 235-240, 1970.
- ROCHA E SILVA, M. O., A brief history of inflammation. In: Vane, J. R., Ferreira, S. H. (ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer-Verlag, v. 50, n. 1, p. 6-25, 1978.
- ROCHA E SILVA, M. O., BERALDO, W. T., ROSENFELD, G., Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma by snake venoms and trypsin. **J. Physiol.** 156: 261-273, 1949.
- ROWLEY, D. A., BENDITT, E. P., 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. **J. Exp. Med.** 103: 399-412, 1956.
- SANTOS, F. A., RAO, V. S. N., Inflammatory edema induced by 1,8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine**. 5(2): 117-121, 1998.
- SANTOS, F. A., RAO, V. S. N., Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1,8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. **Eur. J. Pharmacol.** 331: 253-258, 1997.
- SCHWARTZ, L. B., AUSTEN, K. F., Mast cell activation and mediator release. **Prog. Allergy**. 34: 271-321, 1984.
- SCHWARTZ, L. B., AUSTEN, K. F., Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy**. 34: 271-321, 1984.
- SEBEN, A., SCHWARTZ, C. A., CRUZ, J. S., A Defesa Química dos Anfíbios. **Ciência Hoje** 15(87): 25-35, 1993.
- SEDGWICK, A. D., WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Bonta, I. L., Bray, M. A., Parnham, M. J. (ed.). **Handbook of Inflammation**. Elsevier, v. 5, p. 27-47, 1985.

- SERAFIN, W. F., AUSTEN, K. F., Mediators of immediate hypersensitivity reactions. In: **Medical Intelligence. Current Concepts.** The New England Journal of Medicine, p. 30-34, 1987.
- SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions.** 17: 1, 1985.
- SPRINGER, T. A., Adhesion receptors of the immune system. **Nature.** 346: 425-434, 1990.
- STANSFELD, C. E., MARSH, S. J., PARCEJ, D. N., DOLLY, J. O., BROWN, D. A., Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit a fast-activating potassium current and bind to common neuronal proteins. **Neuroscience.** 23(3): 893-902, 1987.
- STEBBINS, R. C., COHEN, N. W., **A natural history of amphibians.** Princeton: Princeton University Press, 1995.
- STORER, T. I., USINGER, R. L., STEBBINS, R. C., **Zoologia Geral.** São Paulo: Companhia nacional, 1985.
- STOLC, V., Stimulation of adenosine 3',5'-Monophosphate formation in mononuclear leukocytes by toad venoms. **Biochimica et Biophysica Acta,** 721: 236-239, 1982.
- STUCKI, J. C., THOMPSON, C. R., A screening procedure for substances which inhibit dextran oedema in the rat. **Am. J. Physiol.** 193: 275-282, 1958.
- TOLEDO, R. C., Breve Apreciação sobre a Secreção Cutânea dos Anfíbios. **Ciência e Cultura.** 38(2): 279-284, 1986.
- TOLEDO, R. C., JARED, C., Considerações sobre o Veneno dos Anfíbios. **Ciência e Cultura.** 41(3): 250-258, 1989.



- TOLEDO, R. C., JARED, C., Estudo Histológico das Glândulas Lombares de *Pleurodema thaul* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Rev. Brasil. Biol.** 49(2): 421-428, 1989.
- VIALLI, M., ERSPAMER, V., Recherche sul secreto delle celle enterocromaffini. **Boll. Soc. Med. Chip. Pavia.** 51: 1111-1116, 1937.
- WALLNOFER, H., VON ROTTAUSCHER, ^a Chinese folk medicine and acupuncture. **Dell** : New York, 1965.
- WANG, J. P., TENG, C. M., Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A₂ enzymes isolated from *Triersurus mucrosquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.** 42: 846-850, 1990.
- WEDMORE, C. V., WILLIAMS, T. J., Control of vascular permeability by polimorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature.** 289: 646-650, 1981.
- WINTER, C. A., RISELY, E. A., NUSS, G. W., Carrageenin-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Med.** 111: 544-547, 1962.
- WITHERS, G. D., KUBES, P., IBBOTSON, G., SCOTT, R. B., Anaphylaxis-induced mesenteric vascular permeability granulocyte adhesion, and platelet aggregates in rat. **The American Physiological Society.** 0363-6135/98, p. H274-H284.