

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RENÉ DUARTE MARTINS

**EFEITOS RENAIIS E VASCULARES DO EXTRATO BRUTO DA
ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* E SUA FRAÇÃO
FOSFOLIPASE A2: ESTUDO DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS**

FORTALEZA

2007

RENÉ DUARTE MARTINS

**EFEITOS RENAIIS E VASCULARES DO EXTRATO BRUTO DA
ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* E SUA FRAÇÃO
FOSFOLIPASE A2: ESTUDO DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS**

Tese apresentada à coordenação do curso de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito final para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA

2007

M841e Martins, René Duarte

Efeitos renais e vasculares do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* e sua fração fosfolipase A2: estudo dos mediadores envolvidos. - Fortaleza-Ce: / René Duarte Martins. – Fortaleza, 2007.

243f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Fortaleza-Ce, 2007.

1. Anêmonas-do-mar 2. Fosfolipase A. 3. Rim. 4. Receptores de Endotelina. 5. Adenosina. 6. Ciclooxigenase 2. 1. Monteiro, Helena Serra Azul (orient.). II. Título.

CDD: 615.1

**EFEITOS RENAIIS E VASCULARES DO EXTRATO BRUTO DA
ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* E SUA FRAÇÃO
FOSFOLIPASE A2: ESTUDO DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS**

Tese apresentada à coordenação do programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito final para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro – Orientadora
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles
Universidade Estadual do Ceará -UECE

A minha família, meu pai José Martins, Minha mãe Dalva e meus irmãos Clarice, Júnior, Fábio, Fabiana, Genêz e Luciana. Pessoas que sabem de cada mínima dificuldade enfrentada por mim durante estes anos que me ausentei de suas companhias... Pais e irmãos maravilhosos que me deram suas mãos nos momentos difíceis e com quem dividi abraços nos momentos de vitória... Feliz daquele que tem em sua família seus melhores amigos... esse momento é de vocês, as pessoas que mais amo neste mundo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo caminho traçado e pela força e determinação que tem me dado para cumpri-lo.

À minha família, composta por meu pai, José Martins, minha mãe, Maria Dalva e meus queridos irmãos Clarice, Júnior, Fábio, Fabiana, Genêz, e Luciana, por sempre me incentivarem e serem com toda competência o meu porto.

Aos meus cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, pessoas que complementam e enchem minha vida de muito carinho.

À minha orientadora, Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pela orientação e exemplo de simplicidade e vontade, uma pessoa vencedora.

Aos amigos de todas as horas Renata, Carla e Juninho pelo conforto naqueles momentos que somente eles conhecem.

Ao Dr. Marcos Toyama pelo extrato de *B. caissarum* e PLA₂.

A Dra. Goretti, Dr. Manassés e Dr. Aldo pelos exemplos, apoio e disponibilização de material e laboratório para meus experimentos.

Aos Doutores Pedro Caldas, Alexandre Havt e Dra. Alice Martins pelos conselhos importantes na minha qualificação.

Aos amigos de laboratório, Paulo Sérgio (responsável pela mudança do meu objeto de pesquisa junto com minha orientadora), Rafael, Terentia, Rafael Recife, Fabiola, Daniela, Ticiania, Marcos Davis, Iedinha, Alcinia, Daniel, Claudênio, Diego, Pedro, João Paulo, Neto, Isadora, João Vitor, Cleidiana, Jamile e todos que passaram em algum momento pelo nosso convívio.

Aos colegas Alexandre Havt e Ila Fernanda pela realização dos experimentos de biologia molecular

A Silvia Maria Silva França que cuida do nosso laboratório com tanto carinho e nos socorre sempre que temos “aquele ureter” ou “aquela mesentérica” incanuláveis!!!

A todos do IBIMED (José Amadeus, Kátia, Fabiana, Carminha, Charles, Charliene, Terezinha, Valter, Emanuel, Rogério, Gardênia e Domingos) e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (Aura, Silvia, Rose, Jociê, Bento, Alex).

Aos colegas de pós-graduação que vivenciaram tantos momentos comigo, sempre em busca de nossos objetivos.

A Dona Graça, Neni, Vânia, Vagner, Juninho, Neto, Raissa, que se tornaram minha família em Fortaleza. Saibam que todo o carinho que vocês têm por mim é recíproco.

Aos professores e funcionários do Departamento Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos.

A Universidade Federal de Pernambuco - UFPE pela confiança depositada e aprovação no concurso público para professor adjunto de Fisiologia e Farmacologia do Núcleo de Nutrição, Campus de Vitória de Santo Antão.

Ao CNPq Pelo apoio financeiro tão importante pra minha formação e fundamental no desenvolvimento desta tese.

Com todo meu carinho,

Obrigado!!!!

RESUMO

EFEITOS RENAIS E VASCULARES DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* E SUA FRAÇÃO FOSFOLIPASE A₂: ESTUDO DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS. René Duarte Martins, Tese de Doutorado, Orientação: Dra. Helena Serra Azul Monteiro, Universidade Federal do Ceará, Pós-graduação em Farmacologia, 2007.

Anêmonas marinhas contêm uma variedade de compostos biologicamente ativos incluindo potentes toxinas. Por esta razão, muitos investigadores têm centrado seus estudos nestas proteínas, isoladas de anêmonas marinhas, como *Bunodosoma caissarum*. O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo das alterações funcionais produzidas pelo extrato bruto e da fração PLA₂ de *B. caissarum* em rim isolado de rato e leito vascular mesentérico. Rins isolados de ratos Wistar, pesando 250-300g, foram perfundidos durante 120 min com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina. O extrato bruto de *B. caissarum* (BcE) e PLA₂ foram adicionados ao sistema, em diferentes concentrações, 30 minutos após o início de cada experimento (controle interno) e Tezosentan (TZN) e Indometacina (IND) foram administrados no período inicial de cada experimento (T = 0 min). O leito vascular mesentérico, mantido aquecido a 37 ° C, foi perfundido com solução de Krebs em um fluxo constante (4mL/min) e a pressão medida por 80 min. A expressão de mRNA TNF- α , IL-1 β , renina e receptores de adenosina (A1, A2a, A2b e A3) foi avaliada por PCR utilizando como referência o mRNA do gene 18S. Os dados foram analisados por teste *t de Student* ($p < 0,05$). BcE alterou a função renal elevando a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (UF), taxa de filtração glomerular (TFG) e excreção de sódio, de potássio e cloreto, especialmente com a concentração intermediária. Tezosentan inibiu estes efeitos apenas parcialmente. No entanto, indometacina apresentou um bloqueio mais expressivo que TZN. A PLA₂ de *B. caissarum* elevou a pressão de perfusão (PP) já aos 60 minutos (controle = $104,17 \pm 3,72$; PLA₂ (0,1) = $130,9 \pm 5,6$ *; PLA₂ (0,3) = $165,1 \pm 12,6$ *; PLA₂ (1,0) = $142,3 \pm 9,6$ *, * $p < 0,5$), revelando também elevações de RVR, UF, TFG, excreção de eletrólitos e osmolaridade urinária, com diminuição dos transportes distais de Na⁺, K⁺ e Cl⁻. O bloqueio com IND foi mais expressivo sobre a menor concentração de PLA₂, enquanto TZN mostrou um efeito discreto. BcE e PLA₂ não alteraram a pressão de perfusão basal do leito vascular mesentérico. PLA₂ aumentou a expressão relativa de TNF α (C = $1,00 \pm 0,00$ vs. PLA₂ = $1,116 \pm 0,033$ *, com $p < 0,0001$) e do receptor de adenosina A2a (C = $1,0 \pm 0,01$ vs. PLA₂ = $1,238 \pm 0,043$ *, com $p < 0,0001$). Estes resultados sugerem que BcE e PLA₂ exercem ações significativas na perfusão de rim isolado, sem efeitos vasculares diretos no leito mesentérico. COX-2 e endotelina parecem ser importantes mediadores dos efeitos da BcE e PLA₂. Além disso, adenosina também parece estar envolvida no mecanismo de ação da PLA₂ de *Bunodosoma caissarum*.

Palavras-chave: Anêmona do mar, Fosfolipase A₂, Rim, Receptor de endotelina, Adenosina, Ciclooxigenase.

ABSTRACT

BUNODOSOMA CAISSARUM AND IT'S PHOSPHOLIPASE A₂ FRACTION EFFECTS IN THE ISOLATED PERFUSION KIDNEY AND ARTERIOLAR MESENTERIC BED: A STUDY OF MEDIATORS. RENÉ DUARTE MARTINS. Doctoral Thesis. Post-Graduation in Pharmacology. Mentor: Dra. Helena Serra Azul Monteiro, Ceará Federal University, 2007.

Sea anemones contain a variety of biological active compounds including some potent toxins. For this reason, many investigators have focused their studies in these proteins, isolated from sea anemones, such as *Bunodosoma caissarum*. The aim of this work was to study the mechanism of functional alterations produced by the crude extract and the PLA₂ fraction of *B. caissarum* in the isolated rat kidney and arteriolar mesenteric bed. Isolated kidneys from Wistar rats, weighing 250-300g, were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6% of bovine serum albumin for 120 min. *B. caissarum* crude extract (BcE) and PLA₂ were added to the system 30 min after the beginning of each experiment (internal control) and Tezosentan (TZN) and Indomethacin (IND) were administered in the initial period of each experiment (T=0min). The mesenteric bed, kept warmed at 37°C, was perfused with Krebs solution at a constant flow, (4mL/min) but with a variable perfusion pressure, measured for 80 min. mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , rennin and adenosine receptors (A1, A2a, A2b and A3) was evaluated by PCR using 18S mRNA as reference gene. The data were analyzed by Student's *t*-test ($p < 0.05$). BcE altered kidney function increasing perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR) and sodium, potassium and chloride excretion, especially with the intermediary concentration. Tezosentan inhibited these effects only partially. However, indomethacin presented a blockage more expressive than TZN. The PLA₂ of *B. caissarum* showed a higher increase of PP at 60 minutes (Control = $104,17 \pm 3,72$; PLA₂(0,1) = $130,9 \pm 5,6^*$; PLA₂(0,3) = $165,1 \pm 12,6^*$; PLA₂(1,0) = $142,3 \pm 9,6^*$, * $p < 0,5$) and increased RVR, UF, GFR, sodium, potassium and chloride excretion and urinary osmolarity, with decrease of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ distal transports. The blockage of IND was more expressive on the smallest PLA₂ concentration and TZN showed a modest effect, blocking more efficiently the intermediary concentration. Neither BcE, nor PLA₂ altered the basal perfusion pressure of the isolated arteriolar mesenteric bed. PLA₂ increased the gene expression of TNF- α (Control = $1,00 \pm 0,00$ vs. PLA₂ = $1,116 \pm 0,033^*$, com $p < 0,0001$) and upregulated the expression of adenosine receptors A2a (Control = $1,0 \pm 0,01$ vs. PLA₂ = $1,238 \pm 0,043^*$, com $p < 0,0001$). These results suggest that BcE and PLA₂ exert significant actions in the isolated perfusion kidney, without vascular effects in the arteriolar mesenteric bed. COX-2 and endothelin appear to be important mediators of the effects of BcE and PLA₂. In addition, adenosine is also involved in the mechanism of action of *B. caissarum*.

Key-Words: Sea anemone, Phospholipase A, Kidney, Endothelin receptor, Adenosine, Cyclooxygenase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Corte transversal da forma polipóide de um cnidário, mostrando os cnidoblastos, com nematocistos.....	30
FIGURA 2. Anêmona marinha da espécie <i>Bunodosoma caissarum</i>	32
FIGURA 3. Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.....	54
FIGURA 4. Valores registrados de pressão de perfusão (PP) durante a calibração do sistema.....	55
FIGURA 5. Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema.....	56
FIGURA 6. Valores registrados de volume urinário (mL/min) durante a calibração do sistema.....	56
FIGURA 7. Procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado.....	57
FIGURA 8. Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico.....	63
FIGURA 9. Eletroforese 2D do extrato bruto da anêmona marinha <i>B. Caissarum</i> ...70	
FIGURA 10. Padrões de Pureza, Massa molecular e sequenciamento da PLA2 da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i>	71

FIGURA 11. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a pressão de perfusão em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.	74
FIGURA12. Pico de PP provocado pelo extrato bruto de <i>B. caissarum</i> em perfusão de rim isolado nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL	75
FIGURA 13. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a RVR em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL	76
FIGURA 14. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o fluxo urinário em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.....	77
FIGURA 15. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o ritmo de filtração glomerular em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.....	78
FIGURA 16. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o transporte tubular de cloreto (%TCl ⁻) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL	79
FIGURA 17. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o transporte proximal de cloreto (%pTCl ⁻) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.....	80
FIGURA 18. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de sódio (ENa ⁺) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.....	81

FIGURA 19. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de potássio (EK ⁺) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL.....	82
FIGURA 20. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de cloreto (ECI ⁻) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL	83
FIGURA 21. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a osmolaridade urinária em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL	84
FIGURA 22. Efeitos do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na PP, em rim isolado de ratos.....	93
FIGURA 23. Efeitos do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de ratos.....	94
FIGURA 24. Efeitos do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos.....	95
FIGURA 25. Efeitos do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no RFG, em rim isolado de ratos.....	96

FIGURA 26. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no transporte tubular de potássio, em rim isolado de ratos 97

FIGURA 27. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no %TCl-, em rim isolado de ratos 98

FIGURA 28. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no transporte tubular proximal de potássio, em rim isolado de ratos 99

FIGURA 29. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos 100

FIGURA 30. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos.....101

FIGURA 31. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na EK+, em rim isolado de ratos 102

FIGURA 32. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na ECl-, em rim isolado de ratos 103

FIGURA 33. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) na osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos 104

FIGURA 34. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a pressão de perfusão em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 110

FIGURA 35. Picos de pressão de perfusão provocados pela Fosfolipase A2 do extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 111

FIGURA 36. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a resistência vascular renal em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 112

FIGURA 37. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o fluxo urinário em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 113

FIGURA 38. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o ritmo de filtração glomerular em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 114

FIGURA 39. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular proximal de sódio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL 115

FIGURA 40. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o transporte tubular de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL	116
FIGURA 41. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o transporte tubular proximal de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL.....	117
FIGURA 42. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre o transporte tubular proximal de cloreto em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL.....	118
FIGURA 43. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de sódio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL.....	119
FIGURA 44. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL	120
FIGURA 45. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a excreção de cloreto em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL	121
FIGURA 46. Efeitos da Fosfolipase A2 do extrato bruto da anêmona marinha <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre a osmolaridade urinária em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL	122
FIGURA 47. Efeitos da PLA2 do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina	

(1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na pressão de perfusão, em rim isolado de ratos 127

FIGURA 48. Efeitos indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de rato.....128

FIGURA 49. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos..... 129

FIGURA 50. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos..... 130

FIGURA 51. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no transporte tubular de sódio, em rim isolado de ratos..... 131

FIGURA 52. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no transporte tubular proximal de sódio, em rim isolado de ratos.. 132

FIGURA 53. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no transporte tubular de potássio, em rim isolado de ratos..... 133

FIGURA 54. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no %pTK+, em rim isolado de ratos 134

FIGURA 55. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no transporte tubular de cloreto, em rim isolado de ratos 135

FIGURA 56. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos.136

FIGURA 57. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos 137

FIGURA 58. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na excreção de potássio, em rim isolado de ratos 138

FIGURA 59. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na excreção de cloreto, em rim isolado de ratos 139

FIGURA 60. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA2 (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA2 (1µg/mL) na osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos 140

FIGURA 61. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) na pressão de perfusão, em rim isolado de rato 146

FIGURA 62. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de ratos	147
FIGURA 63. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos.....	148
FIGURA 64. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos.....	149
FIGURA 65. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular total de sódio, em rim isolado de ratos.....	150
FIGURA 66. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de sódio, em rim isolado de ratos.....	151
FIGURA 67. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular total de potássio, em rim isolado de ratos.....	152
FIGURA 68. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de potássio, em rim isolado de ratos.....	153
FIGURA 69. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular total de cloreto, em rim isolado de ratos	154

FIGURA 70. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos	155
FIGURA 71. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos	156
FIGURA 72. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) na excreção de potássio, em rim isolado de ratos	157
FIGURA 73. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) na excreção de cloreto, em rim isolado de ratos	158
FIGURA 74. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA2 (0,3µg/mL) sobre a osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos	159
FIGURA 75. Expressão relativa de interleucina TNF-α em rins perfundidos com solução de Krebs Henseleit (controle) ou tratados com a fosfolipase A2 (PLA2) isolada da anêmona marinha <i>B. caissarum</i>	163
FIGURA 76. Expressão relativa do receptor A2 _a de adenosina em rins perfundidos com solução de Krebs Henseleit (controle) ou tratados com a fosfolipase A2 (PLA2) isolada da anêmona marinha <i>B. caissarum</i>	164

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. Sequência de bases nitrogenadas presentes nos *primers* utilizados.....66
- QUADRO 2. Resumo dos efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com indometacina e tezosentan 165
- QUADRO 3. Resumo dos efeitos da PLA2 de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com indometacina..... 166
- QUADRO 4. Resumo dos efeitos da PLA2 de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com Tezosentan167

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*..... 86
- TABELA 2. Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*..... 86
- TABELA 3. Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCl⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*..... 87
- TABELA 4. Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)..... 105
- TABELA 5. Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)..... 106
- TABELA 6. Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCl⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)..... 107
- TABELA 7. Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de *B. caissarum*..... 123
- TABELA 8. Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de *Bunodosoma caissarum*..... 123

TABELA 9. Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI ⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i>	124
TABELA 10. Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa ⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com indometacina	139
TABELA 11. Percentual de transporte distal de potássio (%dTK ⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com indometacina	140
TABELA 12. Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI ⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com indometacina	141
TABELA 13. Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa ⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com tezosentan.....	158
TABELA 14. Percentual de transporte distal de potássio (%dTK ⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com tezosentan.....	159
TABELA 15. Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI ⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA2 de <i>Bunodosoma caissarum</i> e bloqueio com tezosentan.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS

%dT(Na⁺, Cl⁻,K⁺)	Percentual de transporte tubular distal com relação ao transporte total
%TCI⁻	Percentual de transporte de cloreto
%TK⁺	Percentual de transporte de potássio
%TNa⁺	Percentual de transporte de sódio
A1/A1-RS	Receptor A1 de adenosina
A2a/A2a-RS	Receptor A2a de adenosina
A2b/ A2b-RS	Receptor A2b de adenosina
A3/A3-RS	Receptor A3 de adenosina
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo atrial natriurético
BcE	Extrato bruto de <i>Bunodosoma caissarum</i>
BK	Bradicinina
BK1/BK2	Receptores de bradicinina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
Cl⁻	Íon Cloreto
Cosm	<i>Clearence</i> osmótico
COX	Ciclooxigenase
cPLA2	Fosfolipase A ₂ citosólica
DL 50	Concentração letal média
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DOU/DOP	Densidade óptica (U-urina/P-plasma)
ECI⁻	Excreção de cloreto
EDTa	Ácido etanodiamino tetra-acético
EK⁺	Excreção de potássio
ENa⁺	Excreção de sódio

ET-1/ET-2/ET-3	Endotelinas
ETA/ ET-RA	Receptor A de endotelina
ETB/ET-RB	Receptor B de endotelina
EtBr	Brometo etídico
EUA	Estados Unidos da América
FCI⁻	Cloreto filtrado
FK⁺	Potássio filtrado
FK453	Droga antagonista de adenosina (A1)
FNa⁺	Sódio filtrado
FPR	Fluxo de perfusão renal
FU	Fluxo urinário
H⁺	Íon hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IL-1β	Interleucina 1 β
IND	Indometacina
K⁺	Íon Potássio
KCl	Cloreto de potássio
min.	Minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Na⁺	Íon Sódio
Na⁺/K⁺/2Cl⁻	Bomba de sódio-potássio-2 cloretos
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMDA	Receptor de glutamato
NO	Oxido nítrico
PAF	Fator de agregação plaquetária
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PGF₂	Prostaglandina F ₂
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂

PGI₂	Prostaglandina I ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
PK⁺	Potássio perfusato
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PNa⁺	Sódio perfusato
Posm	Osmolaridade plasmática
PP	Pressão de perfusão
RFG/ GFR	Ritmo de filtração glomerular
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação da cadeia de polimerase com transcrição reversa
RVR	Resistência vascular renal
SP	São Paulo
sPLA₂	Fosfolipase A ₂ secretória
TAF	Ácido trifluoracético
TCI-	Transporte de cloreto
TNa⁺	Sódio transportado
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TXA₂	Tromboxano A ₂
TZN	Tezosentan
UF	Urinary Flow (Fluxo urinário)
UFC	Universidade Federal do Ceará
UK⁺	Potássio urinário
UNa⁺	Sódio urinário
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Uosm	Osmolaridade urinaria
USA	United States of America

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Considerações gerais	29
1.2	<i>Bunodosoma caissarum</i>	31
1.3	Fosfolipases A ₂ - (PLA2)	34
1.4	Peptídeos vasoativos no rim.....	39
1.5	Toxinologia renal.....	43
2	JUSTIFICATIVA	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	Geral	49
3.2	Específicos	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	Drogas e Reagentes	51
4.2	Animais experimentais	51
4.3	Purificação e caracterização bioquímica do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> e sua fração PLA2.....	51
4.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) em Fase Reversa.....	52
4.3.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)	53
4.4	Ensaio Biológico	54
4.4.1	Perfusão de rim isolado	54
4.4.1.1	Sistema Utilizado	54
4.4.1.2	Calibração do sistema	55
4.4.1.3	Solução perfusora	57
4.4.1.4	Técnica cirúrgica	57
4.4.1.5	Protocolo experimental.....	58

4.4.1.6 Grupos experimentais	59
4.4.1.7 Análises bioquímicas	60
4.4.1.8 Cálculos dos parâmetros funcionais renais	61
4.5 Perfusão de leito vascular mesentérico	63
4.6 Biologia molecular	64
4.6.1 Isolamento de RNA total	64
4.6.2 Isolamento de RNA e reação de RT-PCR	65
4.6.3 <i>Primers</i> utilizados	66
4.6.4 Eletroforese em gel de agarose.....	67
4.7 Análise estatística	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Efeitos Biológicos do Extrato de <i>Bunodosoma caissarum</i> em perfusão de rim isolado	72
5.1.1 Excreção renal dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto pela ação do extrato bruto de <i>B. Caissarum</i>	81
5.2. Efeitos do extrato bruto de <i>B. caissarum</i> em leito vascular mesentérico.....	89
5.3. Estudo da participação da cicloxigenase (COX) e endotelina nos efeitos renais do extrato bruto de <i>Bunodosoma caissarum</i> em perfusão de rim isolado.....	90
5.3.1 Estudo do bloqueio de BcE com Indometacina.....	90
5.3.2 Estudo do bloqueio de BcE com Tezosentan.....	91
5.4 Efeitos Biológicos da Fosfolipase A₂ de <i>Bunodosoma caissarum</i> em perfusão de rim isolado.....	108
5.6 Estudo da participação da cicloxigenase (COX) nos efeitos renais da Fosfolipase A₂ de <i>Bunodosoma caissarum</i> em perfusão de rim isolado.....	125

5.7 Estudo da participação da endotelina nos efeitos renais da Fosfolipase A₂ de <i>Bunodosoma caissarum</i> em perfusão de rim isolado	144
5.8 Estudo da expressão gênica da adenosina, renina, TNF-α e interleucina 1β (IL1β) em rins perfundidos com Fosfolipase A₂ de <i>B. caissarum</i>_(0,1μg/mL)..	163
6 DISCUSSÃO.....	169
7 CONCLUSÕES.....	186
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188
ANEXOS	211

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

As Toxinas de anêmonas do mar incluem vários polipeptídios, dentre os quais neurotoxinas e citolisinas com atividades biológicas variadas, despertando grande interesse na pesquisa científica (GONDRAN *et al.*, 2002). Tais substâncias apresentam natureza protéica (peptídios, proteínas, enzimas e inibidores de protease) e não-proteicas (purinas, compostos de amônio quaternário, aminas biogênicas) (BERESS, 1982; ANDERLUH E MACEK, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006), sendo peptídeos e proteínas as classes de toxinas mais extensivamente estudadas, principalmente por suas ações neurotóxicas e como estimulantes cardíacos (ENO *et al.*, 1998).

As anêmonas do mar são animais exclusivamente marinhos, do filo Cnidária ou celenterado, mesmo grupo dos corais, medusas, gorgônias, caravelas e hidras. Pertencem a classe Anthozoa, ordem Actinaria, de onde derivam-se 26 famílias distintas, sendo conhecidas mais de 1.000 espécies em todos os mares do mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Praticamente não há registros de casos graves ou fatais envolvendo Cnidários em nosso país, exceto nos acidentes relatados por Freitas *et al.* (2005) e Morandini e Marques (1997) para *Physalia physalis* e *Tamoya haplonema*, respectivamente. Entretanto diversos trabalhos têm objetivado caracterizar os mecanismos de ação de venenos e toxinas extraídos destes animais e, em particular, as anêmonas marinhas (BRUHN *et al.*, 2001; GONDRAN *et al.*, 2002).

Os cnidários estão entre os organismos mais venenosos e peçonhentos que se conhece, apesar de a maioria ser inofensiva para os humanos. Parte do seu arsenal químico, presente principalmente nas cnidas, vem despertando grande interesse farmacológico (BARNES *et al.*, 1995).

O cnidoblasto é a principal característica deste filo (Figura 1), pois são células altamente especializadas, concentrando-se principalmente nos tentáculos (Watson, 1988). Reúnem-se em grupos de até 40, constituindo verdadeiras baterias de cnidoblastos que, de um modo geral, tem a forma de um cálice. Na ponta mais larga da célula, existe uma diferenciação citoplasmática extremamente complexa, o nematocisto ou cápsula urticante que pode possuir na superfície do seu epitélio, um pequeno prolongamento do citoplasma formando uma estrutura saliente denominada cnidocílio, que é o órgão que recebe, transmite e determina a explosão do cnidoblasto (FAUSTIN e ROMANO, 1997).

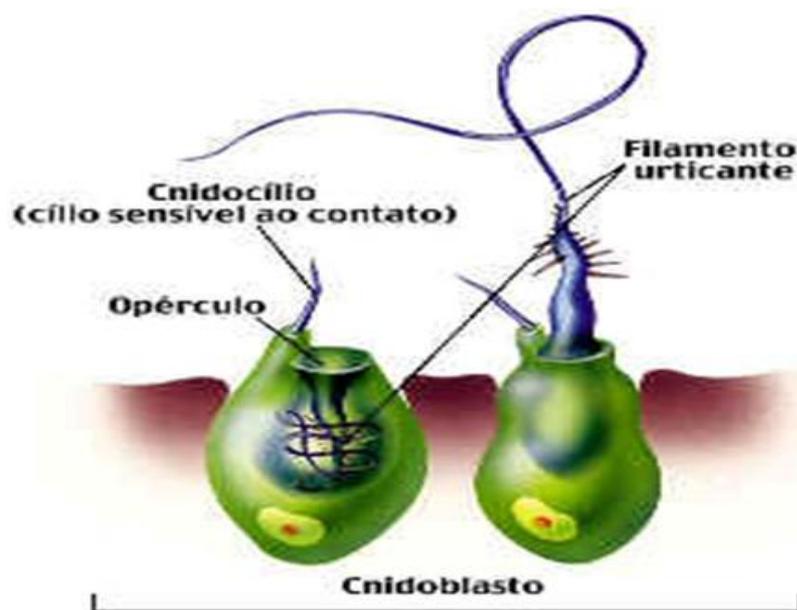


Figura 1 . Corte Transversal de um Cnidário mostrando os Cnidoblastos com nematocistos. Fonte:(A)Thieres, 2007 (B) Lima, D., 2007

O estudo químico com cnidários teve grande impulso durante a década de 60 com o descobrimento das prostaglandinas em varias espécies de corais moles do Caribe (em especial a gorgónia *Plexaura homomalla*) (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969). A extrema diversidade dos efeitos biológicos das prostaglandinas provocou,

naquele momento, a coleta indiscriminada destas espécies, pondo em perigo as populações das mesmas em varias regiões caribenhas. Felizmente o desenvolvimento de métodos de síntese em laboratório avançou rapidamente, resguardando estes corais (CORREIA *et al.*, 2002). Desde então, ficou em evidencia o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico.

A maior quantidade de metabólitos secundários de cnidários foi isolada de octocorais (alcionáceos e gorgonáceos) e de zoantídeos (BABU *et al.*, 1997). Existem muitos exemplos de terpenoides de corais que possuem atividade biológica ou farmacológica. Rinehart *et al.* (1981) estudaram a atividade antiviral, antimicrobiana e antineoplásica dos produtos naturais extraídos de 1300 amostras de 142 espécies de cnidários e encontraram que aproximadamente 32% dos extratos revelavam atividade antimicrobiana. Venkateswarlu *et al.* (1998) encontrou atividade antibacteriana de metabólitos secundários em espécies de zoantídeos. Estudos de espécies do gênero *Zoanthus sp.* revelaram atividade antiinflamatória e analgésica (GRACE e JACOBS, 1998) e inibidora de osteoporose (KURAMOTO *et al.* 1998).

No Brasil existem alguns antecedentes de estudos químicos em cnidários, principalmente anêmonas e octocorais. Freitas e colaboradores trabalham desde a década de 80 com substâncias bioactivas de anêmonas-do-mar, principalmente com *Bunodosoma caissarum* e *B. cangicum*, encontrando atividade antimetabólica, hemolítica, neurotóxica, ação em canais iônicos e antitumoral em câncer de mama humano (FREITAS e ELENA, 1991; LAGOS *et al.*, 2001; MALPEZZI *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2004, 2006).

1.2 *Bunodosoma caissarum*

Bunodosoma caissarum (figura 2) é uma anêmona marinha endêmica no litoral brasileiro. Produz uma variedade de componentes biológicos, cuja maioria ainda não foi estudada. Componentes polipeptídicos têm sido identificados no

veneno, como as neurotoxinas que afetam canais de sódio voltagem dependentes e canais de potássio (MALPEZZI *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2004) e hemolisinas (MALPEZZI *et al.*, 1993).



Figura 2. Anêmona marinha da espécie *Bunodosoma caissarum*. Fonte: Migotto, A. E. - Centro de Biologia Marinha – USP, 2007

Avaliação toxicológica da peçonha de *B. caissarum* revelou peptídios neurotóxicos e citotóxicos. Os peptídios neurotóxicos de *B. caissarum* tem sido isolados e sequenciados (MALPEZZI e FREITAS, 1991) e dentre os vários estudos que têm caracterizado os constituintes do veneno de *B. caissarum*, há muitos estudos *in vivo* investigando os efeitos centrais do veneno e seu mecanismo de ação. Gondran *et al.* (2002) observaram que o extrato bruto de *B. caissarum* promovia convulsões doses-dependente em ratos e que este efeito parecia ser devido a uma interação direta entre algum componente do extrato e os receptores NMDA, não envolvendo o aumento da liberação de glutamato ou a presença de citolisinas.

Dois peptídios neurotóxicos já foram isolados do veneno bruto da anêmona marinha *B. caissarum*, a fração denominada BcIII, cuja cadeia polipeptídica é composta por 48 aminoácidos e é letal para camundongos (DL50= 600µg/Kg) e caranguejos. Este peptídeo tem a propriedade de ligar-se ao sitio 3 dos canais de sódio voltagem dependentes e atrasar a fase de inativação destes canais (OLIVEIRA *et al.*, 2004)

Oliveira *et al.* (2006b) isolaram e purificaram da fração neurotóxica de *B. caissarum* mais um peptídeo denominado BcIV, cuja única ação parece ser paralisia de forma menos potente do que BcIII. Este neuropeptídeo possui homologia com os peptídeos BDS-I e BDS-II que bloqueiam de forma potente e seletiva os canais de potássio voltagem dependentes tipo 3.4 (DIOCHOT *et.al*, 1998). BcIV também apresenta elevada similaridade com as toxinas APETx1 e APETx2, isoladas do extrato de *Anthopleura elegantissima* que bloqueiam especificamente os canais de potássio éter-A-go-go (canais de potássio voltagem dependentes que se caracterizam por uma longa cauda N-terminal e C-terminal intracelular) e canais iônicos ácido sensíveis, respectivamente (DIOCHOT *et.al*, 2003, 2004).

Entre os peptídios citotóxicos, a imunopurina caissorona possui ação antagonista de adenosina. Alguns estudos revelaram que a *B. caissarum* promove aumento da motilidade intestinal de mamíferos induzida pela ação em receptores de adenosina do tipo A₁, apresentando também atividade hemolítica quando testada em eritrócitos de ratos, peixes, camundongos e serpentes (MALPEZZI *et.al*, 1993; FREITAS e SAWAYA, 1990). Em estudos preliminares realizados em nosso grupo observamos efeitos estimulatórios em duodeno isolado, através da utilização de extrato bruto de *B. caissarum* (Dados não mostrados).

Componentes citolíticos, conhecidos como hemolisinas, têm sido encontrados em pelo menos 37 espécies de anêmonas marinhas, distribuídas em sete famílias – Actiniidae, Acontiphoridae, Aiptasiidae, Aliciidae, Metridiidae, Sgartiidae e Stichodactyidae (SHIOMI *et al.*, 1997; JIANG *et al.*, 2002; UECHI *et al.*, 2005). Eles têm sido classificados em quatro grupos principais (I a IV) com massa molecular variando de 5.000 a 80.000 Da e alguns apresentando atividade enzimática, como a fosfolipase A₂ (GROTENDORST e HESSINGER, 2000; JIANG *et al.*, 2002; ANDERLUH E MACEK, 2002; UECHI *et al.*, 2005).

A atividade citolítica de *B. caissarum* tem sido caracterizada e parece ocorrer devido à presença de citolisinas que podem ser inibidas por lipídios de membrana como a esfingomielina, que preferencialmente inibe as hemolisinas do grupo II, conhecidas como actinoporinas, que são compostos por proteínas

cardiotônicas com peso molecular variando de 15.000 a 20.000 Da (OLIVEIRA *et al.*, 2004; MARTÍN-BENITO *et al.*, 2000).

As actinoporinas produzem efeitos citolíticos em eritrócitos, plaquetas e fibroblastos, através da formação de canais cátion-seletivos (MALPEZZI e FREITAS, 1991; MACEK, 1992; MARTÍN-BENITO *et al.*, 2000). Miguez *et al.* (1999) demonstraram que uma toxina citolítica, a Bc2 do veneno de *B. caissarum*, promove a liberação de catecolaminas por células cromafins da adrenal de bovinos e induz liberação sinaptossomal de glutamato em córtex cerebral de ratos (ALES *et al.*, 2000).

Mais recentemente, Oliveira *et al.* (2006a) descreveram a caissarolisina I (Bcsl), uma hemolisina com atividade de fosfolipase A₂, diferente de algumas actinoporinas conhecidas, como as St I e St II (LANIO *et al.*, 2001). Fosfolipases A₂ são freqüentemente encontradas em venenos de muitos vertebrados e invertebrados e, nas anêmonas marinhas, algumas são consideradas hemolisinas (ANDERLUH e MACEK, 2002; NEVALAINEN *et al.*, 2004).

1.3 Fosfolipases A₂ - (PLA₂)

Além dos vertebrados, PLA₂ tem sido encontrada em uma variedade de outros filos, incluindo invertebrados marinhos (MCINTOSH *et al.*, 1995; SHIOMI *et al.*, 1998; MACPHERSON e JACOBS, 2000; KISHIMURA *et al.*, 2000; TALVINEN e NEVALAINEN, 2002; NEVALAINEN *et al.*, 2004). Elevada atividade de PLA₂ tem sido reportada em anêmonas marinhas, corais duros, corais de fogo, estrelas do mar, pepinos do mar e esponjas marinhas (NEVALAINEN *et al.*, 2001, 2004).

Estas enzimas hidrolisam as ligações 2-acila dos fosfolipídios, gerando produtos como lisofosfolipídios e ácidos graxos, envolvendo uma variedade de respostas fisiológicas, incluindo inflamação (DENNIS, 1994; NEVALAINEN *et al.*, 2004), homeostase da membrana celular, digestão de lipídios, defesa do hospedeiro, transdução de sinal e produção de mediadores lipídicos, como os eicosanóides, que

exercem potentes ações biológicas (VALENTIN e LAMBEAU, 2000). Dentre os efeitos biológicos observados, a PLA₂ possui um papel chave na digestão de fosfolipídios, efetores de atividade antibacteriana (WEINRAUCH *et al.*, 1996), regulação em potencial de várias doenças (NEVALAINEN, 1993; VADAS *et al.*, 1993) e marcadores do Câncer (PARK *et al.*, 2003; KENNEDY *et al.*, 1998). O estudo da inflamação ocupa um capítulo a parte no interesse pelas PLA_{2s}, pois estas enzimas são as principais envolvidas na liberação do ácido araquidônico, responsável pela biossíntese de lipídios mediadores da inflamação como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Historicamente, a atividade de PLA₂ foi primeiramente observada no suco pancreático e em venenos de serpentes (DENNIS, 1997) sendo proposto um papel na digestão de fosfolipídios em nível intestinal, para estas enzimas. Devido a sua abundância nos venenos e facilidade de purificação, PLA_{2s} de venenos foram as primeiras fosfolipases A₂ secretórias estudadas (sPLA_{2s}) (VALENTIN e LAMBEAU, 2000).

As PLA_{2s} são divididas em dois grupos maiores, sendo um grupo de PLA_{2s} citosólicas (cPLA_{2s}), que são intracelulares, possuem elevados pesos moleculares e podem ser encontradas em vários tipos celulares, enquanto outro grupo é composto pelas PLA_{2s} secretórias (sPLA_{2s}), de baixos pesos moleculares, extracelulares e podem ser encontradas no suco pancreático de mamíferos ou nos venenos de serpentes (GLASER *et al.*, 1993; De CASTRO *et al.*, 2000).

De acordo com as estruturas primárias e distribuição, as fosfolipases A₂ secretórias podem ser divididas em 12 grupos e subgrupos, dos quais três grupos são os mais conhecidos (NEVALAINEN *et.al*, 2004):

- **Grupo I de sPLA_{2s}:** Obtido dos venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hidrofídea*, assim como do pâncreas de mamíferos;
- **Grupo II de sPLA_{2s}:** Oriundo dos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*, bem como do líquido sinovial e das plaquetas de seres humanos.

- **Grupo III de sPLA_{2s}:** Este grupo foi primeiramente identificado em veneno de abelha (KUCHLER *et al.*, 1989) e depois em venenos de outros invertebrados, como as águas vivas (LOTAN *et al.*, 1995), mamangaba (HOFFMAN *et al.*, 1997) e escorpião (ZAMUDIO *et al.*, 1997; CONDE *et al.*, 1999).

Os grupos I e II de sPLA_{2s} possuem elevada homologia em suas estruturas primária e terciária, ambos contendo seis pontes dissulfeto. Distinguem-se pela presença/ausência de uma seqüência propeptídica chamada “alça pancreática”, que consiste numa extensão C-terminal e um grupo dissulfeto específico (LAMBEAU e LAZDUNSKI, 1999).

O grupo III de sPLA_{2s} contém dez resíduos de cisteína, sendo constituído por 1 ou 2 subunidades. Este grupo se distancia dos grupos I e II e, ao comparar-se suas estruturas primárias, observa-se uma homologia somente na região de ligação com cálcio (Ca⁺² loop) e nos sítios ativos (DAVIDSON e DENNIS, 1990), com semelhança em suas estruturas terciárias (SCOTT *et al.*, 1990).

PLA₂ extraída do veneno de abelha hidrolisa fosfolipídios de membrana em eritrócitos e mastócitos, apresentando também atividade antimicrobiana contra enterobactérias e *Trypanosoma brucei brucei* (BOUTRIN *et al.*, 2008).

A PLA₂ do grupo III humanas parece ter ligação com a aterogênese, semelhante ao que ocorre com PLA_{2s} das classes V e X (SATO *et al.*, 2008). Os efeitos pro-aterogênicos parecem estar ligados a fenômenos relacionados com a circulação, através da formação de partículas de LDL densas, e a parede vascular, com a hidrólise de lipoproteínas que ligam-se fortemente a matriz extracelular de proteoglicanos, o que leva a retenção destas lipoproteínas na parede vascular. Este acúmulo de lipídios fica susceptível a futuras modificações por enzimas e macrófagos, levando ao acúmulo intracelular de lipídios (HURT-CAMEJO *et al.*, 2008).

Um tipo especial de sPLA_{2s} foi isolada do caracol *Conus magus*. Esta PLA₂ não apresenta nenhuma homologia significativa com outras sPLA_{2s}, exceto por

alguns resíduos no sítio ativo, sendo classificada numa nova classe, chamada grupo IX (DENNIS, 1997).

Nevalainen *et al.* (2004) estudaram a atividade fosfolipásica em extratos de diferentes tecidos de várias espécies de Cnidários das quatro classes, Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Anthozoa. Este estudo permitiu concluir que a atividade fosfolipásica é variável neste filo, entretanto a maioria das espécies possuem considerável atividade de fosfolipase A₂ principalmente nos extratos de tentáculos e acontia, órgãos que apresentam grande quantidade de cnidócitos, o que sugere a presença da PLA₂ no veneno destes organismos, caracterizando a participação da PLA₂ na toxicidade exercida por este filo.

A atividade fosfolipásica pode produzir diversos efeitos, como a produção de prostaglandinas, importantes vasodilatadoras renais, como PGE₁, PGE₂, PGA₁, PGA₂, PGH₂, PGI₂, PGG₂, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente diurese, natriurese e caliurese ou produz PGF₂ α cuja ação é vasoconstritora. Além das prostaglandinas, a PLA₂, através da ciclooxigenase (COX), pode ativar o tromboxano A₂ que também possui ação vasoconstritora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BYDLOWSKI, 2000).

As sPLA₂ têm sido extensivamente estudadas em mamíferos, todavia suas funções fisiológicas e patofisiológicas ainda permanecem obscuras (PARK *et al.*, 2003). Uma série de pesquisadores, utilizando-se de uma grande variedade de metodologias e sistemas têm dedicado-se ao estudo da atividade catalítica da PLA₂. Alix e Woodbury (1997) observaram a presença de uma corrente em canais iônicos, provavelmente gerada pela presença de ácidos graxos oriundos da ação catalítica de PLA₂.

cPLA₂ liberam ácido araquidônico para a síntese de eicosanóides, contribuindo para o fenômeno de lesão celular, o que parece ocorrer através de mecanismos variados, dentre os quais, a elevação das concentrações citosolicas de Ca²⁺ induziria a translocação de PLA₂ do citosol para a membrana intracelular através de sua porção N-terminal dependente de Ca²⁺. A translocação facilitaria o

aceso da cPLA₂ ao substrato fosfolipídico e subsequentemente liberação de ácido araquidônico livre para ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) ou lipoxigenase. Acredita-se também que a atividade enzimática CPLA₂ pode ser aumentada através da fosforilação em uma serina-505 por proteínas quinases ativadas por mitógenos (JIANHONG *et al.*, 2001; GIJON *et al.*, 1999; LESLIE, 1997).

As cPLA_{2α} são críticas para a liberação de ácido araquidônico para síntese de prostaglandinas e leucotrienos (UOZUMI *et al.*, 1997; BOVENTRE *et al.*, 1997). As isoformas de PLA₂ que são independentes de cálcio, mas que também utilizam uma serina catalítica, parecem estar envolvidas em funções como remodelamento da membrana (BALSINDE *et al.*, 1997), espermatogênese (BAO *et al.*, 2004) e regulação de canais de cálcio “sensíveis a armazenamento” (*store-operated*) (SMANI *et al.*, 2004). Há cerca de 10 sPLA₂s (GELB *et al.*, 2000; VALENTIN *et al.*, 1999) que usam uma histidina catalítica e que têm sido implicadas na amplificação da geração de eicosanóides dependentes de cPLA_{2α} (SATAKE *et al.*, 2004; MOUNIER *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2003), assim como na regulação da exocitose granular secretória (ENOMOTO *et al.*, 2000). Todavia, em certas circunstâncias, sPLA₂ pode regular a geração de eicosanóides independentemente da presença de cPLA_{2α} (AKIBA *et al.*, 2001).

As atividades biológicas da maioria das PLA₂ têm sido atribuídas a suas capacidades enzimáticas de hidrolisar fosfolipídios de membrana, com conseqüente produção de ácido araquidônico e lisofosfolipídios. Contudo, baseando-se nestas características, tem sido difícil compreender muito dos seus efeitos (REDDY *et al.*, 1997; KENNEDY *et al.*, 1995; NAIR *et al.*, 1993). Entre as PLA₂ secretórias, o grupo IIa contém enzimas que possuem um papel chave na patogênese de doenças inflamatórias, nas quais observa-se níveis locais e sistêmicos elevados, como no choque séptico, artrite reumatóide, e falha múltipla de órgãos (NAIR *et al.*, 1993;).

Diversos estudos têm revelado que os efeitos tóxicos das PLA₂s extraídas de venenos podem não estar correlacionados com sua ação catalítica, sendo seu efeito dependente da ligação a proteínas – alvo (VALENTIN *et al.*, 1999). Isto levou a identificação, nas décadas passadas, de uma variedade de proteínas que se ligam a PLA₂ e podem estar envolvidas na sua toxicidade (LAMBEAU *et al.*, 1999;

GUTIERREZ, *et. al.*, 1995). Estes estudos têm reforçado os achados que sugerem que a PLA2 exerce efeitos independentemente de sua ação enzimática (VALENTIN e LAMBEAU, 2000).

1.4 Peptídeos Vasoativos no Rim

Existe no rim um importante balanço entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores, responsável pela regulação da filtração glomerular. Dentre os agentes vasoconstritores devem ser ressaltados: peptídeos como a angiotensina (Ang II) e endotelina, além de outras substâncias como adenosina, PAF (Fator Ativador de Plaquetas) e metabólitos do ácido araquidônico (PGs, tromboxano A₂ e leucotrienos). Os agentes vasodilatadores incluem peptídeos como bradicinina e peptídeos natriuréticos, além de outras substâncias como óxido nítrico, algumas PGs e dopamina (GRACIANO e NORONHA, 2003).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) exerce um papel fundamental na manutenção da hemodinâmica renal. Os estímulos primários para a secreção de renina renal dependem, basicamente, da redução da pressão de perfusão renal e da redução da ingestão de sódio ou perda de sódio. O aumento da pressão de perfusão renal na arteríola aferente induz diminuição da secreção de renina, enquanto a redução da pressão de perfusão renal aumenta a secreção de renina (RABKIN e DAHL, 1993; HSUEH e ANTONIPILLAI, 1995). O Conteúdo de cloreto de sódio na alça de Henle, local da mácula densa, regula a secreção de renina. Hackenthal *et al.* (1990) demonstraram que a infusão de sais de sódio (outros que não cloreto de sódio) não consegue diminuir a liberação de renina, enquanto a infusão de variadas concentrações de cloro produz alterações da secreção de renina, comportamento semelhante ao que ocorre na bomba de Na⁺/K⁺/2Cl⁻ no ramo ascendente da alça de Henle.

A família das endotelinas é composta por três peptídeos de 21 aminoácidos cada: endotelina –1 (ET-1), endotelina – 2 (ET –2) e endotelina – 3 (ET

–3). A expressão das três endotelinas é diferente nos diversos tecidos. A ET –1 é a única endotelina expressa no endotélio vascular e foi também detectada em cérebro, rim e pulmão. ET-1 é a forma clássica da endotelina e é a única forma do peptídeo encontrada na circulação humana. Apresenta efeito vasoconstrictor 10 vezes mais potente do que a angiotensina II, com importante função na regulação da pressão sanguínea e foi a primeira endotelina isolada e purificada, sendo extraída do sobrenadante de cultura de células endoteliais da aorta de bovinos (YANAGISAWA *et al.*, 1988).

As endotelinas ET-2 e ET-3 são produzidas no cérebro, rim, supra-renal e intestino. Todas as isoforma de endotelina são potentes vasoconstrictores. Receptores específicos para endotelina foram identificados em diversos tecidos (SIMONSON e DUNN, 1981). Os receptores de endotelina, receptor tipo A (ET-R_A) e receptores tipo B (ET-R_B), apresentam afinidades diferentes para as várias isoformas de endotelina. ET-1 age principalmente no ET-R_A. A afinidade para ET-R_A das diferentes endotelinas é: ET-1>ET-2>ET-3. Já o ET-R_B tem afinidade semelhante para as três isoformas (GRACIANO e NORONHA, 2003).

Infusão exógena de ET-1 reduz fluxo plasmático renal e filtração glomerular e aumenta resistência vascular renal. Estes efeitos são parcialmente ou totalmente prevenidos por antagonistas dos receptores de adenosina seletivos ou não seletivos (SCHUMETTERER *et.al.*, 1998; BOHN *et al.*, 2003; VUURMANS *et. al.*, 2004; MOTTE *et. al.*, 2006).

Adenosina atua na hemodinâmica de órgãos como rins, cérebro e coração. Quatro subtipos de receptores adenosina têm sido descritos: A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃. A₁ e A₃ são acoplados a proteínas G_{iα} com ativação de fofolipase C e inibição da adenil ciclase, enquanto A_{2a} e A_{2b} ativam proteínas G_{sα}, que estimula proteína quinase A, com ativação de adenil ciclase e geração de AMP cíclico (HANSEM e SCHNERMANN, 2003; JACKSON e DUBEY, 2001).

Nos rins os receptores A₁ (A₁ –Rs) têm sido localizados na arteríola aferente, glomérulo, túbulo contorcido proximal e ducto coletor, enquanto A_{2a}–Rs são primariamente encontrados na arteríola eferente (McCOY *et al.*, 1993; WELCH, 2002; MODLINGER e WELCH, 2003).

A ativação renal do receptor A_1 -R na arteríola aferente resulta em vasoconstricção que reduz a taxa de filtração glomerular e fluxo sanguíneo renal, além de mediar o feedback tubuloglomerular (MODLINGER e WELCH, 2003). A infusão de antagonistas A_1 -R não seletivos na vasculatura renal causa diurese e natriurese, o que demonstra a importância destes receptores na reabsorção de água e sódio (WELCH, 2002). Estes receptores exercem um papel importante na nefrotoxicidade mediada pela ciclosporina (PREVOT *et al.*, 2002).

Na maioria dos vasos sanguíneos os receptores A_{2a} -Rs e A_{2b} -Rs promovem acentuada vasodilatação (ALI *et al.*, 1996), todavia evidências obtidas nos anos 60 sugerem que a vasculatura renal difere dos demais leitos vasculares e ação da adenosina no rim seria potencialmente vasoconstrictora, em qualquer receptor (HANSEM e SCHNERMANN, 2003).

Uma extensa revisão bibliográfica realizada por Hansen e Schnerman (2003), concluiu que adição de adenosina exógena, com elevação da adenosina plasmática para valores acima dos limites normais, causa uma resposta vasodilatadora renal mediada pela ativação dos receptores A_{2a} -R na maioria da vasculatura renal, incluindo artérias renais, arteríolas aferentes justaglomerulares, arteríolas eferentes e vasos medulares. Mais do que uma ação simples, estes efeitos combinados somados a ação da adenosina no endotélio, com liberação de óxido nítrico (NO) e outros fatores de relaxamento endoteliais, são os responsáveis pelos efeitos da adenosina exógena. Em contraste, o segmento da arteríola aferente presente no glomérulo responde a adenosina exógena com vasoconstricção, ação mediada pelos receptores A_1 -R.

Existem indícios que o PAF esteja associado com os efeitos tóxicos do TNF- α e IL-1 (SALLES *et al.*, 1999). No rim o PAF causa vasoconstricção renal com diminuição do fluxo sanguíneo, redução da taxa de filtração glomerular, excreção reduzida de sódio pela urina, com oligúria e retenção hidroeletrolítica. Como efeito compensador pode atuar na liberação de prostaglandinas vasodilatadoras no rim (DOUGLAS, 2000).

Os principais peptídeos vasodilatadores renais são a Bradicininina (sistema renal caliceína-cinina), o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Óxido Nítrico (NO), Prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) e Dopamina.

A bradicininina, importante mediador, foi descrita por três farmacologistas brasileiros, Gastão Rosenfeld e Wilson Beraldo, liderados por Maurício Rocha e Silva, do Instituto de Biologia de São Paulo, no ano de 1948. A atividade hipotensora da bradicininina foi demonstrada no sangue de animais inoculados com o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, em estudos de toxicologia de veneno de serpentes (Prado *et al.*, 1950).

Em terminações nervosas sensíveis ela causa ativação das vias da dor, sendo uma das causas da dor em qualquer processo inflamatório. Este efeito é potenciado por determinadas prostaglandinas. Há dois receptores, BK₁ e BK₂. O BK₁ só é expresso após danos teciduais ou após produção da citocina interleucina-1 e terá papel principal na dor crônica. O BK₂ é expresso normalmente em algumas células, como as do músculo liso, sendo responsável por esse efeito. A sua ação nos vasos é devido, em parte, à produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (MARGOLIUIS, 1995).

Os estudos iniciais da ação renal das cininas, realizados por Webster *et al.* (1964) e Gill *et al.* (1965) demonstravam que a infusão aguda de doses farmacologicamente ativas de cininas induzia um importante efeito de vasodilatação renal, com aumento do fluxo sanguíneo renal e aumento da excreção de sódio e água, o que sugere que as cininas sejam capazes de regular o fluxo sanguíneo renal.

A administração crônica de bradicininina na artéria renal mostrou que, embora a vasodilatação renal permaneça, o aumento na excreção de sódio e água não se mantém ao longo do tempo (GRANGER e HALL, 1985). A bradicininina tem um potente efeito relaxante na arteríola glomerular, promovendo vasodilatação tanto na arteríola aferente como na eferente, sendo esta última de uma maneira dose-dependente (GRACIANO e NORONHA, 2003).

O Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) é um potente hormônio natriurético produzido principalmente pelos miócitos do átrio cardíaco em resposta à distensão local da parede atrial. O ANP age principalmente nos rins, na vasculatura e nas

glândulas supra-renais através de receptores específicos. Os principais efeitos do ANP são a inibição do transporte de sódio, supressão da liberação de renina e aldosterona e vasodilatação. Desta forma leva a diurese, natriurese e diminuição da pressão arterial (BRENNER *et al.*, 1990; COGAN, 1990; GRACIANO e NORONHA, 2003).

O óxido nítrico promove vasodilatação renal, com diminuição da resistência vascular renal e aumento da filtração glomerular, assim como as prostaglandinas PGE₂ e PGI₂. A dopamina produz um efeito vasodilatador que eleva o fluxo renal de sangue sem elevar filtração glomerular, pois promove a redução da resistência das arteríolas aferentes e eferentes (GRACIANO e NORONHA, 2003).

1.5 Toxinologia Renal

Diversas toxinas podem apresentar atividade nefrotóxica de forma variável. Pirotzky *et al.* (1984) em estudo no modelo de rim isolado demonstraram que o rim seria capaz de produzir diversas substâncias, como histamina, serotonina e indiretamente, fator de agregação plaquetária (PAF).

O estudo da toxicidade renal em perfusão de rim isolado tem despertado grande interesse na linha de pesquisa em venenos ofídicos, haja visto a capacidade destes venenos de provocar insuficiência renal. Em estudo *in vivo*, Koscinczuk *et al.* (2004) avaliaram a ação do veneno da serpente *Bohrops neuwiedii iporus* em ratos, de onde observou-se que a injeção intramuscular deste veneno provocou insuficiência renal aguda, acompanhada por lesões degenerativas do epitélio tubular renal.

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Entre elas podemos citar glomerulonefrite (Seedat *et al.*, 1974), glomerulite e nefrite intersticial (Sant e Pundare, 1972), arterite e necrose tubular (Sitprija e Boonpucknavig, 1979), necrose cortical (Varagunam e Penabokke, 1970) e insuficiência renal (Raab e Kaiser, 1966). De todos, o mais relatado tem sido

a insuficiência renal. Ainda foram descritos a ocorrência de hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (Sitprija e Boonpucknavig, 1979).

A insuficiência renal aguda (IRA) descrita por vários autores (Ribeiro, *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1979; Amorim *et al.*, 1969; é a causa principal de mortes nos acidentes ofídicos mesmo após o tratamento com soro antiofídico, que melhora o estado geral do paciente, mas não previne o surgimento da IRA (Amaral *et al.*, 1986, Sitprija e Chaiyabut, 1999). Apesar dos avanços significativos ocorridos no entendimento da patogênese da IRA nefrotóxica e da IRA isquêmica, nos últimos 50 anos, ocorreram poucas mudanças em termos de mortalidade (Schrier *et al.*, 2004).

Martins *et al.* (1998) mostraram que as alterações renais induzidas pelo veneno de *Crotalus durissus cascavella* eram resultantes do efeito direto deste sobre o rim isolado de rato, e que a dexametasona era capaz de bloquear todas as alterações renais induzidas nesse modelo. Monteiro *et al.* (2001), em estudo sobre os efeitos renais do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, observaram que este produziu um aumento no ritmo de filtração glomerular e no fluxo urinário, mas de forma contrária ao ocorrido com o veneno de *Crotalus durissus cascavella*, produziu um decréscimo na pressão de perfusão (Martins *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 2001).

Diversas PLA2s extraídas de venenos de serpentes têm demonstrado potencial em provocar lesão renal em perfusão de rim isolado, em particular aquelas extraídas de serpentes do gênero *Bothrops*, como a PLA2 extraída do veneno de *Bothrops jararacussu*, que apresenta importante capacidade de induzir alterações em parâmetros renais como pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular, apresentando ainda importante diminuição dos transportes renais de sódio e potássio, estes efeitos parecem ser bloqueados em parte pela adição de indometacina, o que reforça a possível ação direta, em proteínas específicas, da PLA2 (Barbosa *et al.*, 2005). Efeitos semelhantes foram obtidos com a PLA2 extraída do veneno de *B. insularis*, cuja ação assemelhou-se aquela observada no veneno de *B. Jararacussu*, exceto pelo fato da *B. insularis* não afetar o transporte de potássio (Braga *et al.*, 2007).

Em perfusão de rim isolado o estudo da toxicidade renal tem avançado com o estudo destes efeitos em diferentes espécies, como os venenos das serpentes

brasileiras *Bothrops jararacaca* (MONTEIRO E FONTELES, 1999), *Bothrops jararacussu* (HAVT *et al.*, 2001), *Bothrops moojeni* (BARBOSA *et al.*, 2002), *Crotalus durissus terrificus* (MONTEIRO *et al.*, 2001), *Crotalus durissus cascavella* (MARTINS *et al.*, 1998, MARTINS *et al.*, 2002), *Crotalus durissus collilineatus* (AMORA *et al.*, 2006). Toxinas de algas (microcystina-LR) (NOBRE *et al.*, 1999 e NOBRE *et al.*, 2002), peixes (*Thalassophryne nattereri*; FACÓ *et al.*, 2005), lectinas vegetais (TEIXEIRA, 2001) e veneno escorpiônico (*Tityus serrulatus*; ALVES *et al.*, 2005).

No filo Cnidária observou-se que administração intravenosa do veneno da anêmona marinha *Phyllodiscus semoni* induziu nefrotoxicidade em 24 horas com ativação do sistema complemento. Os efeitos observados foram lesão no endotélio dos capilares glomerulares, formação de trombo, mesangiólise, ruptura parcial da membrana basal glomerular, acompanhada por severa necrose tubular aguda (MIZUNO *et al.*, 2000). Biópsia renal revelou necrose tubular aguda nos rins de pacientes acidentados com anêmona marinha (MIZUNO *et al.*, 2007) e água-viva (DEEKAJORNDECH *et al.*, 2004), cujos principais efeitos foram hemoglobinúria, com subsequente insuficiência renal aguda.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As anêmonas marinhas apresentam como característica principal a presença dos cnidoblastos, que ejetam substâncias urticantes com ações neurotóxicas, cardiopáticas e de citolisinas (OLIVEIRA *et al.*, 2006a).

Os acidentes com anêmonas marinhas não constituem um grave problema de saúde pública (FREITAS *et al.*, 2005). Todavia desde os anos 60, após os estudos que evidenciaram a presença de prostaglandinas em corais do Caribe, ficou evidenciado o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico, o que despertou o interesse da comunidade científica (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969; CORREIA *et al.*, 2002).

A anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* é endêmica no litoral brasileiro. Produz uma variedade de componentes biológicos, cuja maioria ainda não foi estudada. Dentre os componentes estudados já se evidenciou efeitos como ação em canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (MALPEZZI *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2004), ação em receptores NMDA (GONDRAN *et al.*, 2002), antagonismo de adenosina (MALPEZZI *et al.*, 1993; FREITAS E SAWAYA, 1990), citolítico (UECHI *et al.*, 2005) e caracterização de um componente PLA₂ (ANDERLUH e MACEK, 2002; NEVALAINEN *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006a).

Alguns estudos têm relatado casos de envenenamento de Cnidários cujas vítimas desenvolveram insuficiência renal aguda (MIZUNO *et al.*, 2007; DEEKAJORNDECH *et al.*, 2004), todavia o estudo da ação renal dos componentes presentes na anêmona marinha *B. caissarum* ainda são escassos, revelando a necessidade de estudos sobre o impacto renal desta espécie de Cnidários.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar os efeitos vasculares e renais do extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* e sua fração Fosfolipase A₂.

3.2 Específicos:

- ✓ Estudar os efeitos induzidos pelo extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* e sua fração de PLA₂ em rim isolado de rato;
- ✓ Investigar a participação da ciclooxigenase e da endotelina nos efeitos biológicos produzidos pelo extrato bruto de *B. caissarum* e sua fração de PLA₂ em rim isolado de rato;
- ✓ Estudar os efeitos promovidos pelo extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* e sua fração de PLA₂ em leito vascular mesentérico;
- ✓ Estudar a ação da fração PLA₂ do extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* na regulação da expressão dos mRNA dos receptores de renina, adenosina (A1 e A2a), TNF- α e IL-1 β .

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DROGAS E REAGENTES

O extrato bruto e a fração de fosfolipase A₂ (PLA₂) da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* foram gentilmente cedidos pelo professor Marcus H. Toyama, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Litoral Paulista, para realização dos ensaios biológicos.

Indometacina foi obtido pela Sigma Chemical (MO-USA) e foi diluída em bicarbonato de sódio a 5%. Fenilefrina foi obtida de Sigma (Louis, MO) e diluída na solução de perfusão antes do experimento. Tezosentan foi generosamente cedida pela Actelion Pharmaceuticals (Basel, Switzerland).

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes do experimento com água “*ad libitum*” para a realização dos experimentos com o rim isolado. Os animais utilizados nos experimentos com leito vascular isolado não foram submetidos a jejum.

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO DE *Bunodosoma caissarum* E SUA FRAÇÃO PLA₂

Foram coletadas 60 espécimes de *B. caissarum* (cada uma com aproximadamente 13 gramas) em períodos de maré baixa de rochas nas margens do canal de São Vicente, na costa sudeste do estado de São Paulo- SP. Os animais foram transportados e mantidos em aquário por 72 horas, para eliminação de qualquer conteúdo das suas cavidades gastrovasculares. Os tentáculos foram removidos e imediatamente colocados em solução aquosa de 0,1%TAF. Os tentáculos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento. Após o último ciclo a solução foi centrifugada a 20.000xg a 4°C. O sobrenadante foi removido e filtrado através de um filtro de 0,45 micrometros, seguido de outra filtração em filtro de 0,22 micrometros. A proteína do extrato bruto foi obtida por precipitação ácida, usando ácido tricloroacético a 10% em solução. A precipitação ácida ocorreu a 4°C e solução resultante foi centrifugada a 4000xg por 120 minutos a 4°C. O pellet final foi dissolvido completamente com água liofilizado, sendo guardado para posterior análise.

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) em Fase Reversa

Amostras liofilizadas provenientes da etapa de exclusão molecular em gel Sephadex G75 foram purificadas em colunas m-Bondapack C18 de fase reversa analítica (0,39 cm x 30 cm) (Waters Corp.). Inicialmente, cada amostra liofilizada foi dissolvida com 0,1 mL de bicarbonato de amônio (0,4 M) até a sua completa dissolução e posteriormente sonicadas, obtendo-se um extrato bruto que foi acrescido com igual volume de ácido trifluoroacético (TFA 0,1%). Cada amostra foi então novamente homogeneizada em um agitador e centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi aplicado na coluna. A coluna de fase reversa analítica foi equilibrada com tampão A (TFA 0,1%; 1mL de ácido trifluoroacético em 999 mL de água) e as amostras eluídas com um gradiente linear do tampão B (0,035 % TFA, 66% acetonitrila). A amostra foi eluída com um fluxo constante de 1,0 mL/min e a absorbância medida em 280nm. O sistema usado foi HPLC – PDA 991 (Waters),

equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um detector PDA 991 e um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 2,0 mL.

4.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)

A eletroforese em PAGE-SDS foi realizada de acordo com o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987), e utilizada para estimar a massa molecular das proteínas e verificar o grau de pureza do material fracionado.

As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 10%. A solução de poliacrilamida usada para preparação do gel de concentração foi acrilamida e bisacrilamida (40%T, 3%C) e para o preparo do gel de corrida foi feita uma solução de acrilamida e bisacrilamida (40%T, 6%C).

O gel de concentração e o gel de corrida foram preparados com tampão Tris-HCl (pH 8,45) na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 1% em solução. A corrida eletroforética foi realizada usando dois tipos de tampões: o anódico (Tris-HCl; 0,2 M; pH 8,9) e o catódico (Tris-HCl, 0,16 M, pH 8,9 com 0,01% de tricina). A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments).

As amostras e os marcadores de peso molecular padrão foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl; 0,075 M; pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi realizada a 25 mA e os géis foram posteriormente corados com solução de Coomassie brilliant blue (0,05%) a 37°C e o excesso de corante removido com ácido acético 7%, permitindo a visualização das bandas protéicas.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

4.4.1.1 Sistema utilizado

A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a técnica de perfusão de rim isolado. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles et al., 1983) com dois subsistemas, um in situ e outro em circuito fechado, para perfusão in vitro, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C. Este sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constante as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema (Figura 3).

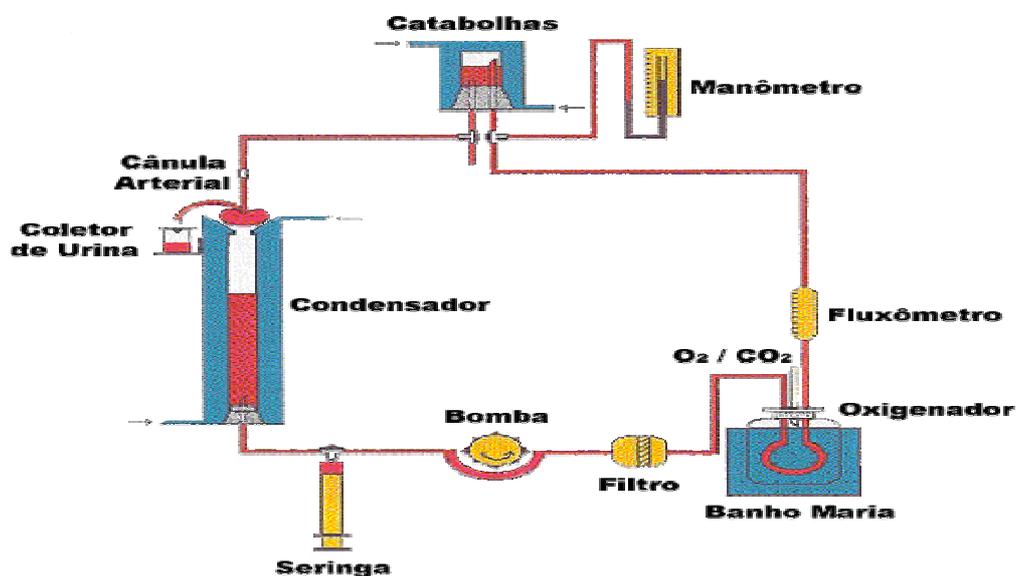


Figura 3: Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado

4.4.1.2 Calibração do sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. Foi avaliado em cada uma das bombas a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/h) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 4, 5 e 6, abaixo.

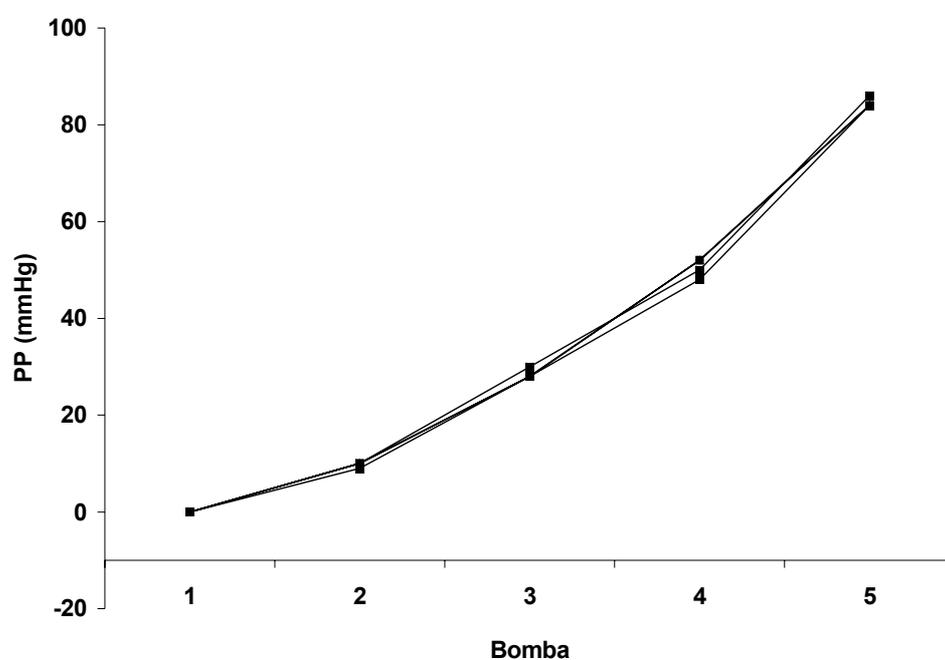


Figura 4. Valores registrados de pressão de perfusão (PP) durante a calibração do sistema (n = 6)

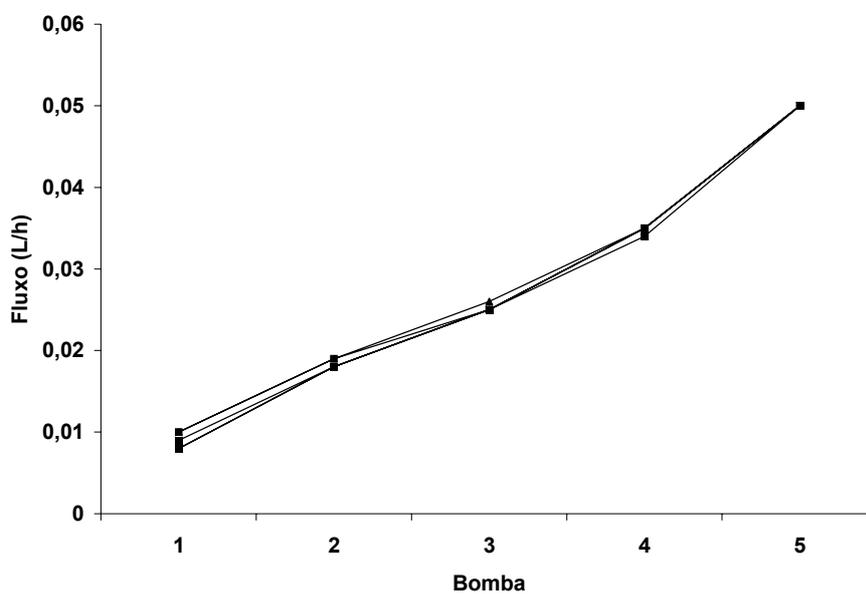


Figura 5. Valores registrados pelo Fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6)

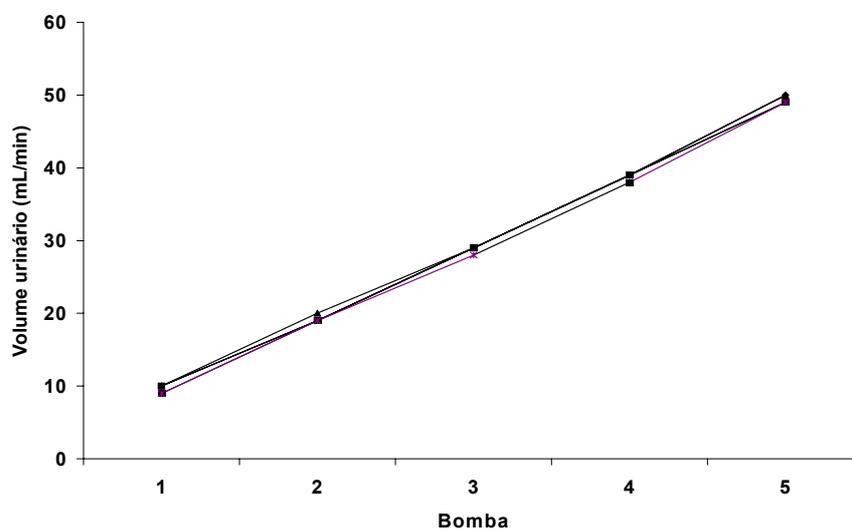


Figura 6. Valores registrados de volume urinário (mL/min) durante a calibração do sistema (n = 6)

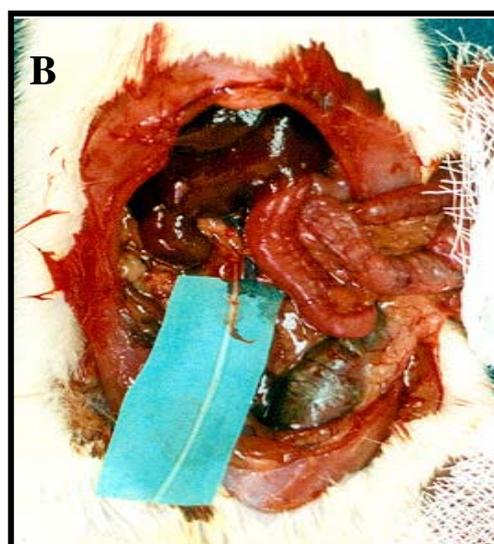
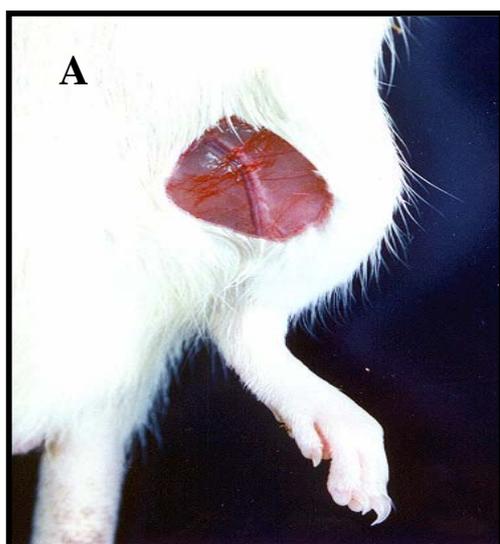
4.4.1.3 Solução perfusora

A solução perfusora utilizada foi Krebs-Henseleit, contendo albumina a 6g% dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (Hanson e Ballard, 1968).

4.4.1.4 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente a veia femoral foi isolada e o manitol (100 mg) administrado, a fim de facilitar a canulação posterior do ureter.

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba, para uma melhor observação das estruturas anatômicas. Rebateram-se as vísceras abdominais para o lado esquerdo, a fim de facilitar a visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas (figura 7).



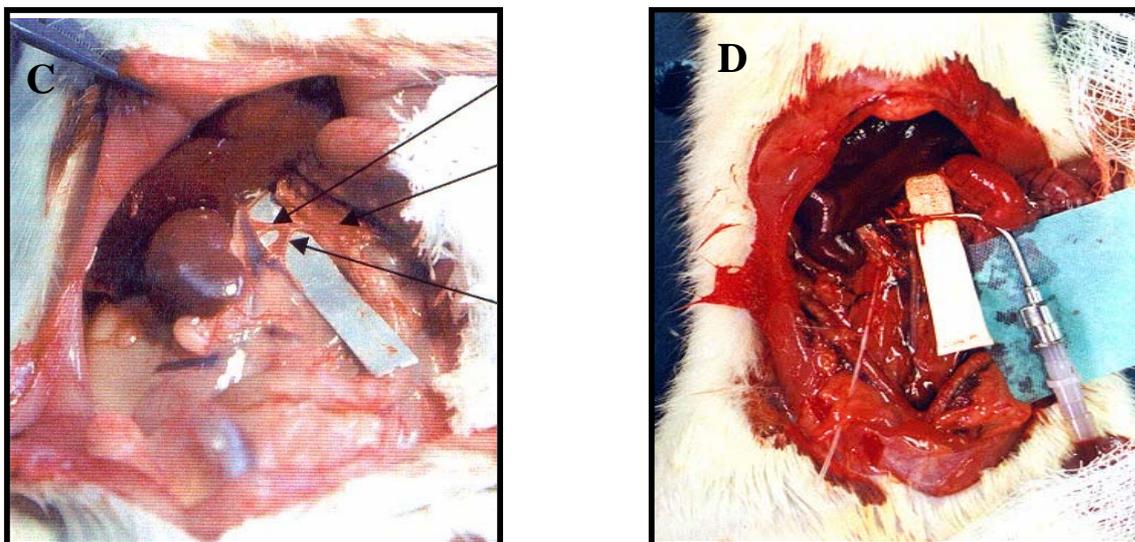


Figura 7. Procedimento cirúrgico para perfusão de rim isolado. **A:** isolamento da artéria femoral para injeção de manitol; **B:** isolamento e fixação da cânula ao ureter; **C:** isolamento das artérias mesentérica e renal; **D:** cânula fixada a artéria renal.

Com uma lupa (7X) a artéria mesentérica superior foi identificada e dissecada, bem como o ureter e a glândula supra-renal. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Injetou-se mais 100 mg de manitol e 50 unidades de heparina pela veia femoral. A cânula arterial renal foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi feita a fixação da cânula.

No início do procedimento cirúrgico uma parte da solução (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, já oxigenada para perfundir o rim ainda *in vivo* evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem interrupção do fluxo.

4.4.1.5 Protocolo experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão

em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos e depois congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de sódio, potássio, cloro, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal.

O bloqueio com Tezosentan ($3\mu\text{g/mL}$) e Indometacina ($10\mu\text{g/mL}$) ocorreu no início do experimento (tempo = 0) e após 30 min (tempo = 30) adicionou-se o extrato bruto ou a fração de PLA_2 de *Bunodosoma caissarum*, num tempo total de 120 minutos.

Os grupos controles com Tezosentan ($3\mu\text{g/mL}$) e Indometacina ($10\mu\text{g/mL}$) seguiram o protocolo do extrato bruto e PLA_2 isolados, ou seja, foram adicionados 30 minutos após o início do experimento de 120 min., dos quais os 30 primeiros minutos foram controle interno.

4.4.1.6 Grupos Experimentais

Em cada grupo descrito a seguir foram utilizados 6 animais em jejum de 12 horas.

- **Grupo Controle**
- **Extrato Bruto**
 - Extrato bruto de *B. caissarum* na concentração de $1\mu\text{g/mL}$
 - Extrato bruto de *B. caissarum* na concentração de $3\mu\text{g/mL}$
 - Extrato bruto de *B. caissarum* na concentração de $10\mu\text{g/mL}$
- **Fosfolipase A_2**
 - PLA_2 na concentração de $0,1\mu\text{g/mL}$

- PLA₂ na concentração de 0,3µg/mL

- PLA₂ na concentração de 1µg/mL

- **Tezosentan e Indometacina**

- Tezosentan (TZN) na concentração de 3 µg/mL

- Indometacina (IND) na concentração de 10 µg/mL

- **Bloqueios com TZN e IND**

- Extrato bruto de *B. caissarum* na concentração de 3µg/mL + TZN na concentração de 3 µg/mL

- Extrato bruto de *B. caissarum* na concentração de 3µg/mL + IND na concentração de 10 µg/mL

- PLA₂ na concentração de 0,1µg/mL + IND na concentração de 10 µg/mL

- PLA₂ na concentração de 0,3µg/mL + IND na concentração de 10 µg/mL

- PLA₂ na concentração de 1µg/mL + IND na concentração de 10 µg/mL

- PLA₂ na concentração de 0,3µg/mL + TZN na concentração de 3 µg/mL

- PLA₂ na concentração de 0,1µg/mL + TZN na concentração de 3 µg/mL

4.4.1.7 Análises bioquímicas

Em amostras de urina e perfusato foram realizadas dosagens de sódio e potássio pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443 IL).

As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina do perfusato e urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walson *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foi medida utilizando um osmômetro (Vapor pressure osmometer -modelo 5100c WESCOR). Todos os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de bioquímica do Instituto de Biomedicina – IBIMED - UFC.

4.4.1.8 Cálculos de parâmetros funcionais renais

As seguintes fórmulas foram utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais (Pitts, 1975).

1. FU (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo urinário

FU = (Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo) x 10 (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)

2. PP (mmHg) = Pressão de perfusão. Leitura em manômetro

3. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular

RFG = (DOU in / DOP in x FU) sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato

4. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal (registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)

5. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal

RVR = PP (mmHg) / FPR

6. FNa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio filtrado

FNa⁺ = RFG x PNa⁺ (PNa⁺ = Concentração de sódio no perfusato)

7. ENa⁺ (μEq.g⁻¹.min⁻¹) = Sódio excretado

ENa⁺ = FU x UNa⁺ (UNa⁺ = Concentração de sódio na urina)

8. TNa^+ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Sódio transportado

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

9. $\%TNa^+$ = Percentual de sódio transportado

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$$

10. $Cosm$ ($mL.g^{-1}.min^{-1}$) = Clearance osmótico

$[U_{osm} / P_{osm}] \times FU$ (onde U_{osm} = Osmolaridade urinária e P_{osm} = Osmolaridade do perfusato)

11. FK^+ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Potássio filtrado

$$FK^+ = RFG \times PK^+ \quad (PK^+ = \text{concentração de potássio no perfusato})$$

12. EK^+ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Potássio excretado

$$EK^+ = FU \times UK^+ \quad (UK^+ = \text{Concentração de potássio na urina})$$

13. TK^+ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Potássio transportado

$$TK^+ = FK^+ \times EK^+$$

14. $\%TK^+$ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Percentual de potássio transportado

$$\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$$

15. TCl^- ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Cloro transportado

$$TCl^- = FCl^- \times ECl^-$$

16. $\%TCl^-$ ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) = Percentual de cloro transportado

$$\%TCl^- = TCl^- \times 100 / F TCl^-$$

4.5 PERFUSÃO DE LEITO VASCULAR MESENTÉRICO

A perfusão seguiu a descrição de Mcgregor (1965). Ratos Wistar machos, pesando entre 280-350g foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Depois de aberto o abdomen, a artéria mesentérica superior foi isolada e canulada com uma cânula de polietileno (PE20). O intestino foi separado do leito mesentérico com o ligamento do leito nas extremidades intestinais (duodeno e ceco). O

mesentério foi perfundido em sistema aberto (figura 8) com solução de krebs contendo: 114.0mM de NaCl; 4.96mM de KCl; 1.24mM de KH_2PO_4 ; 0.5mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 24.99mM de NaHCO_3 ; 2.10mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; e 3.60mM de glicose. A solução foi mantida a 37°C e o leito foi perfundido a um fluxo constante (4 mL/min), enquanto a variação da pressão foi mensurada pela média das pressões de perfusão através de um transdutor (Statham P23, Gould, Oxnard, CA, USA) conectado ao sistema. As variações na pressão de perfusão foram continuamente grafadas por um fisiógrafo quatro-canal (Narco BioSystems, Houston, TX, USA). Com isso, analisamos o efeito vascular do extrato bruto de *B. caissarum* ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}.$; $n = 6$), infundido a uma taxa constante de 0.1 mL/min, comparado com a infusão do veículo sozinho.

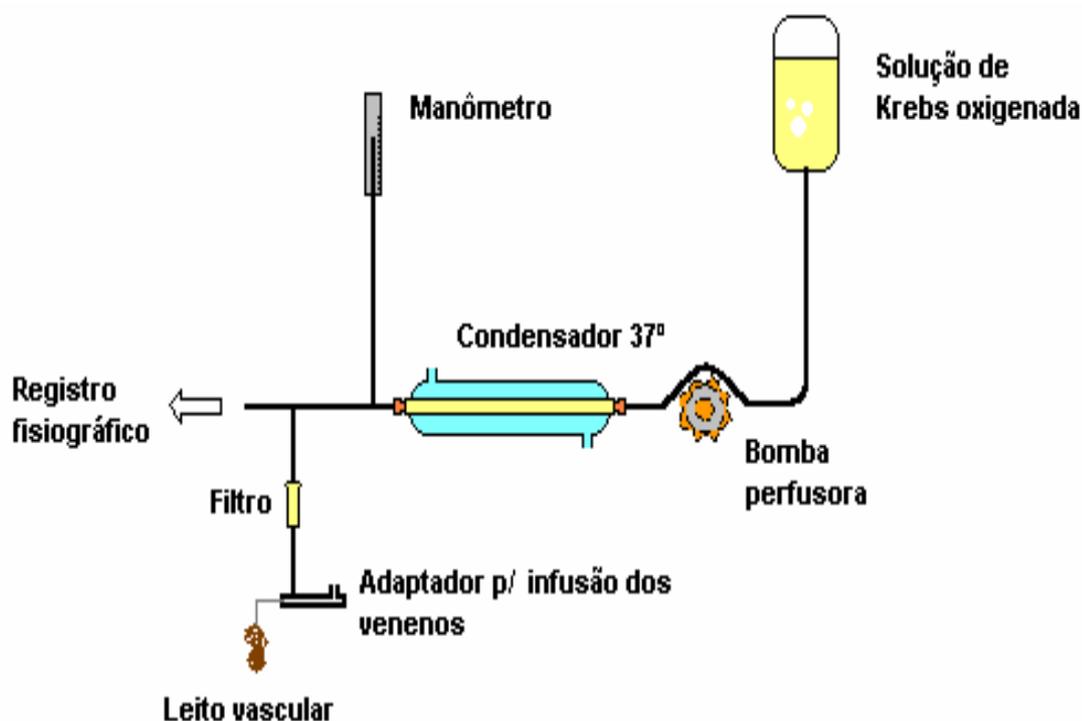


Figura 8. Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico.

4.6 BIOLOGIA MOLECULAR

As seqüências dos RNA mensageiros dos genes dos receptores 1, 2^a, 2B e 3 da adenosina, assim como dos genes da renina, TNF- α e IL1 β em *Rattus norvegicus* foram obtidos no sítio eletrônico do **National Center for Biotechnology Information (NCBI)** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para o desenho dos *primers* foi utilizado o Oligo PerfectTM Designer disponível no sítio eletrônico <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>.

4.6.1 Isolamento de RNA total

O RNA total dos rins controle (perfundidos com solução de e perfundidos com PLA₂) foram isolados utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras em questão foram trituradas e homogeneizadas com 1mL do reagente Trizol para cada 50-100 mg de tecido e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante foi coletado e a este adicionou-se 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol utilizado, realizando assim a fase de separação. Essa mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante coletado. Em seguida iniciou-se a fase de precipitação e lavagem, usando álcool isopropílico e etanol (75%), respectivamente. Cada um destes procedimentos foi seguido por centrifugação da amostra. O procedimento de lavagem foi executado duas vezes. Finalmente, o precipitado foi resuspenso em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) preparada em tampão de Tris-HCl e EDTA (DEPC-TE). A quantidade e qualidade do RNA total isolado foram avaliadas por espectrofotômetro, baseado na razão da absorção a 260 nm e a 280 nm.

4.6.2 Isolamento de RNA e reação de RT-PCR

O RNA dos rins perfundidos com a solução de Krebs Henseleit (controle) ou com a fosfolipase A2 de *B. caissarum*. Foram extraídos seguindo o método descrito pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Resumidamente, fragmentos de 8 rins perfundidos na presença ou ausência (50 a 100 mg) da substância teste foram triturados e homogeneizados no reagente Trizol e centrifugados. Os sobrenadantes foram coletados e adicionados aos mesmos 0,2 mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol. Esta mistura foi centrifugada e após a separação das fases coletamos a fase superior, onde encontramos o RNA. Aos sobrenadantes adicionamos 500 μ L de isopropanol (Merck) para a precipitação do RNA. Seguido ao processo de precipitação, o RNA foi lavado com etanol 75%, centrifugado e, então, solubilizado em água miliQ autoclavada. A quantidade e qualidade do RNA extraído foram analisadas espectrofotometricamente utilizando as leituras em 260 e a razão 260/280, respectivamente. A quantidade de 2 μ g de RNA foi transcrito em DNA complementar (cDNA) a partir do método descrito pelo fabricante do kit “RETROscriptR Reverse transcription for RT-PCR” (Ambion). O cDNA sintetizado foi usado numa reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação do genes acima descritos. A reação de PCR consistiu da seguinte mistura:

- 1x tampão de PCR (10X)
- 1,5 mM de MgCl₂ (50mM)
- 0,2 mM de deoxinucleotídeos (10mM cada)
- 0,2 μ M primer senso (2 μ M)
- 0,2 μ M primer antisenso (2 μ M)
- 1 μ L de cDNA
- 0,025 U/ μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen)
- Água miliQ autoclavada para completar volume final de 10 μ L

A reação seguiu para o termociclador que foi iniciada com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizado 40 ciclos de amplificação com uma temperatura de 95°C por 30 segundos, uma fase de anelamento por 30 segundos e temperaturas de 59°C para os primers dos receptores de adenosina (1, 2^a, 2B e 3), renina e 18S rRNA; e 53°C para os primers de IL-1 β e TNF α . Em seguida foi programado uma extensão dos produtos por 1 minutos a 72°C. Ao término destes 40 ciclos foi executado uma extensão final por 10 minutos à 72°C.

4.6.3 *Primers Utilizados*

Quadro 1. Sequência de bases nitrogenadas presentes nos *primers* utilizados.

PRIMER	SEQUÊNCIA
RMRenin-F	AGG ATG CCT CTC TGG GCA CT
RMRenin-R	CGA GGG CAT TTT CTT GAG CA
RAdenosine1R-F	CTG CCC TGT CCT CAT CCT CA
RAdenosine1R-R	TTC CAG CCA AAC ATG GGT GT
RAdenosine2AR-F	GGT CCT CAC GCA GAG TTC CA
RAdenosine2AR-R	CAG TTG TTC CAG CCC AGC AT
RAdenosine2BR-F	TGC TGG TGC TCA CAC AGA GC
RAdenosine2BR-R	TCA TCG CTG TCC TCT GGG TC
RAdenosine3R-F	GAA CCG CAC TCT GAG GAC CA
RAdenosine3R-R	TCA TGT CCT TGC TGG CCA TT
RTNF alfa RM-S	CAG ACC CTC ACA CTC AGA TC
RTNF alfa RM-S	TGT CCC TTG AAG AGA ACC TG
RIL-1 beta RM-S	GCT CTC CAC CTC AAT GGA CAG
RIL-1 beta RM-S	ACT CTC CAG CTC CAG GGT
18s rRNA RM-S	ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG
18s rRNA RM-S	GCT GGA ATT ACC GCG GCT G

4.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Ao término da reação de PCR, o DNA amplificado, relacionado à especificidade dos *primers* utilizados em cada estudo, foi analisado através da técnica de eletroforese em gel de agarose. A agarose é um polissacarídeo que, quando suspenso em uma solução (tampão de corrida) contendo Tris-acetato EDTA (TBA) e aquecido, se dissolve completamente, solidificando-se vagarosamente conforme a queda da temperatura. A técnica de eletroforese em gel de agarose se vale do princípio no qual a carga global de uma fita de DNA é negativa. Portanto, uma solução que possua íons livres (eletrolítica) e que tenha moléculas de DNA em suspensão pode ser purificada aplicando-se uma dada voltagem. Ao final do processo as cadeias de DNA estarão próximas ao catodo (positivo), atraente de moléculas de carga negativa. No entanto, o foco da técnica é separar os fragmentos por tamanho, uma vez que a reação de PCR gera fragmentos de mesma extensão. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de marcadores moleculares de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. A amostra de DNA amplificado da reação de PCR foi preparada para ser aplicada nos poços do gel de agarose com a adição de um tampão de amostra que conterá geralmente os corantes azul de bromofenol e xileno-cianol e glicose, para aumentar a viscosidade do DNA amplificado e impedir que o mesmo flutue no tampão de corrida. Ao término das aplicações das amostras nos poços, foi aplicada uma voltagem de 200 volts entre as extremidades do gel e uma corrente de 400 mA. A concentração do gel de agarose dependerá do tamanho dos fragmentos a serem visualizados. Quanto menor o tamanho dos produtos de PCR maior concentração deverá ter o gel, variando em torno de 0,5 a 2,0%.

A visualização dos produtos no gel após a corrida ocorreu pela reação de ligação do DNA com Brometo de Etídio (EtBr). Este composto tem a capacidade de inserir-se nas fendas da cadeia de DNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta. Ao géis foram imergidos em uma solução contendo 10µg/mL de EtBr e descansaram por alguns minutos.

Os géis foram fotodocumentados pelo equipamento ChemiDoc XS (Bio-Rad) e a intensidade das bandas dos genes foi analisada através do método da quantificação relativa utilizando o gene de referência da cadeia 18S do RNA ribossômico.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão dos seis experimentos em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANCOVA) Bonferroni com significância de 5%.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A eletroforese 2D do extrato bruto de *B. caissarum* encontra-se representada na figura 9 e a representação dos pesos moleculares dos componentes deste extrato encontram-se representados na figura 10b.

A figura 10 apresenta a distribuição em HPLC dos picos de PLA₂ (Figura 10a), assim como a estimativa da massa molecular e pureza das proteínas fracionadas (Figura 10b) e sequenciamento da PLA₂ (Figura 10c).

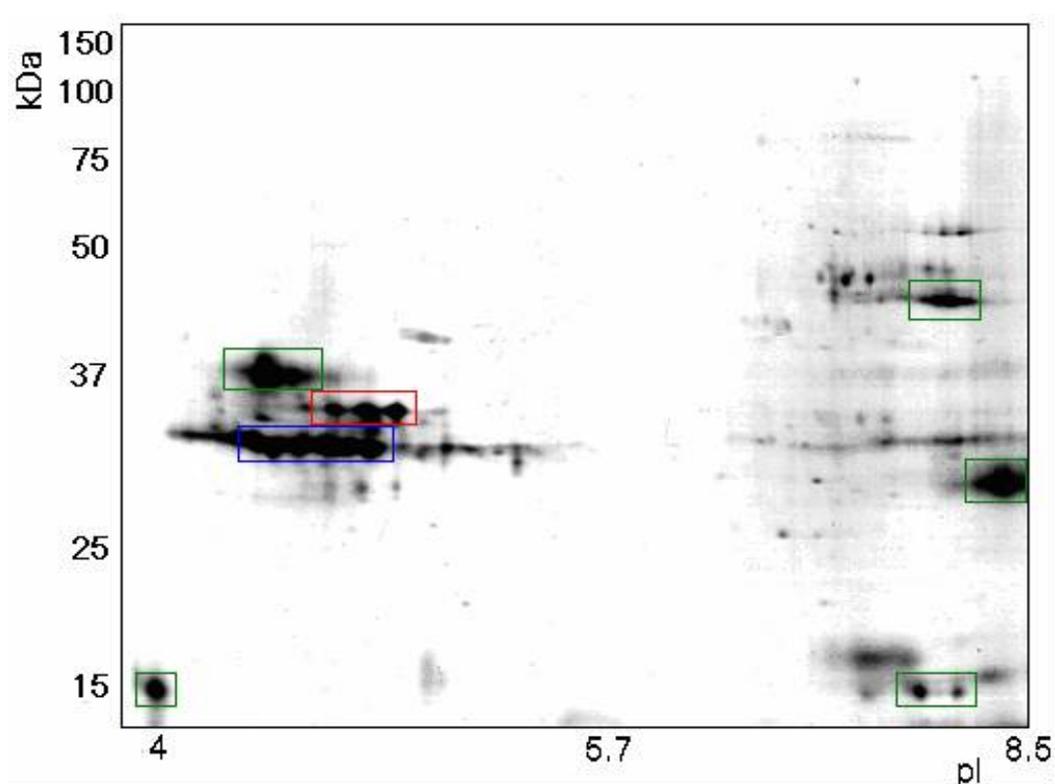


Figura 9. Eletroforese 2D do extrato bruto da anêmona marinha *B. caissarum*.

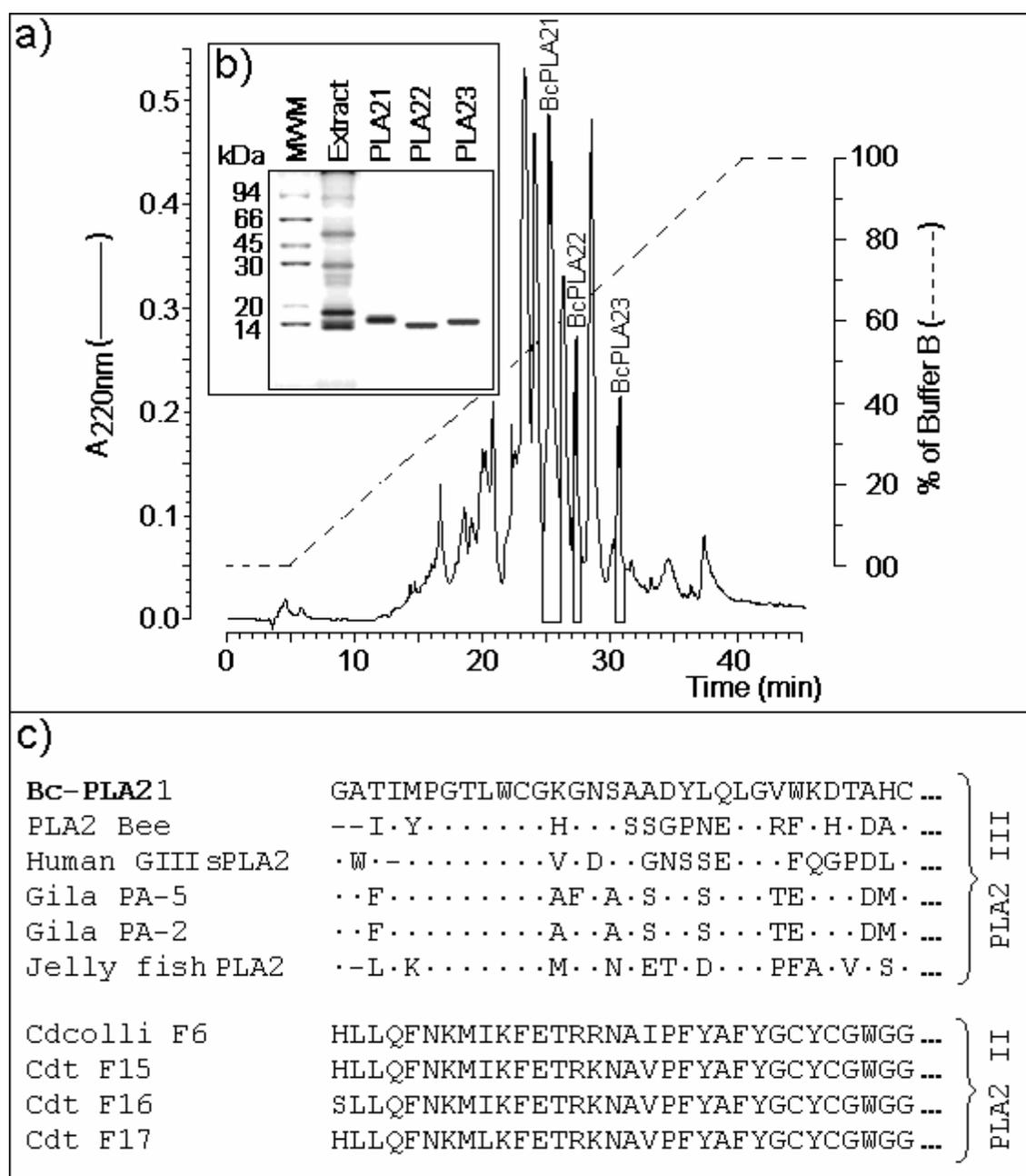


Figura 10. Padrões de Pureza, Massa molecular e sequenciamento da PLA₂ da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum*. (a) HPLC em fase reversa. (b) Eletroforese em gel de poliacrilamida. (c) Sequenciamento N-terminal da PLA₂ de *B. Caissarum*, mostrando alta homologia sequencial com PLA₂ da Classe III de abelhas e Jelly Fish, incluindo a presença dos resíduos de Cys (Cys 11 e Cys 32).

5.1 Efeitos Biológicos do Extrato de *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado

Foram testadas três diferentes concentrações do extrato bruto de *B. caissarum* na perfusão de rim isolado, 1 µg/mL, 3 µg/mL e 10 µg/mL. A concentração maior (10 µg/mL) causou aumento da pressão de perfusão aos 60 minutos, com queda discreta aos 90 e 120 minutos (Figura 11). Na resistência vascular renal esta concentração provocou elevação somente aos 60 minutos (Figura 13). O fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular elevaram-se nos tempos de 90 e 120 minutos (Figura 14 e 15).

A concentração intermediária (3 µg/mL) alterou pressão de perfusão e resistência vascular renal aos 60, 90 e 120 minutos (Figuras 11 e 13), com elevação do fluxo urinário aos 90 e 120 minutos (figura 15) e do ritmo de filtração glomerular aos 120 minutos (figura 15).

A menor concentração testada (1 µg/mL) elevou pressão de perfusão e resistência vascular renal somente aos 120 minutos (figuras 11 e 13), apresentando diminuição no ritmo de filtração glomerular aos 120 minutos (figura 15), sem afetar o fluxo urinário (figura 14).

A rápida ação do extrato bruto de *B. caissarum* foi observada principalmente pela presença de um pico de pressão de perfusão 10 minutos após adição do extrato (figura 12), observado com maior intensidade para a maior concentração (10 µg/mL), com queda subsequente. A concentração intermediária (3 µg/mL) foi a concentração que prolongou com maior eficácia o fenômeno de alteração da pressão de perfusão, com uma pequena queda deste parâmetro após o pico e nova elevação pressórica aos 90 minutos, mantendo esta tendência até o final dos experimentos. O pico pressórico revelou elevação de pressão de perfusão em 23,3% para a menor concentração (1 µg/mL), 29,7% para a concentração intermediária (3 µg/mL) e 41% para a maior concentração (10 µg/mL), com relação ao controle externo aos 40 minutos (figura 12).

Não houve alterações nos transportes proximal e tubular de sódio em nenhuma das concentrações estudadas, exceto para o transporte tubular de sódio quando comparado com controle externo nos tempos de 90 e 120 minutos para a concentração intermediária (3 µg/mL) e aos 90 minutos para a concentração menor (1µg/mL).

Semelhante ao sódio, não foram verificadas alterações nos transportes proximal e tubular de potássio, exceto no transporte tubular de potássio quando comparado ao controle externo nos tempos de 60, 90 e 120 para a concentração maior (10 µg/mL) e aos 120 minutos para a concentração menor (1 µg/mL).

Os transportes tubular e proximal de cloreto foram alterados pela concentração intermediária (3µg/mL) aos 90 e 120 minutos. Quando comparadas ao controle externo, as concentrações de 3µg/mL (aos 90 e 120 minutos) e a concentração de 1 µg/mL (aos 120 minutos) alteraram o transporte tubular de cloreto – Figura 16. O transporte proximal de cloreto foi também alterado pelas concentrações de 10 µg/mL (aos 60 minutos) e 1 µg/mL (aos 60 e 120 minutos) – Figura 17.

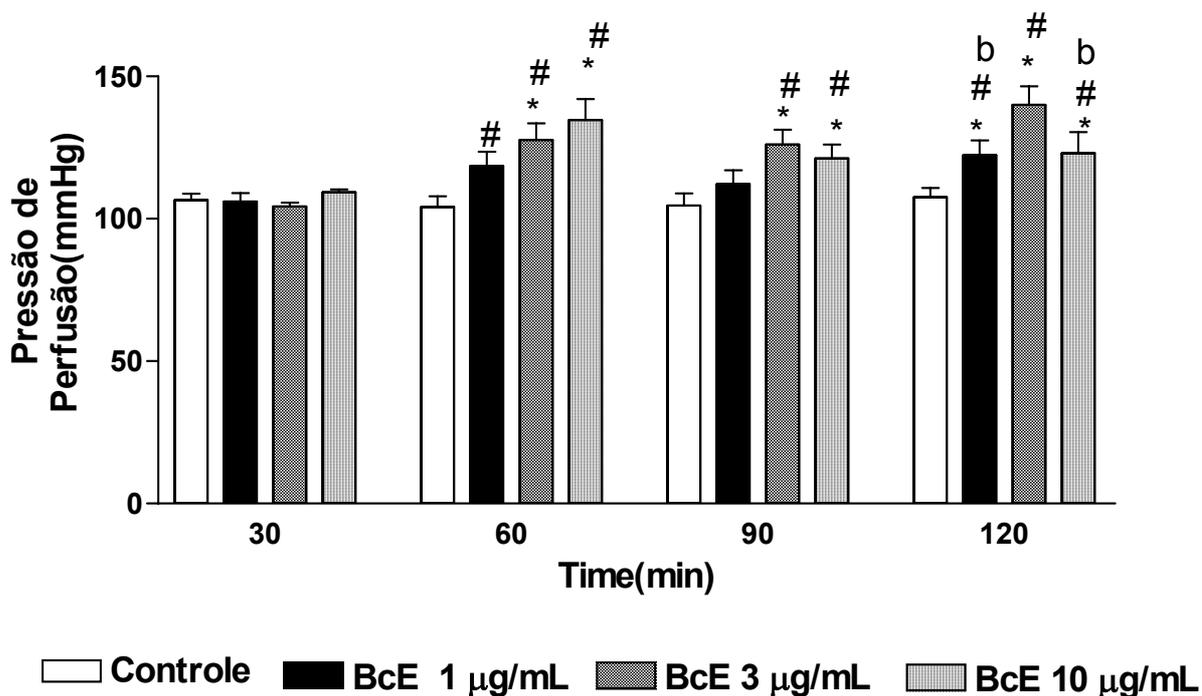
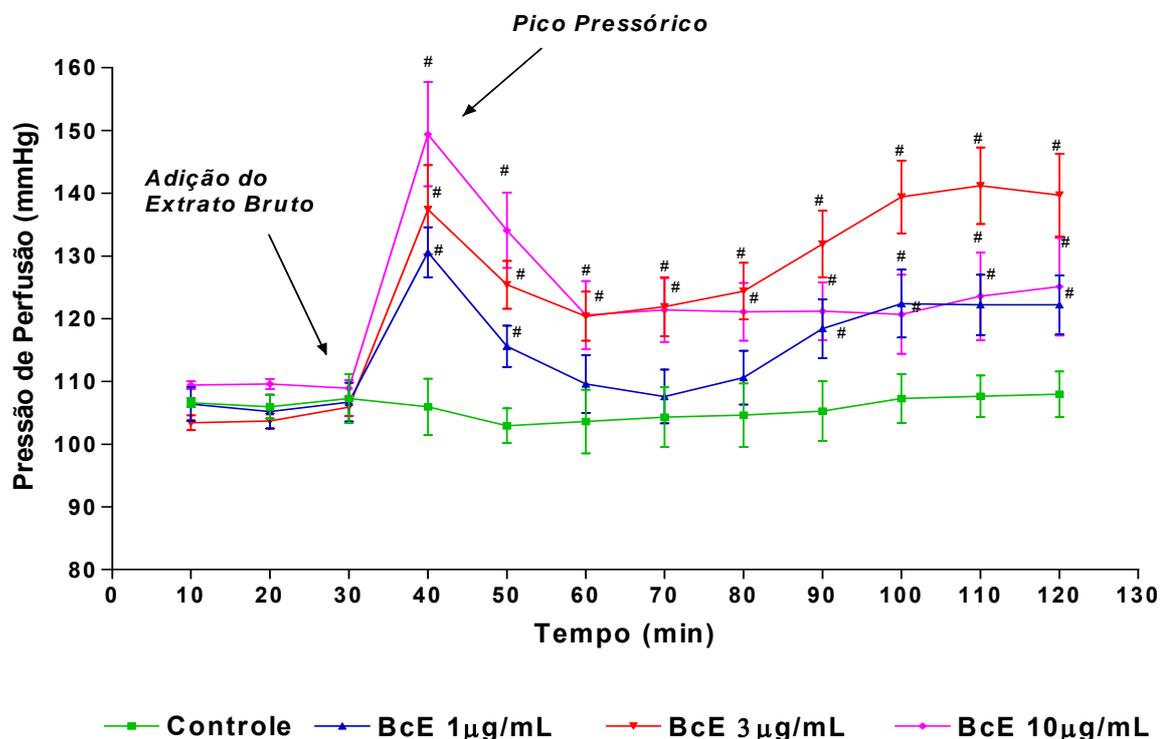


Figura 11. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a pressão de perfusão em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60,90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^bComparação com BcE 3µg/mL no tempo 120 minutos. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.



Tempo (min)	Controle	BcE 1µg/mL	BcE 3µg/mL	BcE 10µg/mL
10	106,62 ± 0,74	106,4 ± 2,7	103,4 ± 1,2	109,4 ± 0,6
20	105,95 ± 1,89	105,2 ± 2,7	103,7 ± 1,2	109,6 ± 0,8
30	107,28 ± 3,91	106,7 ± 3,1	105,9 ± 1,4	108,9 ± 1,3
40	105,95 ± 4,49	130,6 ± 4,0[#]	137,4 ± 7,1[#]	149,4 ± 8,3[#]
50	102,95 ± 2,76	115,6 ± 3,3 [#]	125,4 ± 3,8 [#]	134,1 ± 6,0 [#]
60	103,62 ± 5,07	109,6 ± 4,6	120,4 ± 3,9 [#]	120,6 ± 5,4 [#]
70	104,28 ± 4,78	107,6 ± 4,3	121,9 ± 4,7 [#]	121,4 ± 5,1 [#]
80	104,62 ± 5,07	110,6 ± 4,3	124,4 ± 4,5 [#]	121,1 ± 4,6 [#]
90	105,28 ± 4,78	118,4 ± 4,7 [#]	131,9 ± 5,3 [#]	121,2 ± 4,6 [#]
100	107,28 ± 3,91	122,4 ± 5,4 [#]	139,4 ± 5,8 [#]	120,7 ± 6,3 [#]
110	107,62 ± 3,34	122,2 ± 4,8 [#]	141,2 ± 6,1 [#]	123,6 ± 7,0 [#]
120	107,95 ± 3,63	122,2 ± 4,7 [#]	139,7 ± 6,6 [#]	125,1 ± 7,8 [#]

Figura 12. Pico de pressão de perfusão provocado pelo extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

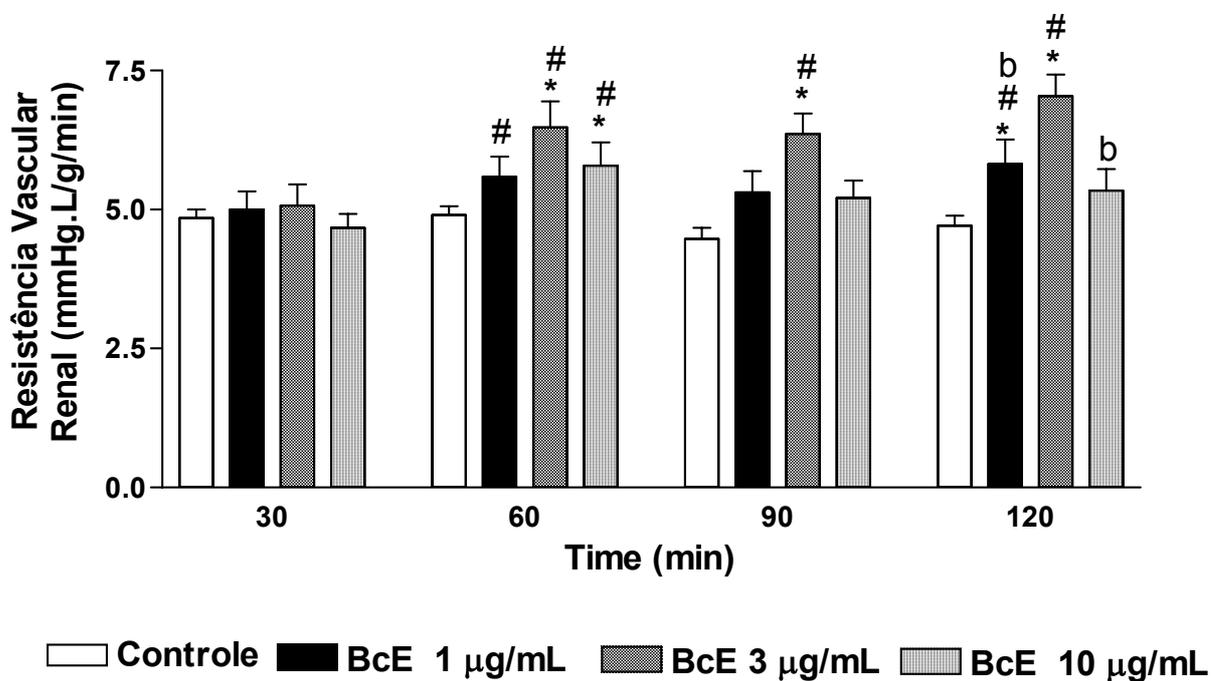


Figura 13. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a resistência vascular renal em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^bComparação com BcE 3µg/mL no tempo 120 minutos. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

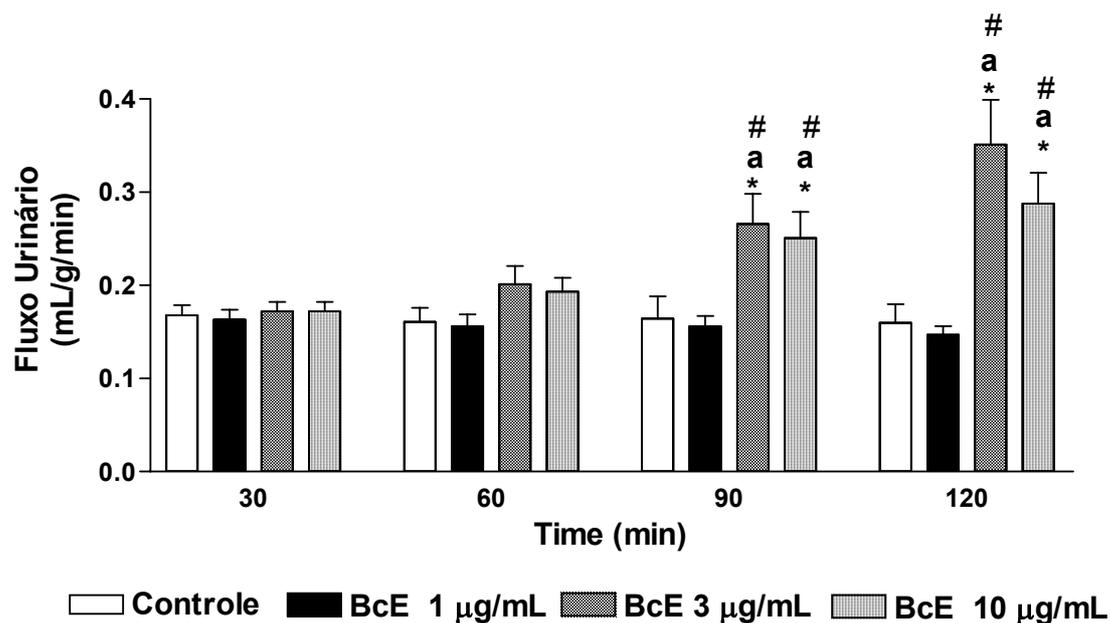


Figura 14. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o fluxo urinário em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 1µg/mL nos tempos de 90 e 120 minutos. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

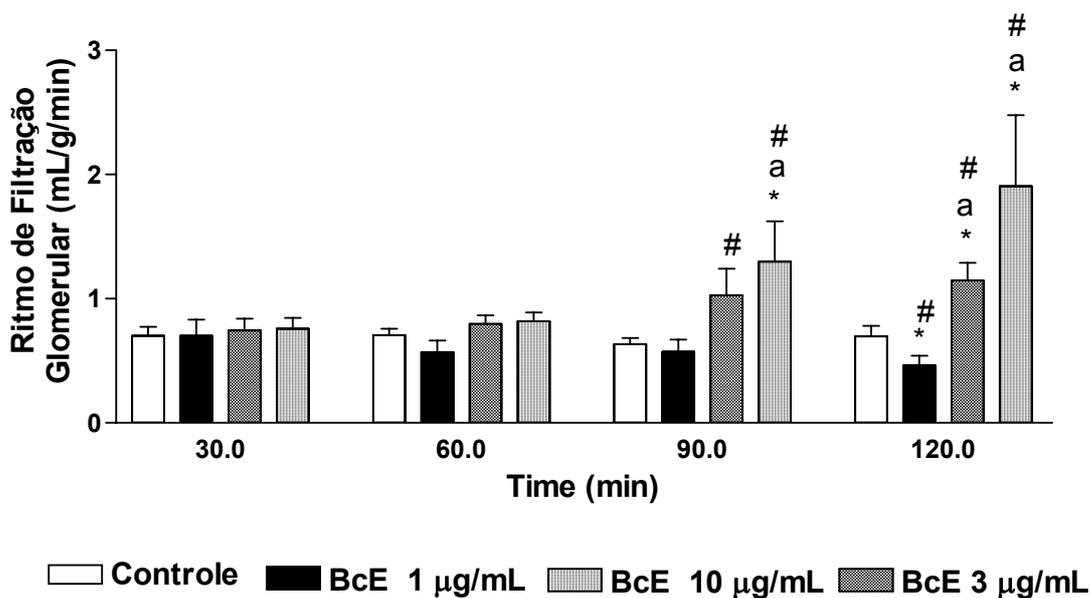


Figura 15. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o ritmo de filtração glomerular em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 1µg/mL nos tempos de 90 e 120 minutos. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

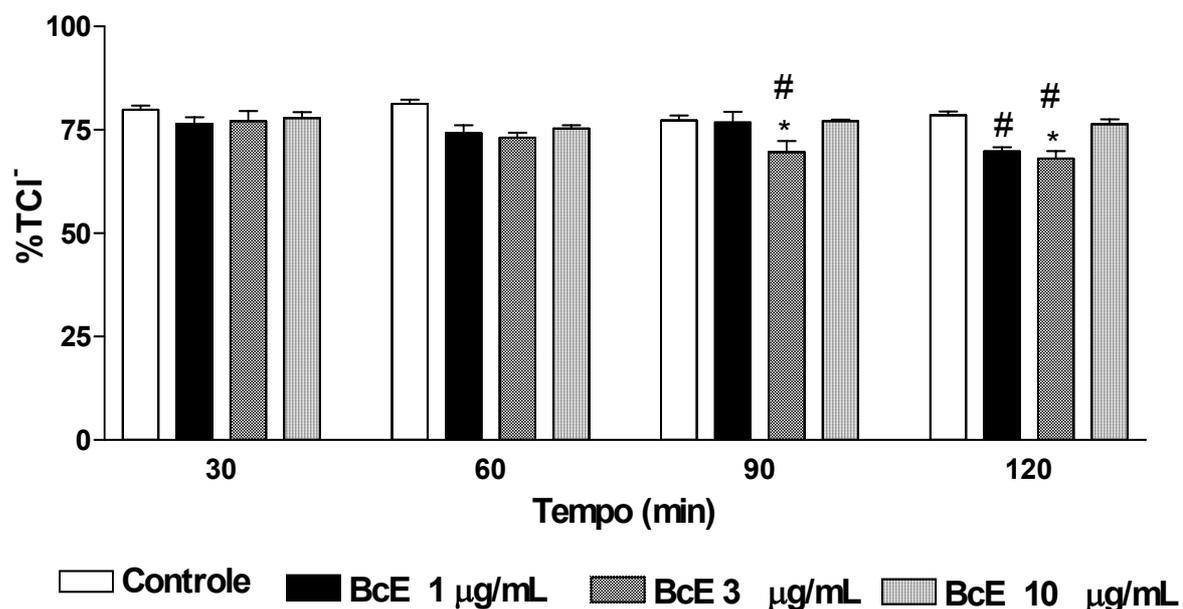


Figura 16. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

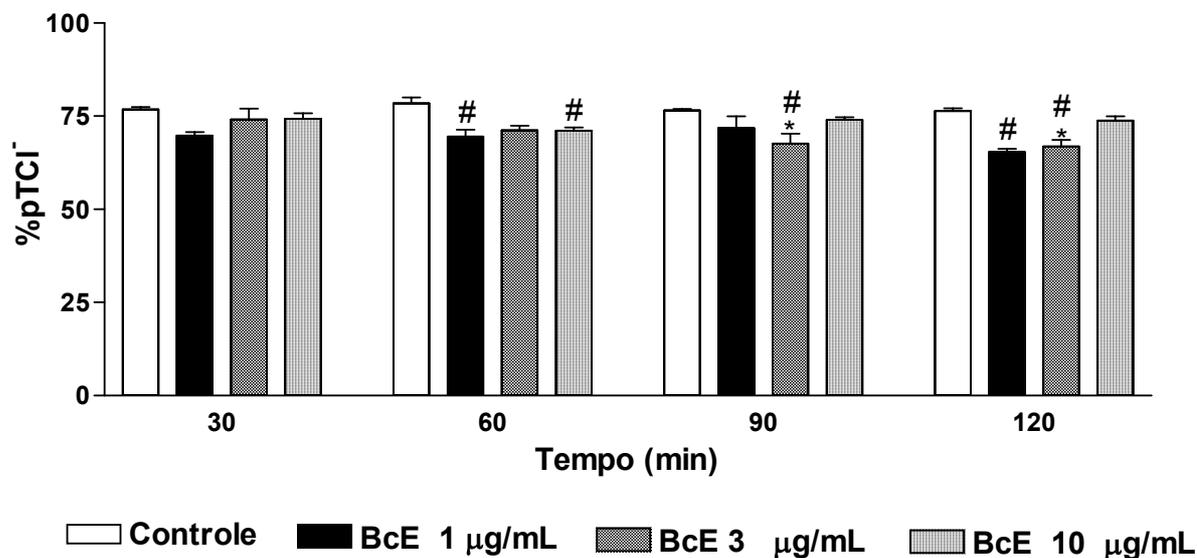


Figura 17. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte proximal de cloreto (%pTCl⁻) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1μg/mL, 3μg/mL e 10μg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

5.1.1 Excreção renal dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto pela ação do extrato bruto de *B. caissarum*

A excreção de sódio não foi alterada pela concentração menor (1µg/mL). Todavia a concentração intermediária (3µg/mL) promoveu alteração na excreção de sódio já aos 60 minutos, sendo mais evidente aos 90 e 120 minutos (Figura 18). A maior concentração estudada (10µg/mL) também aumentou a excreção de sódio aos 90 e 120 minutos, de forma menos expressiva do que a concentração de 3µg/mL.

Foi observado que a concentração intermediária foi a concentração que exerceu principal ação no transporte e excreção de sódio. Observou-se que esta concentração aumentou a excreção de sódio sem diminuir o transporte tubular proximal deste eletrólito. O efeito biológico observado provavelmente sofreu influência da diminuição do transporte tubular distal do sódio filtrado (Tabela 1).

A excreção de potássio (figura 19) foi discretamente diminuída pela concentração menor (1µg/mL) aos 90 minutos. A concentração intermediária (3µg/mL) promoveu elevação da excreção de potássio já aos 60 minutos e esta elevação permaneceu significativa nos tempos 90 e 120 minutos. A concentração maior (10µg/mL) também elevou de maneira significativa a excreção de potássio aos 60, 90 e 120 minutos, todavia esta concentração não elevou a excreção de potássio aos 120 minutos com a mesma eficiência da concentração intermediária.

Semelhante ao que foi observado para a excreção de sódio, ocorreu também com o potássio, em que a concentração intermediária (3µg/mL) foi a principal concentração a promover a excreção de potássio sem alterar o transporte tubular proximal deste íon. Conforme a tabela 2, pode-se observar que a diminuição no transporte tubular distal do potássio filtrado pode ser um fator importante na mediação deste efeito.

A concentração menor (1µg/mL) não provocou alteração no transporte de cloreto (figura 20), que foi alterado pela concentração intermediária (3µg/mL) e pela concentração maior (10µg/mL) nos tempos de 90 e 120 minutos. Semelhante ao que aconteceu com os transportes de sódio e potássio observou-se com o cloreto na

concentração de (3 μ g/mL), em que houve redução significativa do transporte distal do cloreto filtrado (Tabela 3).

A concentração menor (1 μ g/mL) não se mostrou importante com relação a excreção de eletrólitos, pois não apresentou alterações significativas com relação a excreção destes íons, assim como não alterou de forma significativa os transportes tubular proximal e distal dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto, não interferindo com a reabsorção dos mesmos.

A concentração maior (10 μ g/mL) apresentou alterações importantes no transporte eletrolítico, com elevação da excreção de sódio, potássio e cloreto. Todavia, da porção filtrada de cada um destes eletrólitos, os transportes tubulares proximal e distal não apresentaram alterações significativas.

As alterações no transporte tubular eletrolítico foi mais evidente na concentração intermediária (3 μ g/mL), que apresentou discreta alteração no transporte tubular proximal de cloreto e alterações significativas das excreções de sódio, potássio e cloreto, efeito este que parece ocorrer paralelamente a diminuição da reabsorção destes eletrólitos em nível distal, como mostrado nas tabelas 1,2 e 3.

A osmolaridade urinária aumentou no tempo de 120 minutos nas três concentrações estudadas, sendo que para a concentração maior (10 μ g/mL) este aumento já ocorreu aos 60 minutos (Figura 21). Com relação ao controle externo, o concentração intermediária (3 μ g/mL) apresentou elevação significativa mais precocemente (60 minutos) entre as três concentrações estudadas.

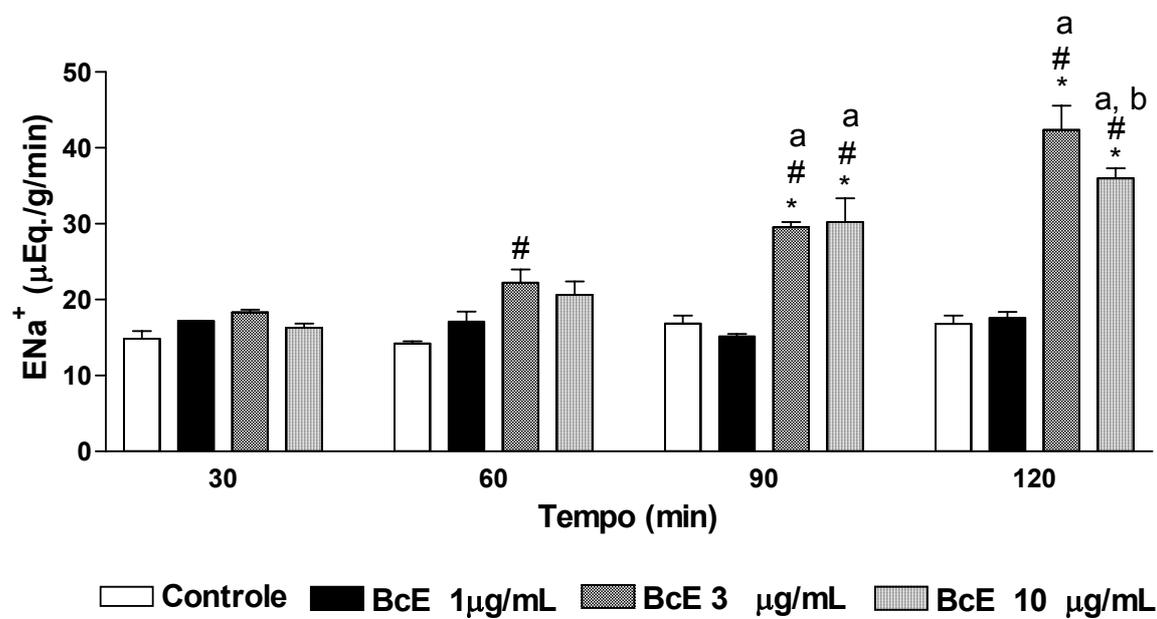


Figura 18. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de sódio (ENa^+) em rim isolado de rato, nas concentrações de 1 µg/mL, 3 µg/mL e 10 µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^bComparação com BcE 3 µg/mL no tempo de 120 minutos. ^aComparação com BcE 1 µg/mL nos tempos de 90 e 120 minutos. [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

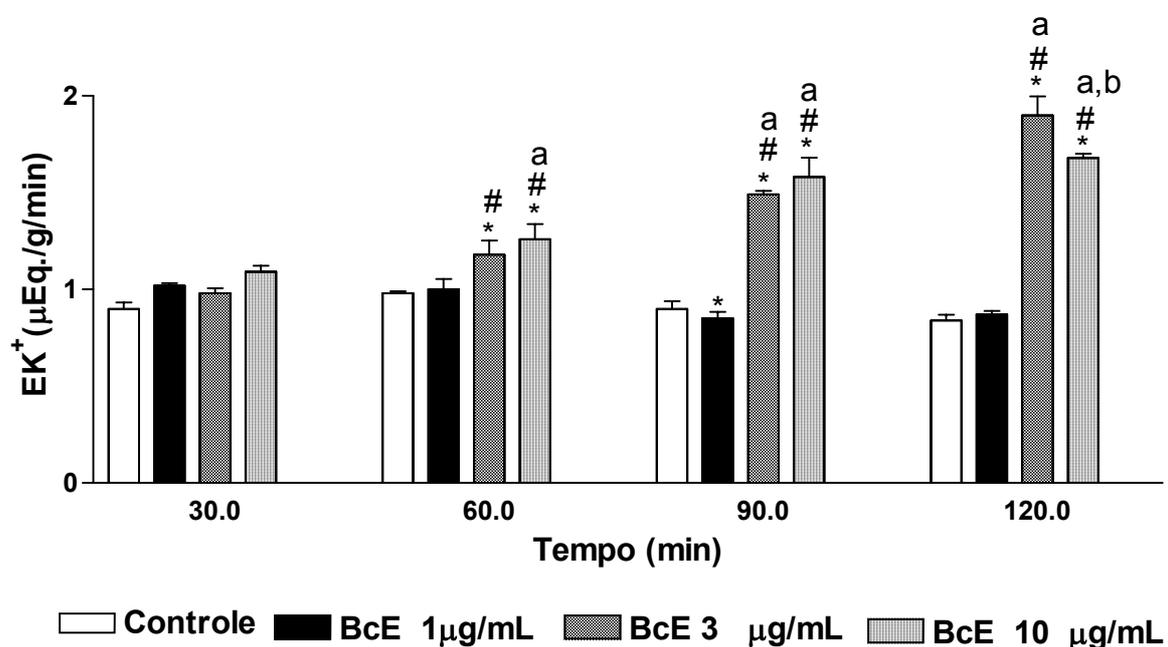


Figura 19. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de potássio (EK^+) em rim isolado de rato, nas concentrações de $1\mu\text{g/mL}$, $3\mu\text{g/mL}$ e $10\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^bComparação com BcE $3\mu\text{g/mL}$ no tempo de 120 minutos. ^aComparação com BcE $1\mu\text{g/mL}$ nos tempos de 60, 90 e 120 minutos. [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

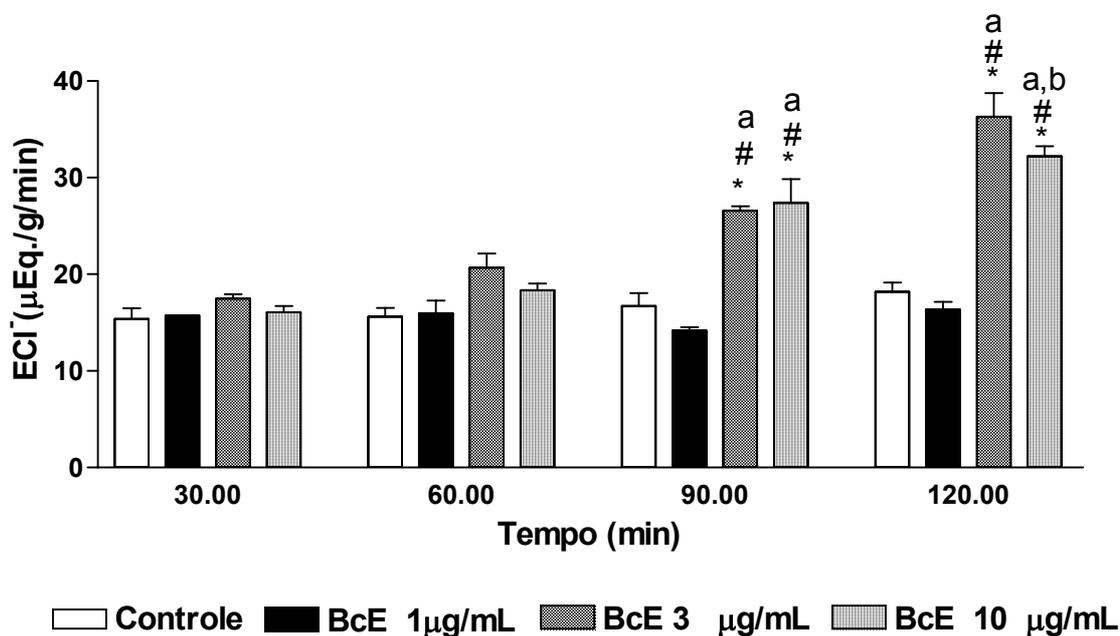


Figura 20. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de cloreto (ECI^-) em rim isolado de rato, nas concentrações de $1\mu\text{g/mL}$, $3\mu\text{g/mL}$ e $10\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^bComparação com BcE $3\mu\text{g/mL}$ no tempo de 120 minutos. ^aComparação com BcE $1\mu\text{g/mL}$ nos tempos de 90 e 120 minutos. [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

Tabela 1

Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	BcE 1µg/mL (%)	BcE 3µg/mL (%)	BcE 10µg/mL (%)
30	5,34 ± 0,31	5,74 ± 0,56	4,10 ± 0,94	4,96 ± 0,55
60	4,54 ± 0,16	5,76 ± 0,34 ^b	2,51 ± 0,23	5,62 ± 0,34 ^b
90	4,96 ± 0,20	6,53 ± 1,09 ^b	2,79 ± 0,08	4,55 ± 0,47
120	4,80 ± 0,12	6,01 ± 0,87 ^b	1,56 ± 0,29* [#]	4,12 ± 0,23 ^b

%dTNa⁺ = (dTNa⁺ X 100) / TNa⁺, onde: TNa⁺ = Sódio tubular transportado (Sódio filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^bComparação com BcE 3µg/mL [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

Tabela 2

Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	BcE 1µg/mL (%)	BcE 3µg/mL (%)	BcE 10µg/mL (%)
30	6,24 ± 0,36	6,19 ± 0,25	5,67 ± 1,33	6,86 ± 0,83
60	6,07 ± 0,41	4,62 ± 0,42	3,20 ± 0,26	8,23 ± 0,94 ^{b,a}
90	5,70 ± 0,92	4,56 ± 0,68	3,47 ± 0,33	6,59 ± 0,89
120	6,07 ± 0,63	5,63 ± 0,30 ^b	1,63 ± 0,27* [#]	5,67 ± 0,41 ^b

%dTK⁺ = (dTK⁺ X 100) / TK⁺, onde: TK⁺ = Potássio tubular transportado (Potássio filtrado e não excretado). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^aComparação com BcE 1µg/mL no mesmo tempo. ^bComparação com

BcE 3µg/mL [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

Tabela 3

Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCl⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	BcE 1µg/mL (%)	BcE 3µg/mL (%)	BcE 10µg/mL (%)
30	4,00 ± 0,23	6,12 ± 0,60	4,10 ± 0,82	4,27 ± 0,27
60	3,40 ± 0,24	6,34 ± 0,39 ^{b#}	2,65 ± 0,25	3,62 ± 0,44 ^a
90	3,69 ± 0,15	7,24 ± 1,34 ^{b#}	2,98 ± 0,10	4,11 ± 0,32 ^a
120	3,48 ± 0,09	6,55 ± 0,96 ^{b#}	1,61 ± 0,31 ^{*#}	3,57 ± 0,31 ^a

%dTCl⁻ = (dTCl⁻ X 100) / TCl⁻, onde: TCl⁻ = Cloreto tubular transportado (Cloreto filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. ^{*}Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^aComparação com BcE 1µg/mL no mesmo tempo. ^bComparação com BcE 3µg/mL [#]Comparação com controle externo K mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

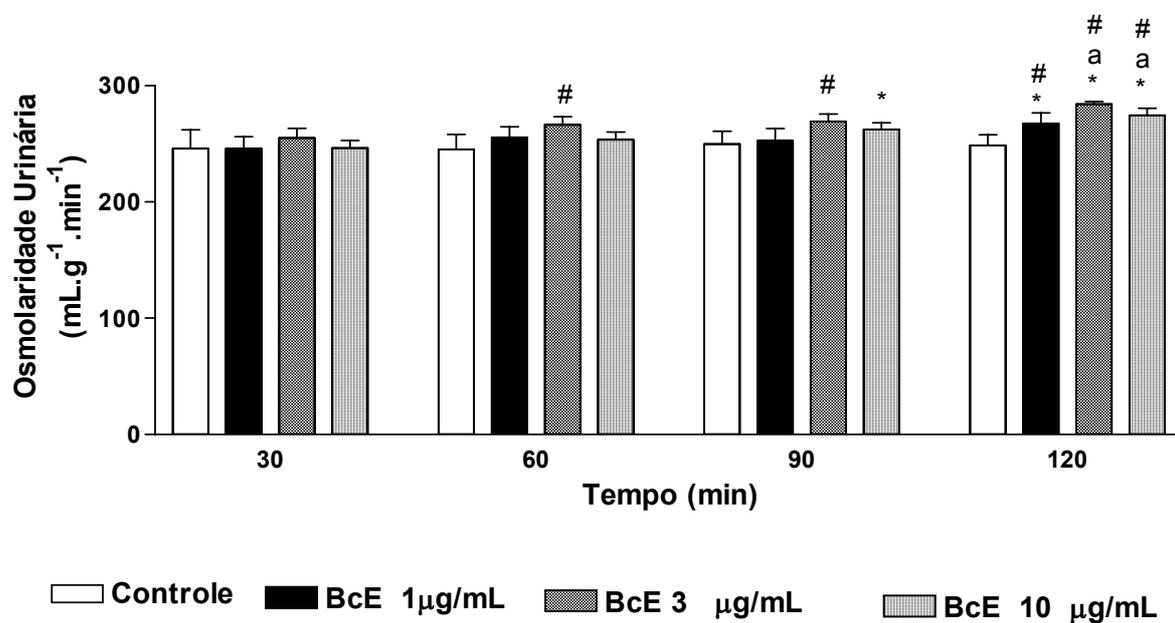


Figura 21. Efeitos do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a osmolaridade urinária em rim isolado de rato, nas concentrações de 1µg/mL, 3µg/mL e 10µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). ^aComparação com BcE 1µg/mL no tempo de 120 minutos. [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

5.2 Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* em leito vascular mesentérico

No sistema de leito vascular mesentérico foi utilizada a metodologia de fluxo constante e avaliação da variação da pressão. Primeiramente foi utilizado um protocolo no qual após estabilização, os primeiros 20 minutos foram considerados controle, sem infusão de nenhuma substância. Em seguida foi infundido o extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL/min) seguido da fenilefrina (100µg/mL/min) e da fenilefrina (100µg/mL/min) + extrato bruto da *B. caissarum* (3µg/mL/min). Neste protocolo não foram observadas alterações na pressão com a infusão do extrato bruto, que respondeu com contração na presença da fenilefrina. Todavia ao se infundir fenilefrina + extrato bruto de *B. caissarum* observou-se uma queda discreta, mas significativa da pressão quando comparada a fenilefrina isoladamente, o que nos levou a investigar se o extrato bruto de *B. caissarum* exerceria uma função hipotensora em leito pré-contraído (Dados não mostrados).

Para esclarecer essa questão foram realizados novos experimentos, cujo protocolo obedeceu a seguinte seqüência: basal, BcE (3µg/mL/min), fenilefrina (100µg/mL/min)+ extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL/min) e por ultimo fenilefrina (100µg/mL/min). Este protocolo sugeriu que a alteração de pressão observada ao se realizar a última infusão parece refletir uma perda gradual da viabilidade da preparação de leito vascular mesentérico e não uma ação do extrato bruto de *B. caissarum* em leito pré-contraído (Dados não mostrados)..

Estes achados sugerem que o extrato bruto de *B. caissarum* não apresenta ação em vasos de resistência e que, sua ação renal, parece ocorrer indiretamente, associada a liberação de outros mediadores.

5.3 Estudo da participação da cicloxigenase (COX) e endotelina nos efeitos renais do extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado

Com o objetivo de investigar a participação da enzima cicloxigenase e do mediador endotelina na ação renal do extrato bruto de *B. caissarum* realizou-se o bloqueio deste extrato com indometacina (IND – inibidor não-seletivo de cicloxigenase) e tezosentan (TZN –antagonista do receptor de endotelina).

Após avaliação dos efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* em três diferentes concentrações, consideramos a concentração intermediária (3µg/mL) satisfatória para a continuidade do estudo em rim isolado, pois a mesma apresentou importantes alterações renais, algumas bem mais expressivas do que as demais concentrações.

Em seus respectivos grupos experimentais, TZN e IND foram adicionados aos 30 minutos de experimento para realização de grupos controle. Na avaliação do bloqueio, TZN e IND foram adicionados no início do experimento (tempo=0) e BcE foi adicionado aos 30 minutos, de um experimento com duração de 120 minutos.

5.3.1 Estudo do bloqueio de BcE com Indometacina

Para este estudo a indometacina foi utilizada na concentração de 10µg/mL. Esta concentração de IND revelou alterações na osmolaridade urinária nos tempos de 90 ($_{30}U_{osm} = 240,73 \pm 8,59$ vs. $_{90}U_{osm} = 257,12 \pm 7,99^*$ mL/g/min, * $p < 0,05$) e 120 min ($_{30}U_{osm} = 240,73 \pm 8,59$ vs. $_{90}U_{osm} = 260,95 \pm 7,73^*$ mL/g/min, * $p < 0,05$), não interferindo nos demais parâmetros avaliados.

A indometacina reduziu de forma significativa a elevação da pressão de perfusão, reduzindo o pico pressórico causado por BcE, nos tempos de 60,90 e 120 minutos (figura 22), sendo observado comportamento semelhante na resistência vascular renal (figura 23).

Com relação ao fluxo urinário reduziu significativamente o efeito de BcE aos 90 minutos e bloqueou completamente aos 120 minutos (figura 24). No ritmo de filtração glomerular ocorreu diminuição significativa do efeito de BcE também aos 90 e 120 minutos (figura 25).

A indometacina restabeleceu o percentual de sódio transportado, que foi diminuído pela ação de BcE, sem interferir de forma significativa na ação de BcE sobre os transportes tubulares totais de potássio e cloreto, como também nos transportes proximais de sódio e potássio (figuras 26 –28). A indometacina bloqueou a ação de BcE na diminuição do transporte tubular proximal de cloretos (figura 29).

Como já foi demonstrado anteriormente neste trabalho, BcE aumentou a excreção de sódio, potássio e cloreto. Todas as alterações na excreção de eletrólitos observadas com BcE foram bloqueadas pela indometacina (figuras 30-32), assim como as alterações nos percentuais de transporte tubular distal (%dT) com relação ao transporte tubular absoluto (tabelas 4-6).

A indometacina isoladamente alterou a osmolaridade urinária, assim como BcE. Todavia o grupo em que indometacina foi adicionada 30 minutos antes de BcE revelou redução significativa das alterações na osmolaridade urinária indizadas pelo extrato bruto e indometacina, isoladamente (figura 33).

5.3.2 Estudo do bloqueio de BcE com Tezosentan

O tezosentan, bloqueador dos receptores de endotelina, foi utilizado para verificar a participação da endotelina nos efeitos renais de BcE. A concentração estabelecida foi de 3 µg/mL, adicionados 30 minutos antes da adição do extrato bruto. O TZN na concentração estudada não promoveu alterações nos parâmetros estudados.

Com relação a pressão de perfusão TZN bloqueou o efeito de BcE aos 60 e 90 minutos, promovendo também redução significativa aos 120 minutos (figura 22), com comportamento semelhante na resistência vascular renal (figura 23).

As alterações promovidas por BcE no fluxo urinário foram bloqueadas pelo TZN aos 90 minutos, com diminuição significativa também aos 120 minutos (figura 24). Tezosentan não bloqueou a ação de BcE sobre o ritmo de filtração glomerular (figura 25).

O TZN diminuiu significativamente a ação de BcE sobre o transporte tubular de sódio aos 90 minutos (Dados não mostrados) e cloreto aos 90 e 120 minutos (figura 26). Assim como BcE isoladamente, não foram observadas alterações do extrato bruto na presença de TZN no transporte tubular de potássio (figura 27) e proximal de sódio (Dados não mostrados) e potássio (figura 28). TZN bloqueou a ação de BcE sobre o transporte tubular proximal de cloreto (figura 29).

As excreções de sódio, potássio e cloreto foram bloqueadas por TZN aos 90 minutos e reduzidas significativamente aos 120 minutos (figuras 30-32). As alterações no percentual de transporte distal (%dT) destes íons não foram afetadas pelo TZN (tabelas 4-6), assim como a osmolaridade urinária (figura 33).

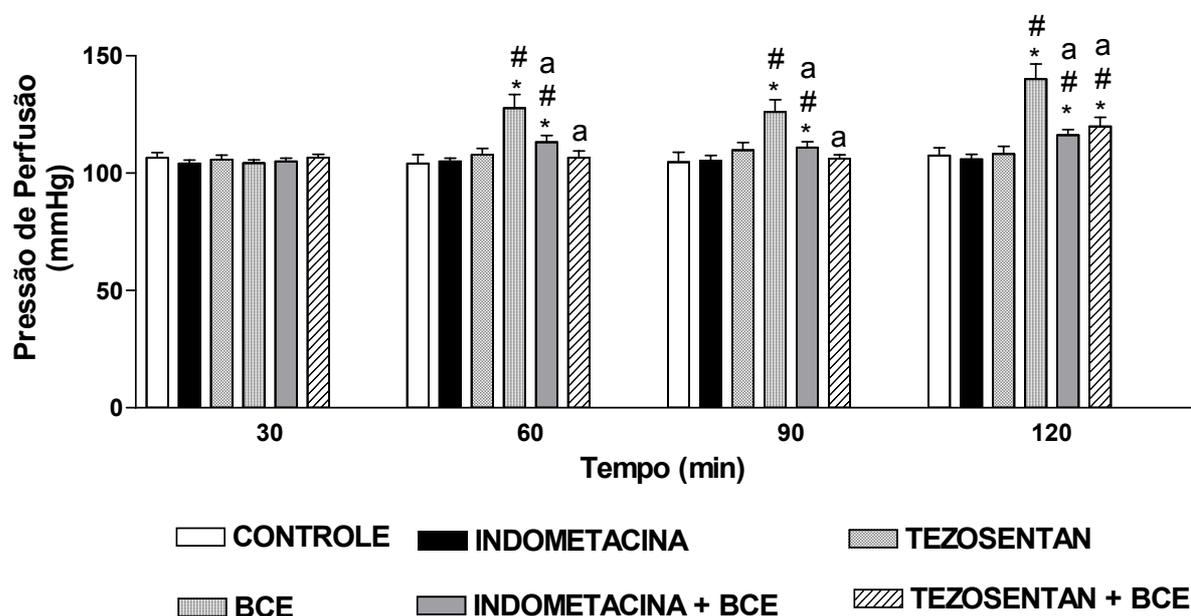


Figura 22. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na pressão de perfusão, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan

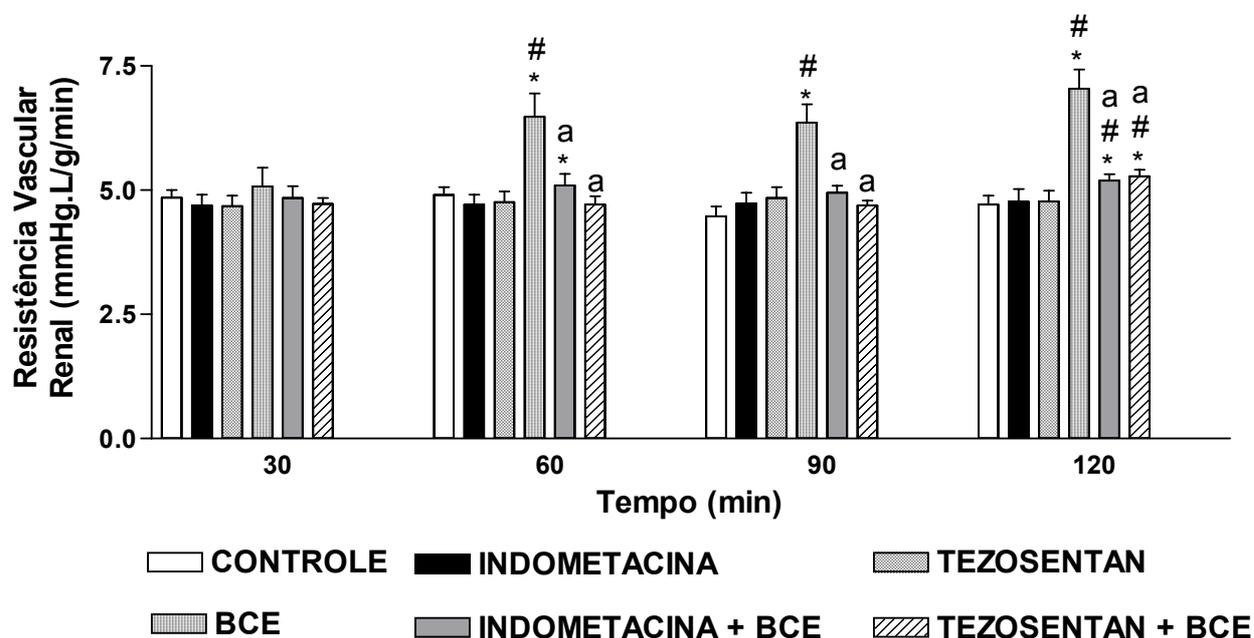


Figura 23. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan

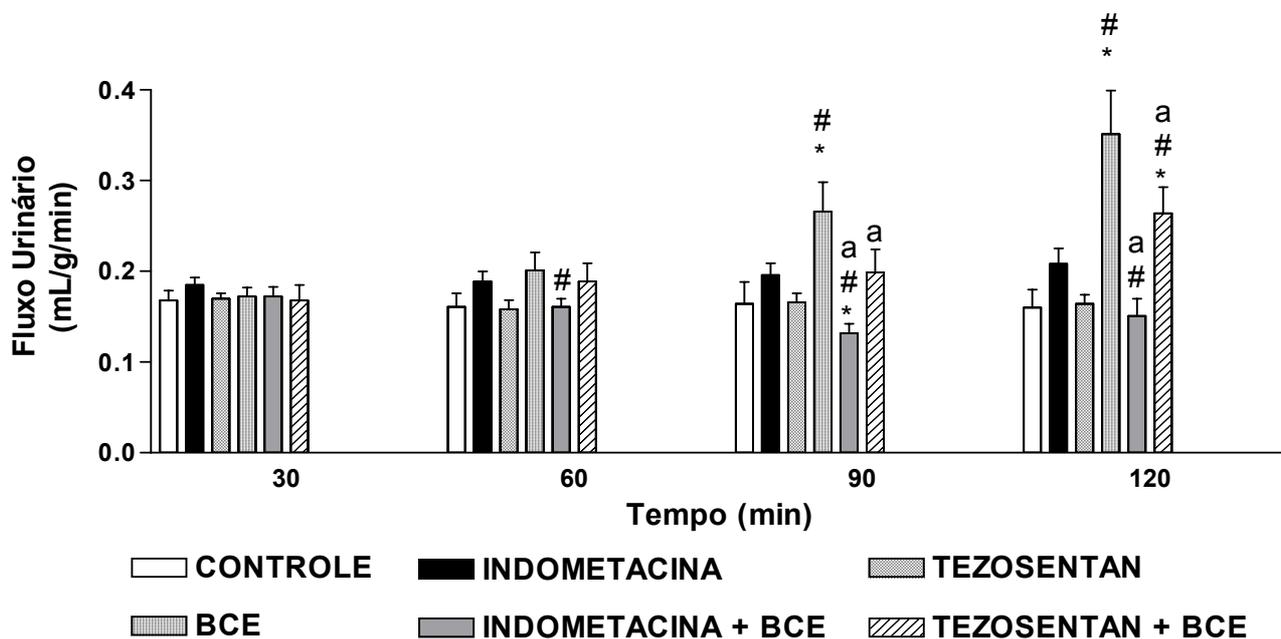


Figura 24. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

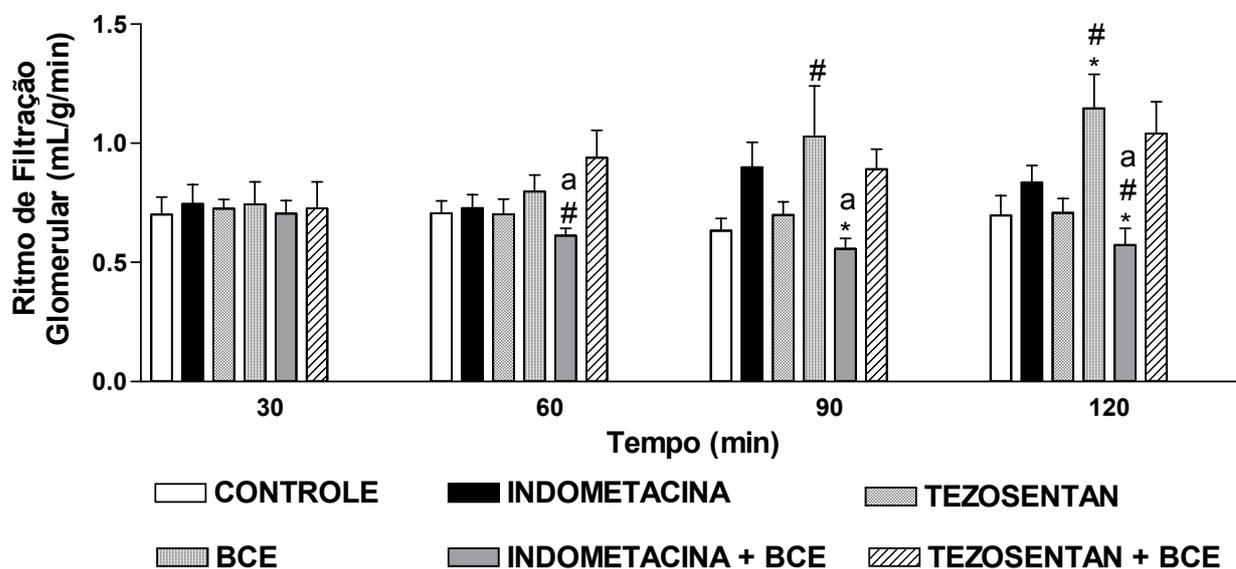


Figura 25. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL) no ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3µg/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

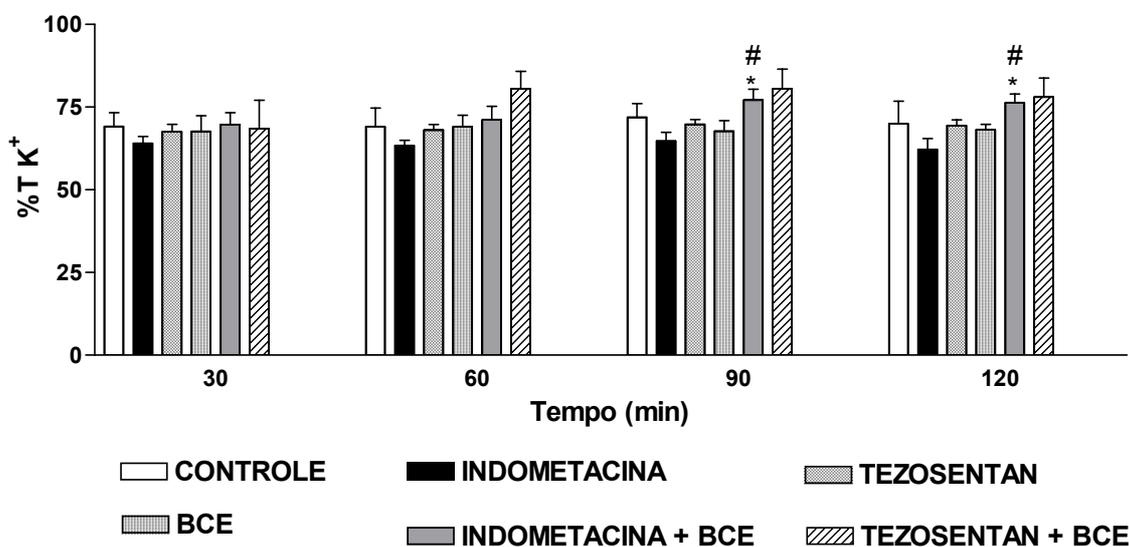


Figura 26. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) no transporte tubular de potássio, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

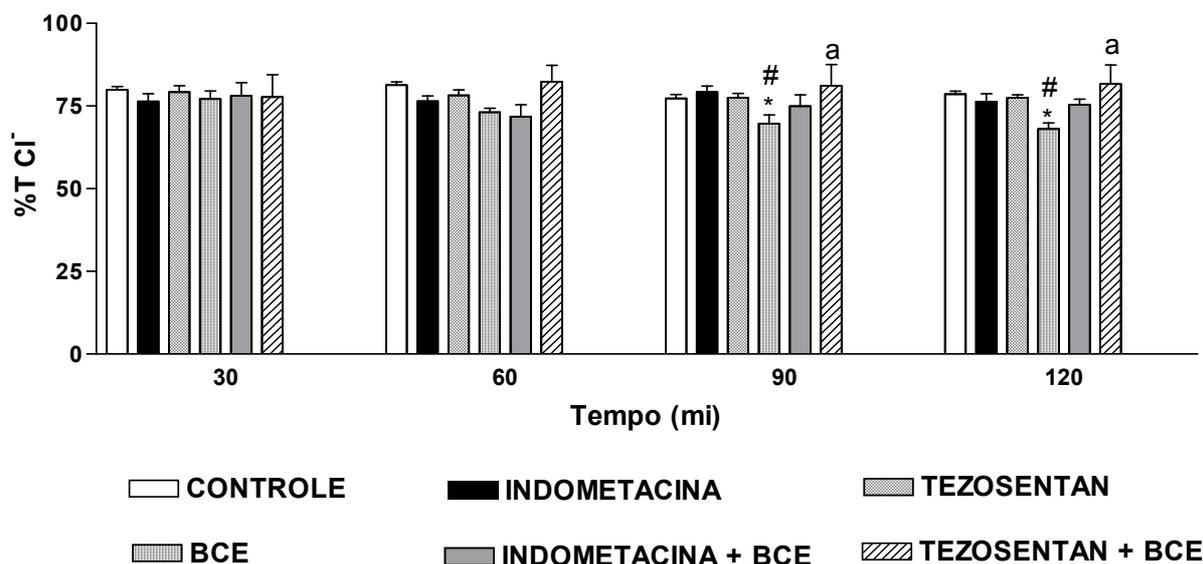


Figura 27. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) no transporte tubular de cloreto, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

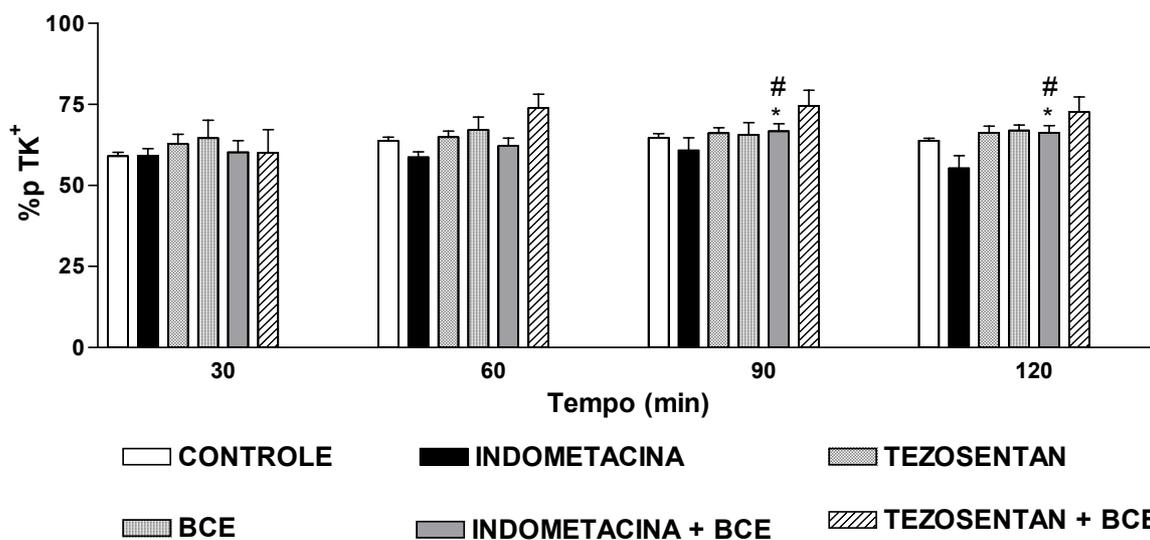


Figura 28. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) no transporte tubular proximal de potássio, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

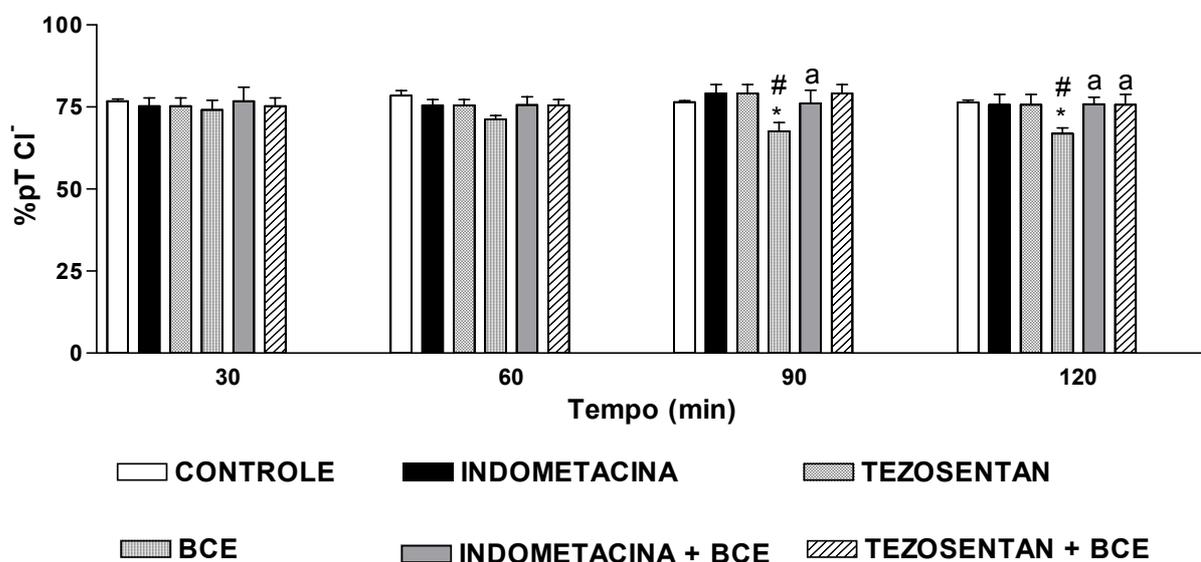


Figura 29. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

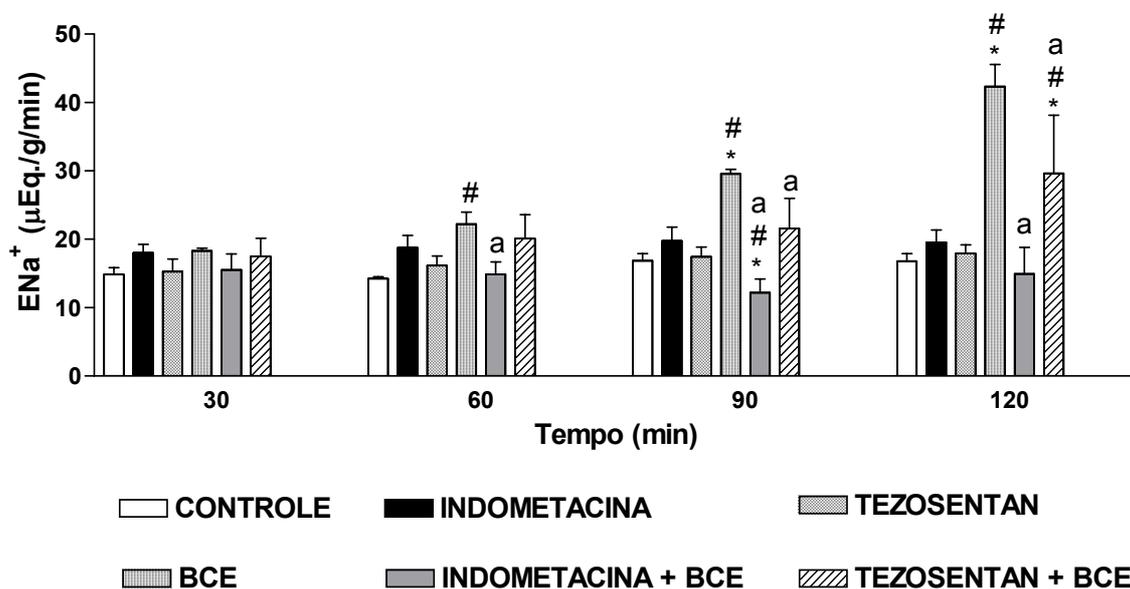


Figura 30. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

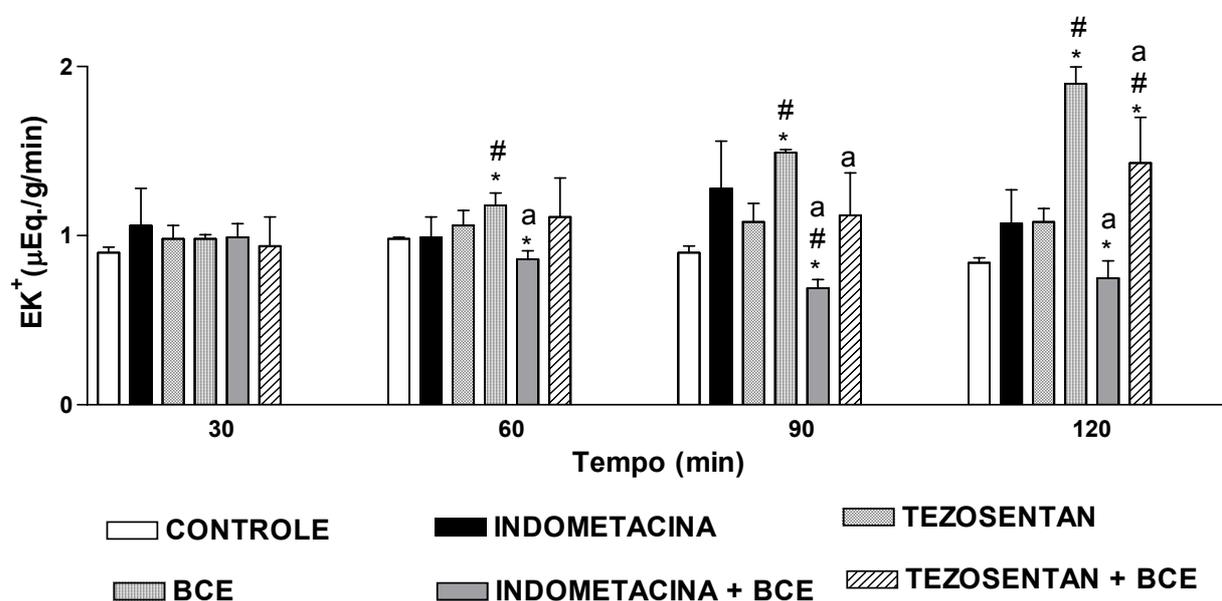


Figura 31. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na excreção de potássio, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

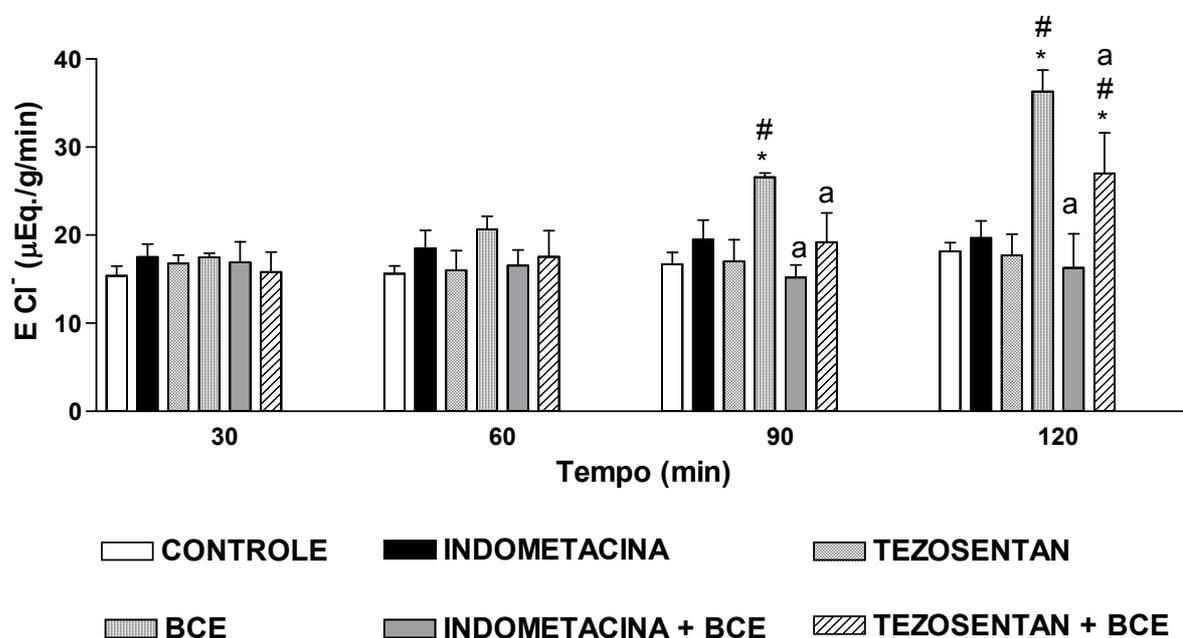


Figura 32. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na excreção de cloreto, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

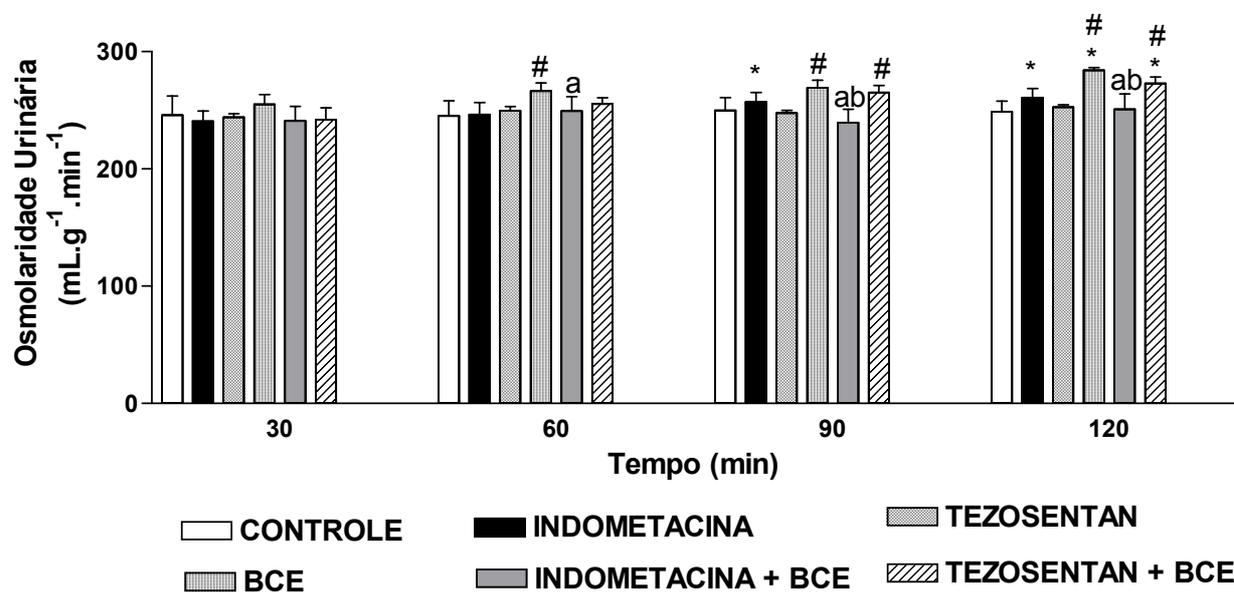


Figura 33. Efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL), tezosentan (3 μ g/mL), indometacina (10 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) e tezosentan (3 μ g/mL) + BcE (3 μ g/mL) na osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos. Os dados são expressos em (média \pm E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3 μ g/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. ^bComparação com relação a indometacina. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*, IND = indometacina, TZN = tezosentan.

Tabela 4

Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)

Grupo	30 (min)	60 (min)	90 (min)	120 (min)
Controle	5,34 ± 0,31	4,54 ± 0,16	4,96 ± 0,20	4,80 ± 0,12
IND	4,64 ± 0,21	4,45 ± 0,20	4,03 ± 0,30	4,12 ± 0,56
TZN	4,42 ± 0,45	4,39 ± 0,20	4,58 ± 0,52	3,77 ± 0,17
BcE	4,10 ± 0,94	2,51 ± 0,23	2,79 ± 0,08	1,56 ± 0,29 [#]
BcE + IND	5,04 ± 1,14	3,67 ± 0,30	5,20 ± 0,33	4,10 ± 0,94 ^a
BcE + TZN	5,20 ± 1,0	3,04 ± 0,27 [#]	2,40 ± 0,07 [#]	2,20 ± 0,11 [#]

%dTNa⁺ = (dTNa⁺ X 100) / TNa⁺, onde: TNa⁺ = Sódio tubular transportado (Sódio filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3µg/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

Tabela 5

Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)

Grupo	30 (min)	60 (min)	90 (min)	120 (min)
Controle	6,24 ± 0,36	6,07 ± 0,41	5,70 ± 0,92	6,07 ± 0,63
IND	6,13 ± 0,32	5,86 ± 0,20	5,00 ± 0,29	6,28 ± 0,11
TZN	6,40 ± 0,62	6,54 ± 0,36	6,54 ± 0,75	5,31 ± 0,22
BcE	5,76 ± 1,33	3,20 ± 0,26	3,47 ± 0,33	1,63 ± 0,27 ^{#*}
BcE + IND	6,32 ± 0,80	5,80 ± 0,40	7,87 ± 0,56 ^a	7,11 ± 0,40 ^a
BcE + TZN	6,0 ± 1,1	5,04 ± 0,35	4,12 ± 0,17	3,61 ± 0,20

%dTK⁺ = (dTK⁺ X 100) / TK⁺, onde: TK⁺ = Potássio tubular transportado (Potássio filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3µg/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

Tabela 6

Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em rins perfundidos com extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), tezosentan (3µg/mL), indometacina (10µg/mL) + BcE (3µg/mL) e tezosentan (3µg/mL) + BcE (3µg/mL)

Grupo	30 (min)	60 (min)	90 (min)	120 (min)
Controle	4,10 ± 0,20	3,92 ± 0,23	3,16 ± 0,24	3,76 ± 0,53
IND	4,00 ± 0,23	3,40 ± 0,24	3,69 ± 0,15	3,48 ± 0,09
TZN	3,80 ± 0,38	3,79 ± 0,17	3,98 ± 0,46	3,27 ± 0,15
BcE	4,10 ± 0,82	2,65 ± 0,25	2,98 ± 0,10	1,61 ± 0,31* [#]
BcE + IND	4,40 ± 0,98	3,26 ± 0,26	4,55 ± 0,29	4,20 ± 0,22 ^a
BcE + TZN	4,38 ± 0,97	2,49 ± 0,20	2,03 ± 0,14 [#]	1,69 ± 0,08* [#]

%dTCI⁻ = (dTCI⁻ X 100) / TCI⁻, onde: TCI⁻ = Cloreto tubular transportado (Cloreto filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com BcE 3µg/mL, com bloqueio de efeito ou alteração significativa. BcE = Extrato bruto de *B. caissarum*.

5.4 Efeitos Biológicos da Fosfolipase A₂ de *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado

A PLA₂ do extrato bruto de *B. caissarum* foi estudada em três diferentes concentrações, 1µg/mL, 0,3µg/mL e 0,1µg/mL na perfusão de rim isolado.

A concentração maior (1µg/mL) elevou a pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular aos 60 minutos, com subsequente redução significativa aos 90 e 120 minutos (figuras 34, 36, 37, 38). Esta concentração não alterou os transportes totais de sódio e cloreto (Dados não mostrados) , mas elevou o transporte total de potássio (figura 40) nos tempos de 60, 90 e 120 minutos, efeitos se reproduziram nos transportes proximais destes íons (figuras 39,41 e 42).

A excreção de sódio foi aumentada aos 60, 90 e 120 minutos (figura 43), enquanto as excreções de potássio (figura 44) e cloreto (figura 45) elevaram-se aos 60 minutos, retornando ao normal em seguida. A osmolaridade urinária elevou-se aos 60,90 e 120 minutos (figura 46), enquanto o transporte tubular distal de sódio diminuiu aos 90 minutos (tabela 7), potássio aos 120 minutos (tabela 8), sem alteração no transporte distal de cloreto (tabela 9).

A concentração intermediária (0,3µg/mL) promoveu elevação de pressão arterial nos tempos de 60,90 e 120 minutos (figura 34), resistência vascular renal aos 60 minutos (figura 36), fluxo urinário aos 90 e 120 minutos (figura 37) e ritmo de filtração glomerular aos 60,90 e 120 minutos (figura 38). Não foram observadas alterações nos transportes total e proximal de sódio (figura 39) e cloreto (figura 42), entretanto os transportes proximal e total de potássio elevaram-se aos 60,90 e 120 minutos (figuras 40 e 41).

Ocorreram elevações nas excreções de sódio (figura 43) e cloreto (figura 45) aos 60, 90 e 120 minutos, sem alterações significativas na excreção de potássio (figura 44). A osmolaridade urinária elevou-se aos 90 e 120 minutos (figura 46) e os transportes proximais de sódio (tabela 7), potássio (tabela 8) e cloreto (tabela 9) diminuíram aos 60,90 e 120 minutos.

A concentração menor (0,1µg/mL) promoveu elevação da pressão de perfusão (figura 34) e resistência vascular renal (figura 36) aos 60,90 e 120 minutos. O fluxo urinário (figura 37) e o ritmo de filtração glomerular (figura 38) se elevaram aos 90 e 120 minutos. Esta concentração não apresentou efeitos sobre os transportes totais de sódio, potássio (figura 40), cloreto e proximal de potássio (figura 41), com elevação dos transportes proximais de sódio (figura 39) e cloreto (figura 42).

As excreções de sódio (figura 43) e potássio (figura 44) elevaram-se aos 60,90 e 120 minutos, enquanto a excreção de cloreto (figura 45) elevou-se somente aos 90 e 120 minutos. A osmolaridade urinária elevou-se aos 60,90 e 120 minutos (figura 46) e o transporte tubular distal de sódio diminuiu aos 60,90 e 120 minutos (tabela 7), enquanto os transportes tubulares distais de potássio (tabela 8) e cloreto (tabela 9) diminuíram aos 90 e 120 minutos.

Foi observada a presença de picos pressóricos (figura 35) nas três concentrações estudadas, sendo mais precoce para a concentração maior (1 µg/mL), cujo pico ocorreu aos 40 minutos, com acentuada queda subsequente. A concentração intermediária (0,3µg/mL) foi a concentração que promoveu o pico de pressão mais intenso, com uma pequena queda deste parâmetro após o pico, mantendo significância até o final dos experimentos. A concentração menor (0,1µg/mL) promoveu o menor pico pressórico, que ocorreu aos 60 minutos e manteve-se no mesmo padrão até o final dos experimentos.

No sistema de leito vascular mesentérico foi utilizada a metodologia de fluxo constante e avaliação da variação da pressão. Primeiramente foi utilizado um protocolo no qual após estabilização, os primeiros 20 minutos foram considerados controle, sem infusão de nenhuma substância. Em seguida foi infundida a PLA₂ do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL/min) seguida da fenilefrina (100µg/mL/min) e da fenilefrina (100µg/mL/min) + PLA₂ da *B. caissarum* (3µg/mL/min) (figura 57). Neste protocolo não foram observadas alterações na pressão com a infusão da PLA₂, semelhante a resposta apresentada pelo extrato bruto (dados não mostrados).

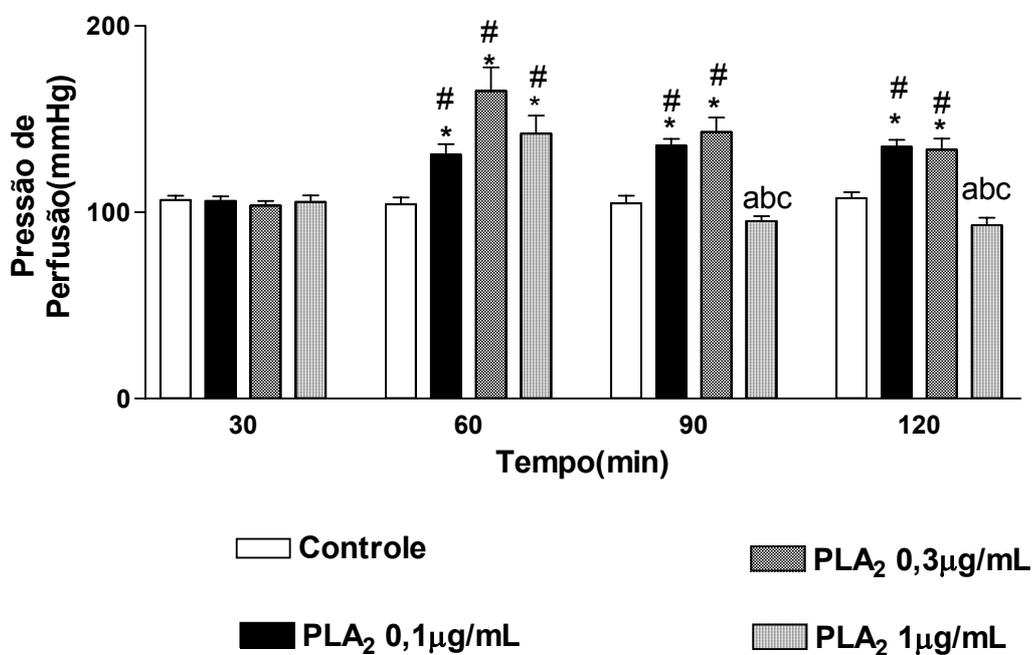
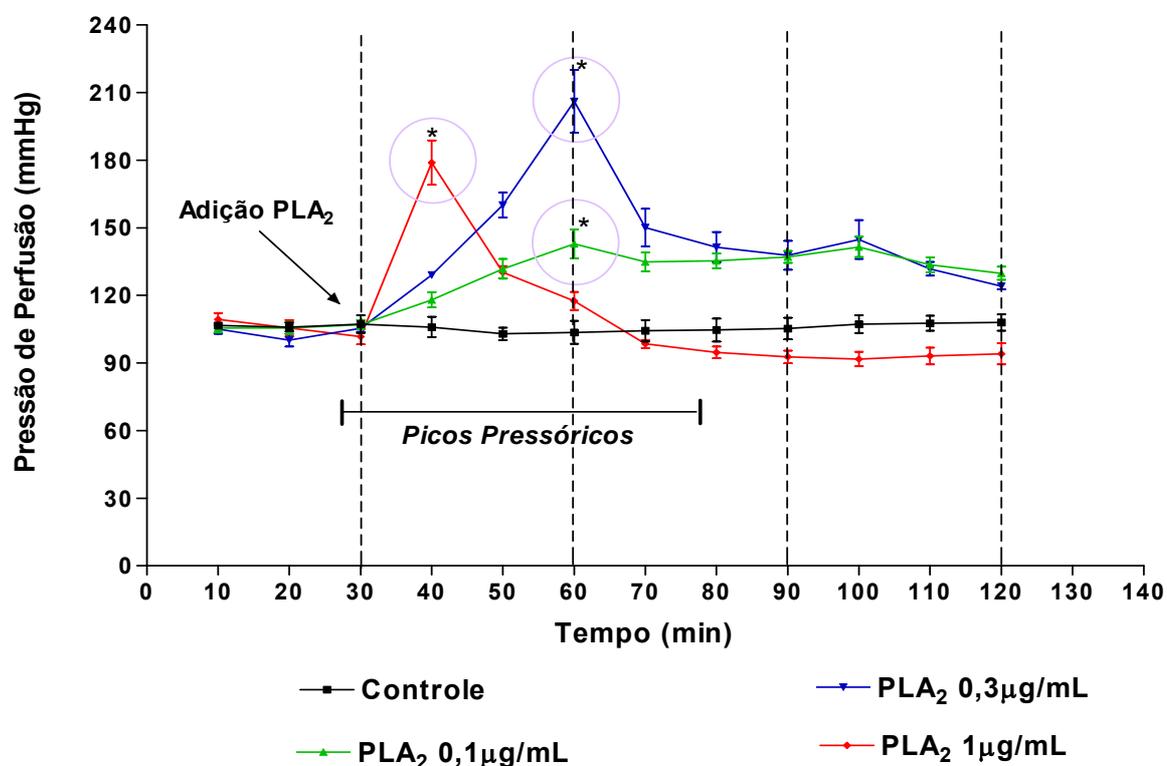


Figura 34. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a pressão de perfusão em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. ^c alteração significativa com relação ao tempo 60 minutos do mesmo grupo. PLA₂= Fosfolipase A₂.



Tempo (min)	Controle	PLA ₂ 0,1µg/mL	PLA ₂ 0,3µg/mL	PLA ₂ 1µg/mL
10	106,62 ± 0,74	105,60 ± 2,00	105,10 ± 2,20	109,30 ± 2,90
20	105,95 ± 1,89	105,60 ± 2,70	100,10 ± 2,80	105,50 ± 3,60
30	107,28 ± 3,91	107,00 ± 2,10	105,40 ± 1,60	101,70 ± 3,40
40	105,95 ± 4,49	118,00 ± 3,40	129,10 ± 1,20	178,90 ± 9,80*
50	102,95 ± 2,76	131,80 ± 4,40	160,10 ± 5,60	130,30 ± 2,70
60	103,62 ± 5,07	142,80 ± 6,40*	206,10 ± 13,90*	117,50 ± 4,00
70	104,28 ± 4,78	134,80 ± 4,20	150,10 ± 8,40	98,50 ± 1,80
80	104,62 ± 5,07	135,30 ± 3,30	141,40 ± 6,70	94,70 ± 2,60
90	105,28 ± 4,78	137,10 ± 2,70	137,80 ± 6,40	92,70 ± 2,80
100	107,28 ± 3,91	141,50 ± 4,50	144,80 ± 8,60	91,70 ± 3,20
110	107,62 ± 3,34	133,60 ± 3,30	131,80 ± 3,00	93,10 ± 3,70
120	107,95 ± 3,63	129,80 ± 2,90	124,10 ± 1,40	94,10 ± 4,70

Figura 35. Picos de pressão de perfusão provocados pela Fosfolipase A₂ do extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi

realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$.

*Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

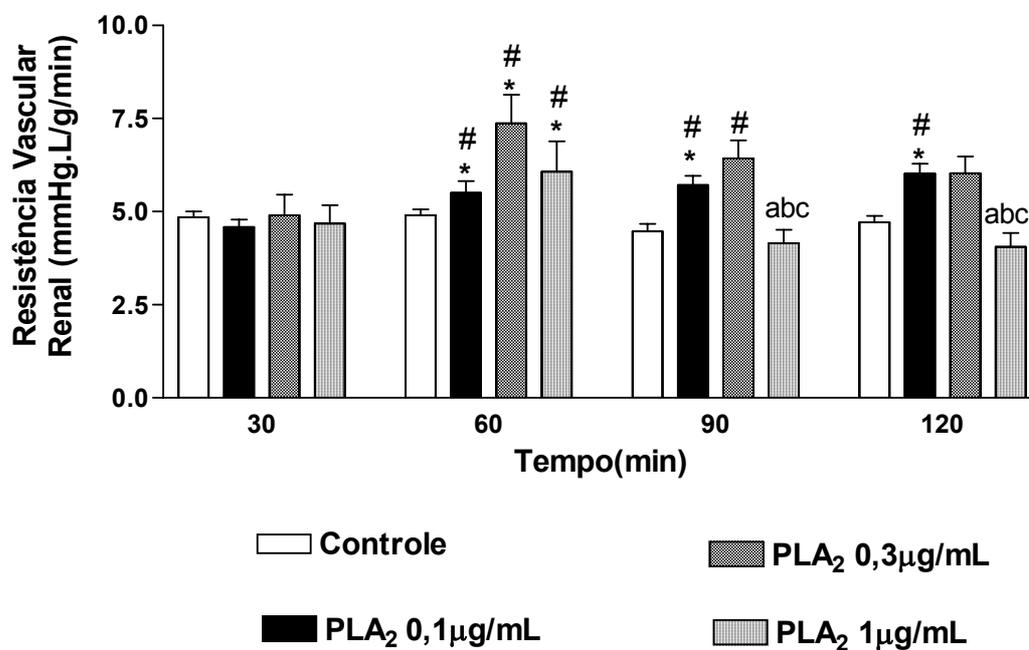


Figura 36. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a resistência vascular renal em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. ^c alteração significativa com relação ao tempo 60 minutos do mesmo grupo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

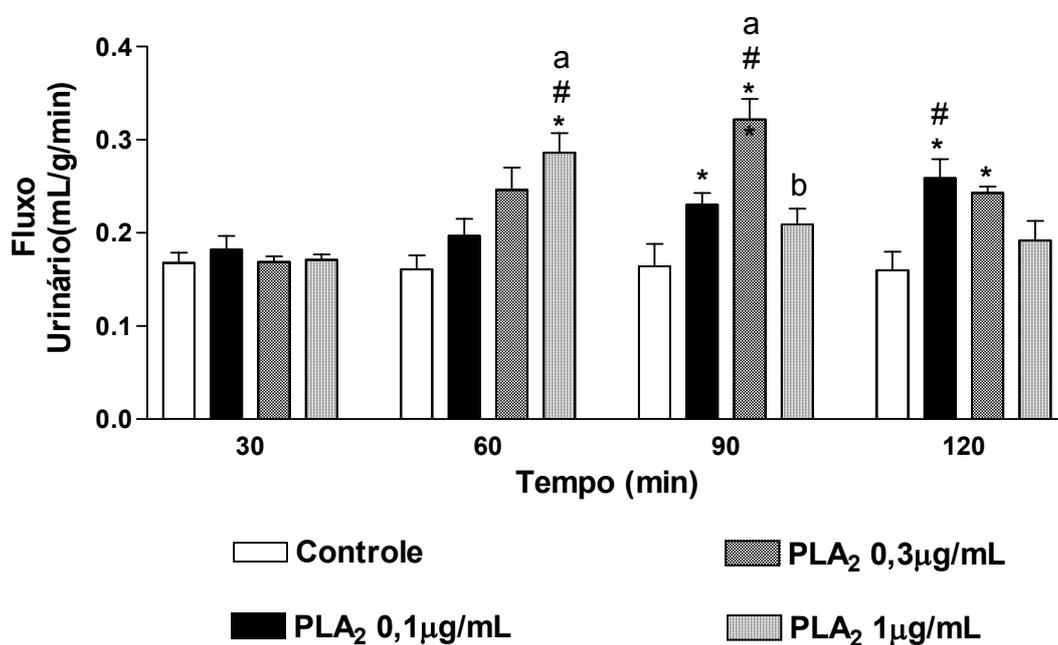


Figura 37. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o fluxo urinário em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

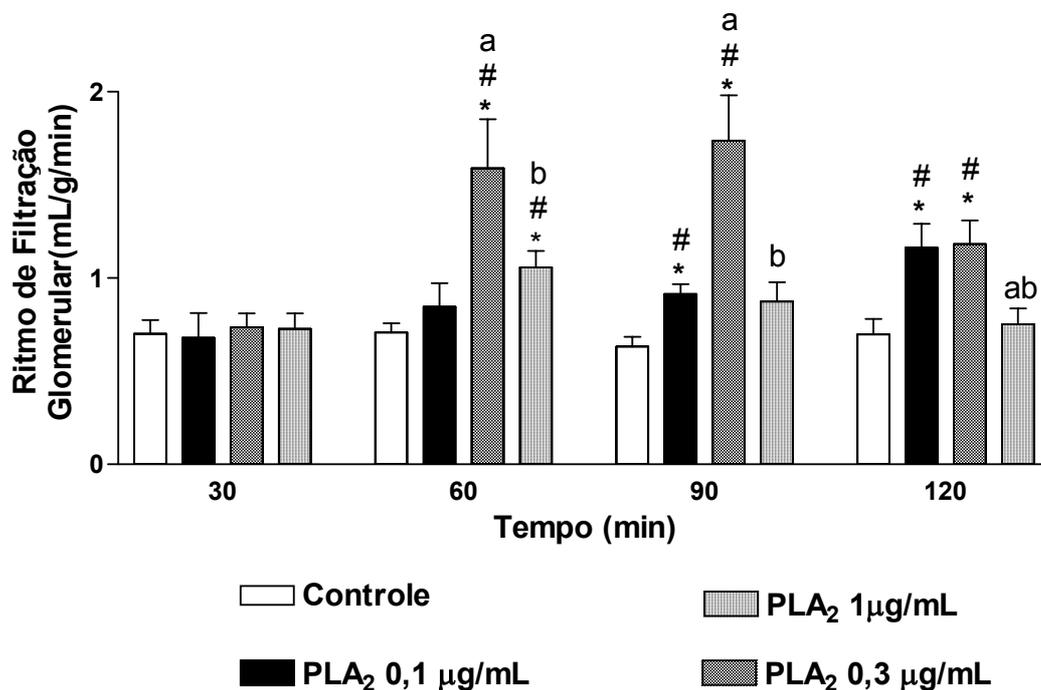


Figura 38. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o ritmo de filtração glomerular em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. ^c alteração significativa com relação ao tempo 60 minutos do mesmo grupo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

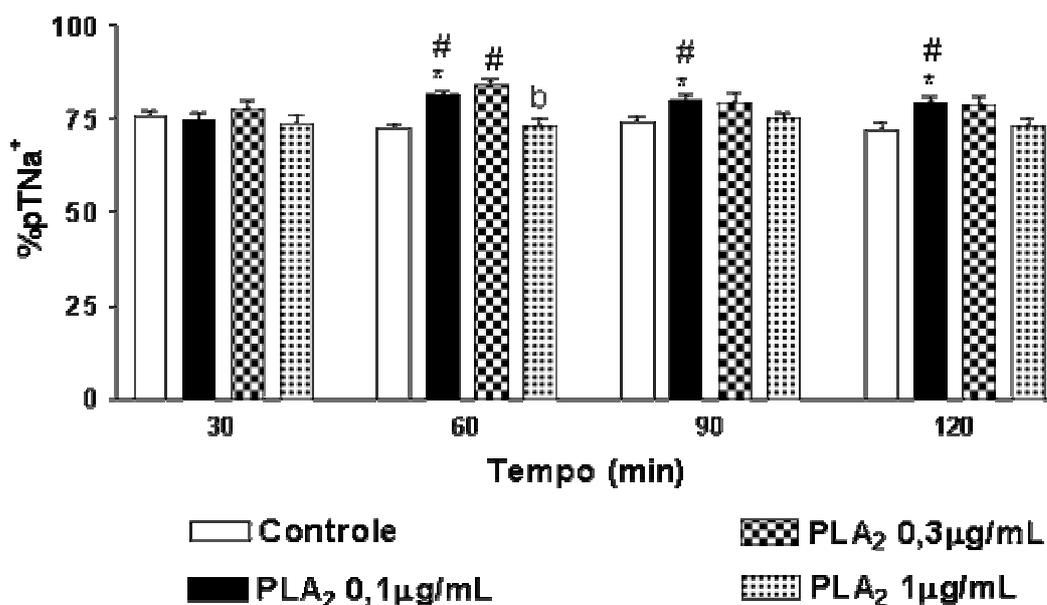


Figura 39. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular proximal de sódio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

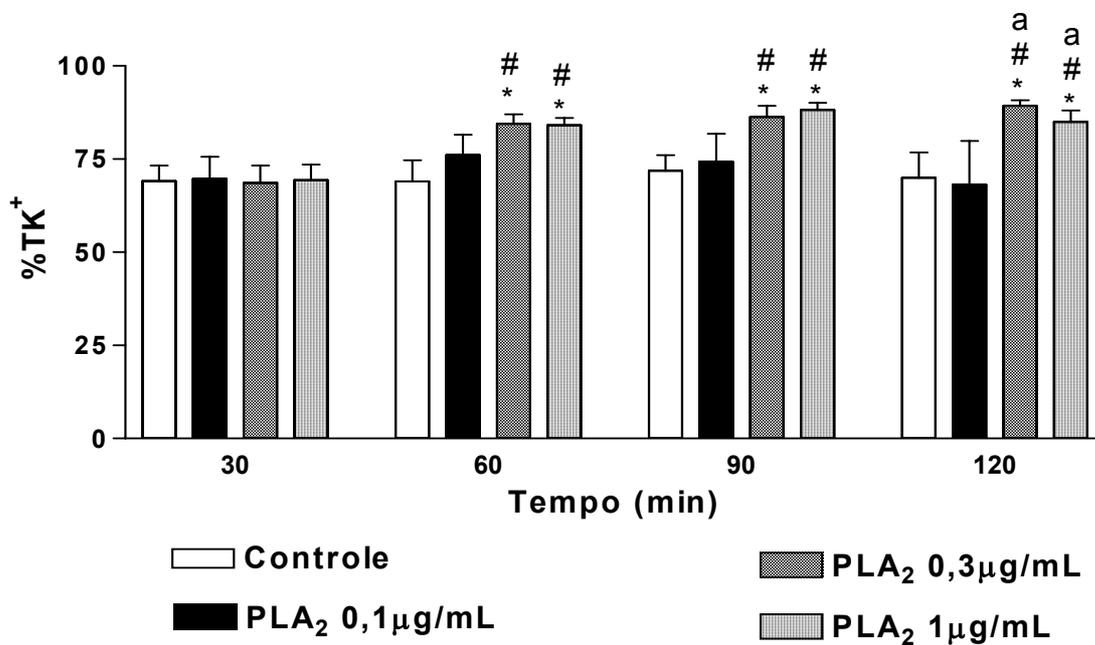


Figura 40. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

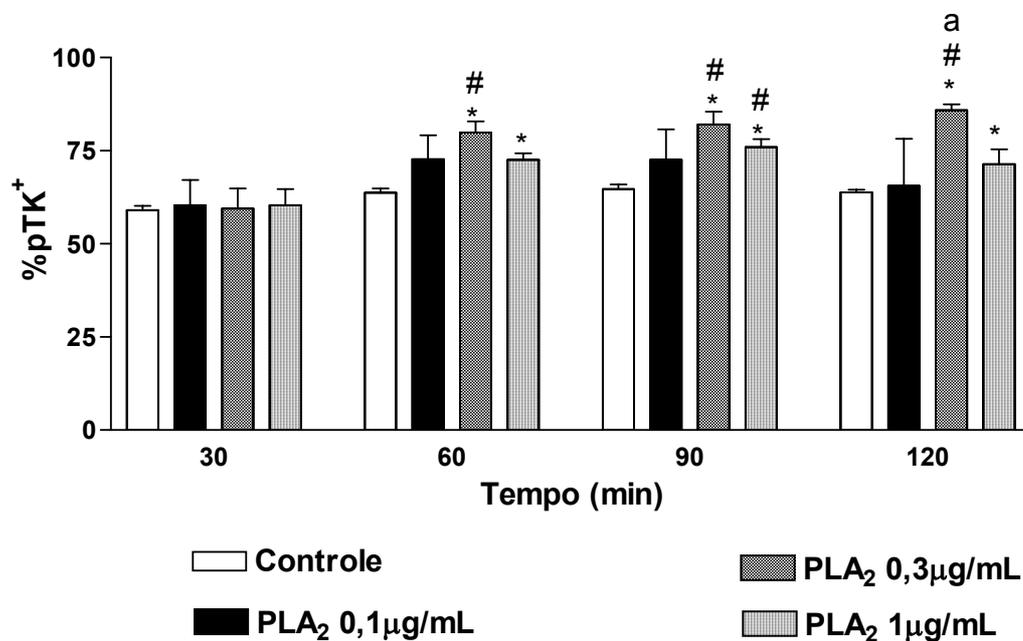


Figura 41. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular proximal de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

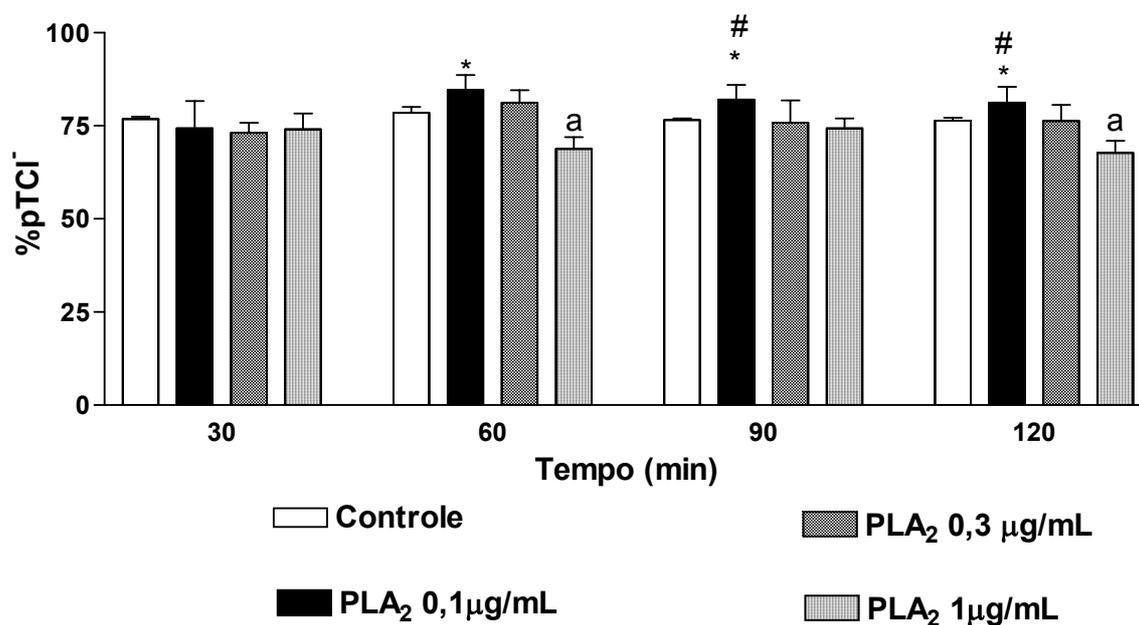


Figura 42. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre o transporte tubular proximal de cloreto em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1 μg/mL, 0,3 μg/mL e 1 μg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1 μg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

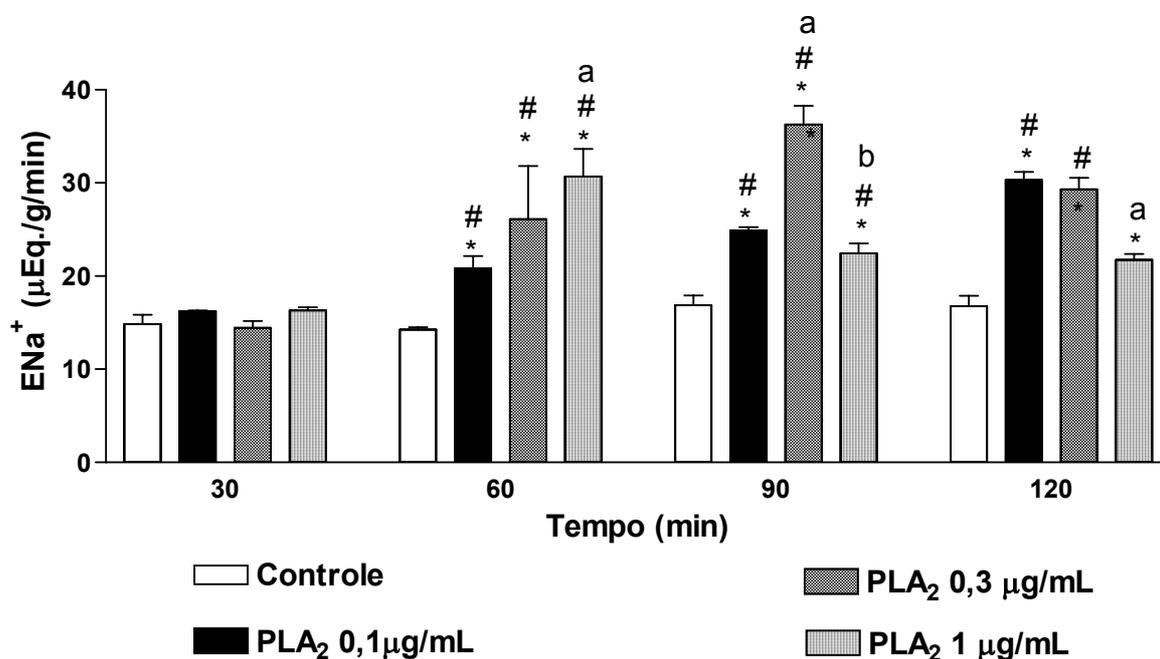


Figura 43. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de sódio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1 μg/mL, 0,3 μg/mL e 1 μg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1 μg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3 μg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

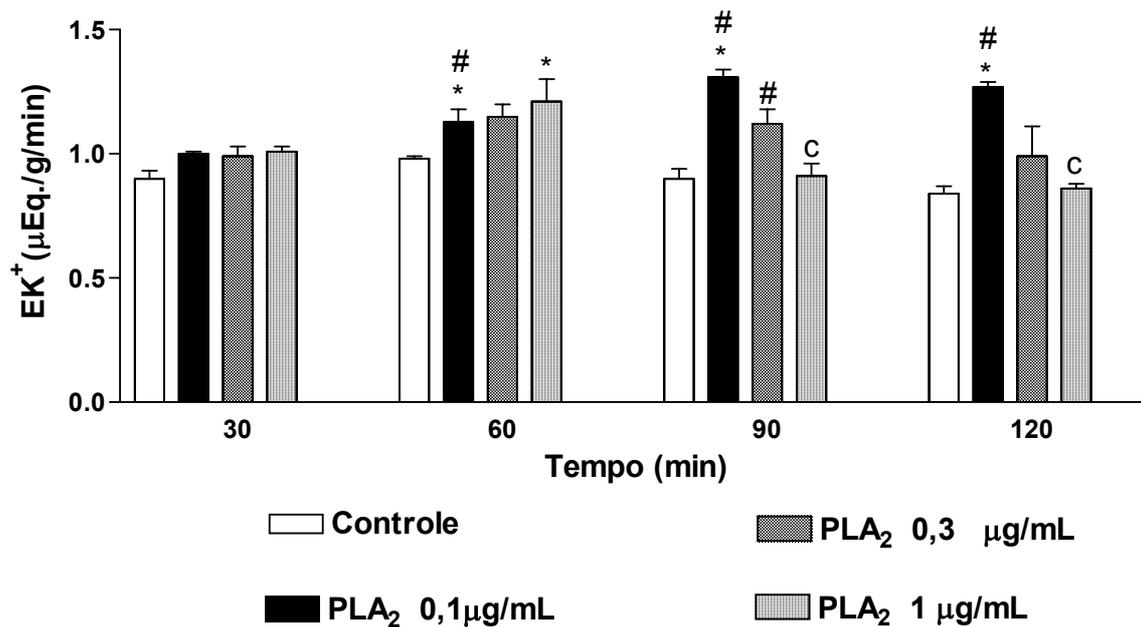


Figura 44. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de potássio em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^c alteração significativa com relação ao tempo 60 minutos do mesmo grupo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

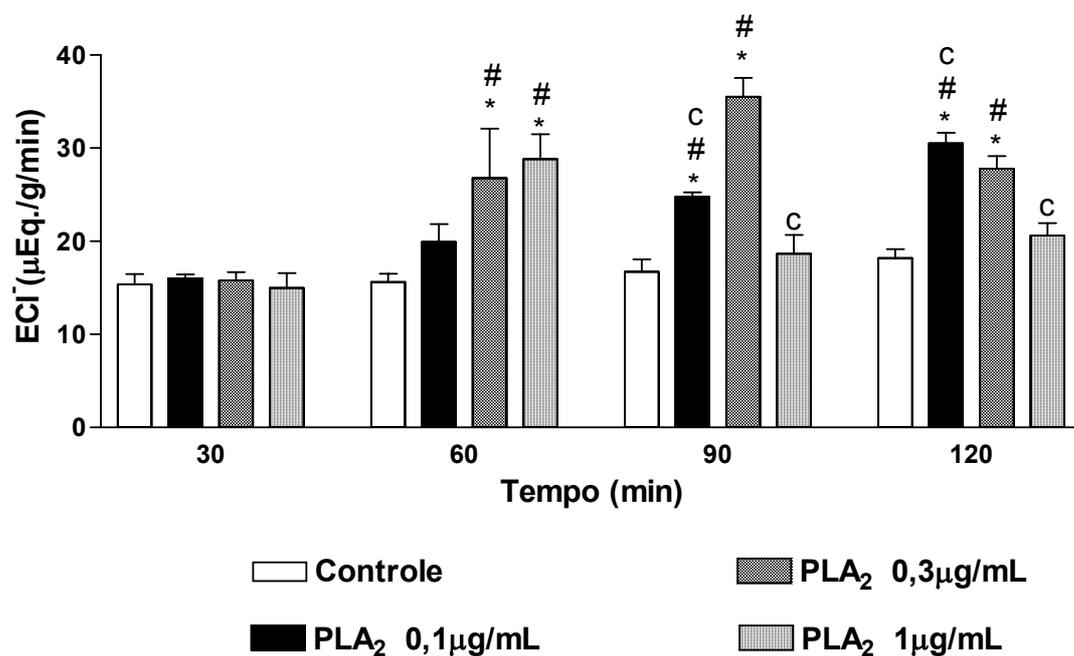


Figura 45. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a excreção de cloreto em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^{*}alteração significativa com relação ao tempo 60 minutos do mesmo grupo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

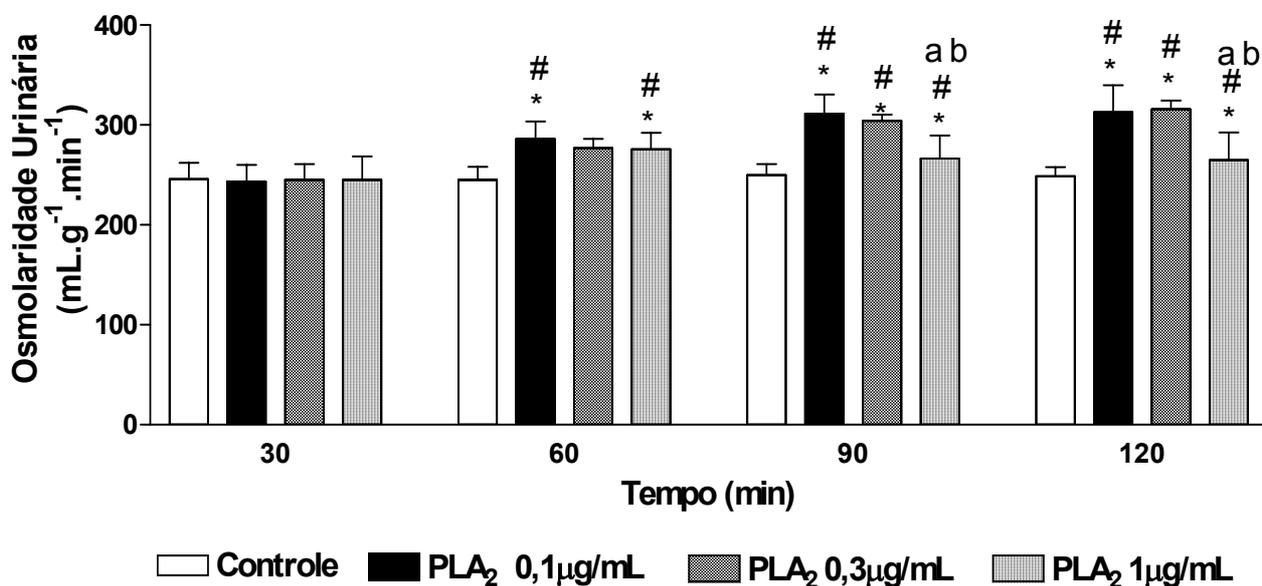


Figura 46. Efeitos da Fosfolipase A₂ do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* sobre a osmolaridade urinária em rim isolado de rato, nas concentrações de 0,1µg/mL, 0,3µg/mL e 1µg/mL. Os dados são expressos em (média ± E.P.M.). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^asignificância com relação a concentração 0,1µg/mL no mesmo período de tempo. ^bsignificância com relação a concentração 0,3µg/mL no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂.

Tabela 7

Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	PLA ₂ 0,1µg/mL (%)	PLA ₂ 0,3µg/mL (%)	PLA ₂ 1µg/mL (%)
30	5,34 ± 0,31	5,37 ± 0,23	5,31 ± 0,64	5,34 ± 0,55
60	4,54 ± 0,16	2,57 ± 0,20 [#]	2,32 ± 0,34 [#]	3,27 ± 0,55
90	4,96 ± 0,20	2,46 ± 0,10 [#]	2,17 ± 0,15 [#]	3,18 ± 0,18 [#]
120	4,80 ± 0,12	2,59 ± 0,21 [#]	2,02 ± 0,38 [#]	4,29 ± 0,56 ^{ab}

%dTNa⁺ = (dTNa⁺ X 100) / TNa⁺, onde: TNa⁺ = Sódio tubular transportado (Sódio filtrado e não excretado excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com PLA₂ 0,1µg/mL no mesmo tempo. ^bComparação com PLA₂ 0,3µg/mL PLA₂= Fosfolipase A₂

Tabela 8

Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	PLA ₂ 0,1µg/mL (%)	PLA ₂ 0,3µg/mL (%)	PLA ₂ 1µg/mL (%)
30	6,24 ± 0,36	6,13 ± 0,68	6,05 ± 0,86	6,20 ± 0,25
60	6,07 ± 0,41	3,68 ± 0,23	3,64 ± 0,65 [*]	5,75 ± 0,06
90	5,70 ± 0,92	3,83 ± 0,28 [#]	3,10 ± 0,18 [#]	5,66 ± 0,06 ^{ab}
120	6,07 ± 0,63	2,94 ± 0,38 [*]	2,68 ± 0,51 [#]	5,20 ± 0,15 ^{*b}

%dTK⁺ = (dTK⁺ X 100) / TK⁺, onde: TK⁺ = Potássio tubular transportado (Potássio filtrado e não excretado excretado). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo.

^aComparação com PLA₂ 0,1µg/mL no mesmo tempo. ^bComparação com PLA₂ 0,3µg/mL PLA₂= Fosfolipase A₂.

Tabela 9

Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum*

Tempo (min)	Controle (%)	PLA ₂ 0,1µg/mL (%)	PLA ₂ 0,3µg/mL (%)	PLA ₂ 1µg/mL (%)
30	4,00 ± 0,23	4,00 ± 0,18	4,02 ± 0,52	4,05 ± 0,07
60	3,40 ± 0,24	3,25 ± 0,45	1,73 ± 0,25 ^{*#}	2,85 ± 0,55
90	3,69 ± 0,15	2,57 ± 0,12 ^{*#}	1,65 ± 0,10 ^{*#}	2,60 ± 0,15
120	3,48 ± 0,09	2,63 ± 0,05 ^{*#}	1,50 ± 0,28 ^{*#a}	3,70 ± 0,59 ^b

%dTCI⁻ = (dTCI⁻ X 100) / TCI⁻, onde: TCI⁻ = Cloreto tubular transportado (Cloreto filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aComparação com PLA₂ 0,1µg/mL no mesmo tempo. ^bComparação com PLA₂ 0,3µg/mL PLA₂= Fosfolipase A₂

5.6 Estudo da participação da cicloxigenase (cox) nos efeitos renais da Fosfolipase A₂ de *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado

Com o objetivo de investigar a participação da enzima cicloxigenase na ação renal desta PLA₂ realizou-se o bloqueio com indometacina (IND - inibidor não-seletivo de cicloxigenase, 10µg/mL) .

Após avaliação dos efeitos da PLA₂ do extrato bruto de *B. caissarum* em três diferentes concentrações observou-se que nenhuma destas apresentou efeito expressivo diante das demais, optando-se por realizar bloqueios das três concentrações.

Indometacina foi adicionada aos 30 minutos de experimento para realização do grupo controle. Nos experimentos para avaliação do bloqueio, a IND foi adicionada no início do experimento (tempo=0) e PLA₂ foi adicionada aos 30 minutos, de um experimento com duração total de 120 minutos.

A indometacina não foi capaz de bloquear os efeitos da concentração maior de PLA₂ (1µg/mL) no ritmo de ritmo de filtração glomerular (figura 50), fluxo urinário (figura 49), pressão de perfusão (figura 47) e resistência vascular renal (figura 48), contribuindo, inclusive, na elevação destes últimos dois parâmetros aos 60 minutos. Não houve também bloqueio nos transportes tubulares total (figuras 51, 53, 55) e proximal de eletrólitos (figuras 52, 54, 56) ou na excreção dos mesmos (figuras 57, 58, 59). Nos transportes distais (tabelas 10-12), a adição de IND apresentou uma tendência a reversão do efeito da PLA₂, todavia aumentou significativamente o transporte de sódio aos 90 minutos de forma significativa, diminuiu os transportes distais de potássio aos 60,90 e 120 minutos e reverteu a diminuição do transporte de cloreto aos 90 e 120 minutos.

A concentração intermediária (0,3 µg/mL) não teve seus efeitos na pressão de perfusão (figura 58), resistência vascular renal (figura 48) ou fluxo urinário (figura 49) revertidos pela indometacina, que reverteu a elevação do ritmo de filtração glomerular (figura 50) pela PLA₂ aos 60 minutos. A indometacina reverteu as alterações no transporte total de potássio (figura 53) aos 60,90 e 120 minutos e

excreção deste eletrólito aos 90 minutos (figura 58). Houve reversão na osmolaridade urinária aos 90 e 120 minutos (figura 60) no transporte distal de sódio aos 60 minutos (tabela 10) e cloreto aos 60 e 90 minutos (Tabela 12).

Com relação a concentração menor de PLA_2 (0,1 $\mu\text{g/mL}$), a indometacina reverteu o aumento da pressão aos 60 minutos (figura 47), o fluxo urinário aos 90 e 120 minutos (figura 49) e o ritmo de filtração glomerular aos 120 minutos (figura 50), sem apresentar ação na resistência vascular renal (figura 48). Houve reversão do efeito da PLA_2 no transporte tubular proximal de sódio (figura 52) e cloreto (figura 56) aos 90 e 120 minutos. A adição de indometacina elevou significativamente o transporte tubular total de potássio aos 60,90 e 120 minutos (figura 53) e cloreto aos 60 minutos (figura 55). Houve bloqueio da elevação da excreção de sódio (figura 57), potássio (figura 58), cloreto (figura 59) e da osmolaridade urinária (figura 60) aos 60, 90 e 120 minutos, assim como reversão da diminuição do transporte distais de sódio (tabela 10) nestes tempos e cloreto aos 90 minutos (tabela 12).

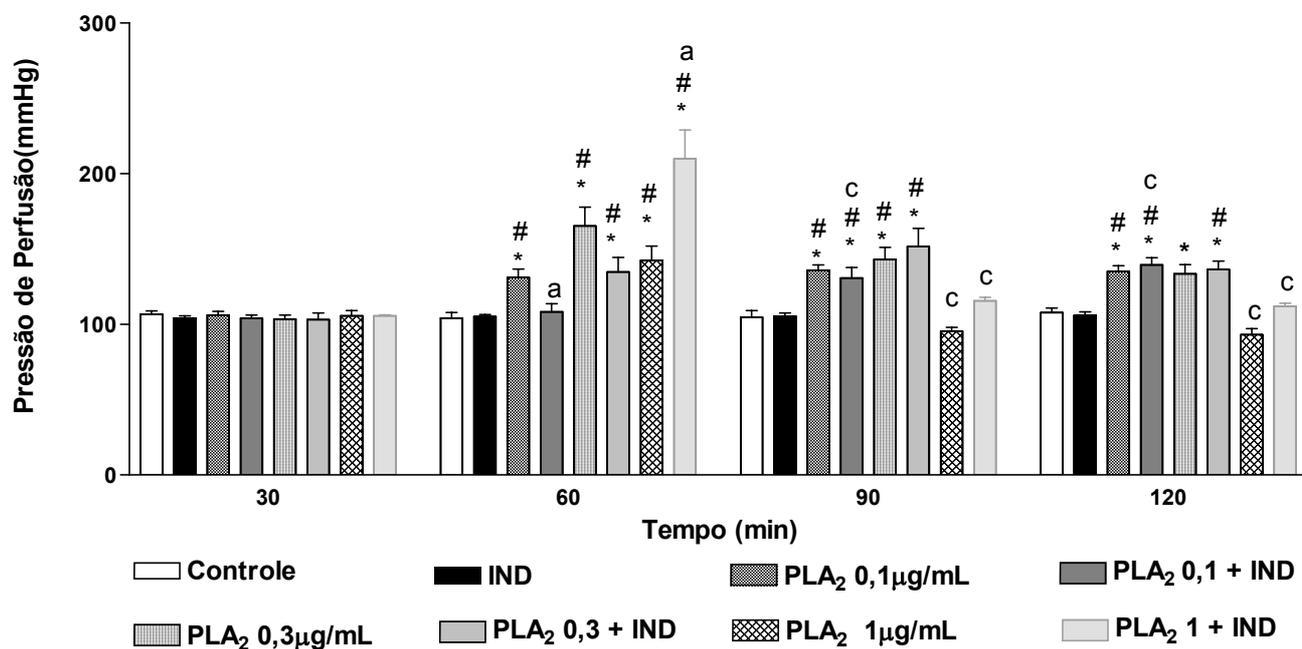


Figura 47. Efeitos da PLA₂ do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL), indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) na pressão de perfusão, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^areversão do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. ^csignificância com relação a mesma concentração aos 60 minutos. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

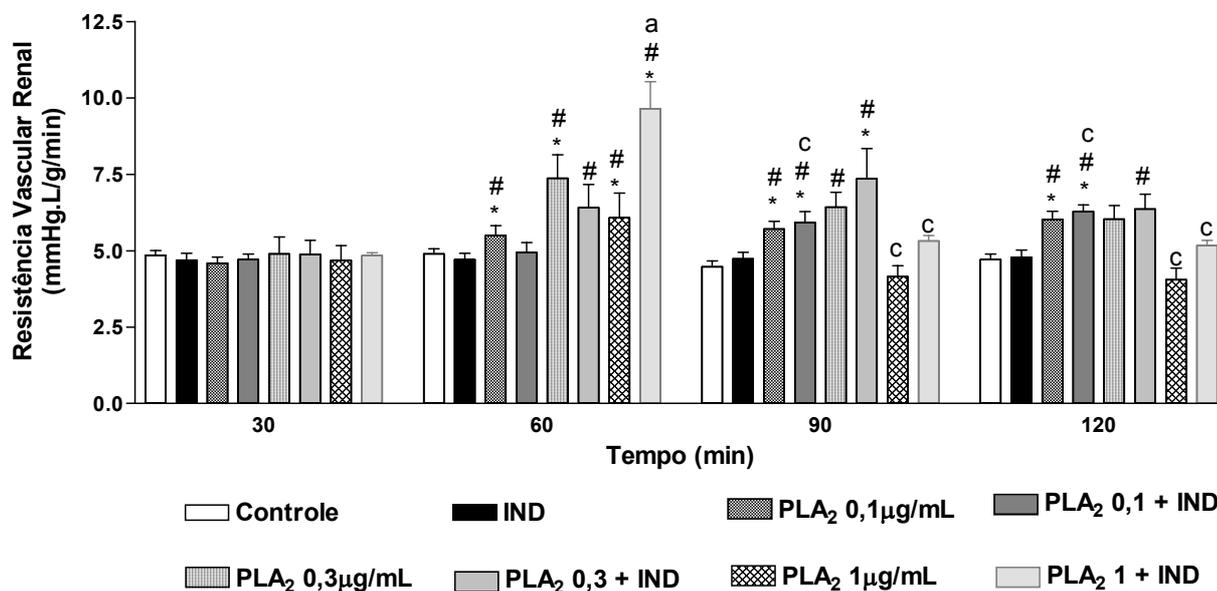


Figura 48. Efeitos indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^areversão do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. [°]significância com relação a mesma concentração aos 60 minutos. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

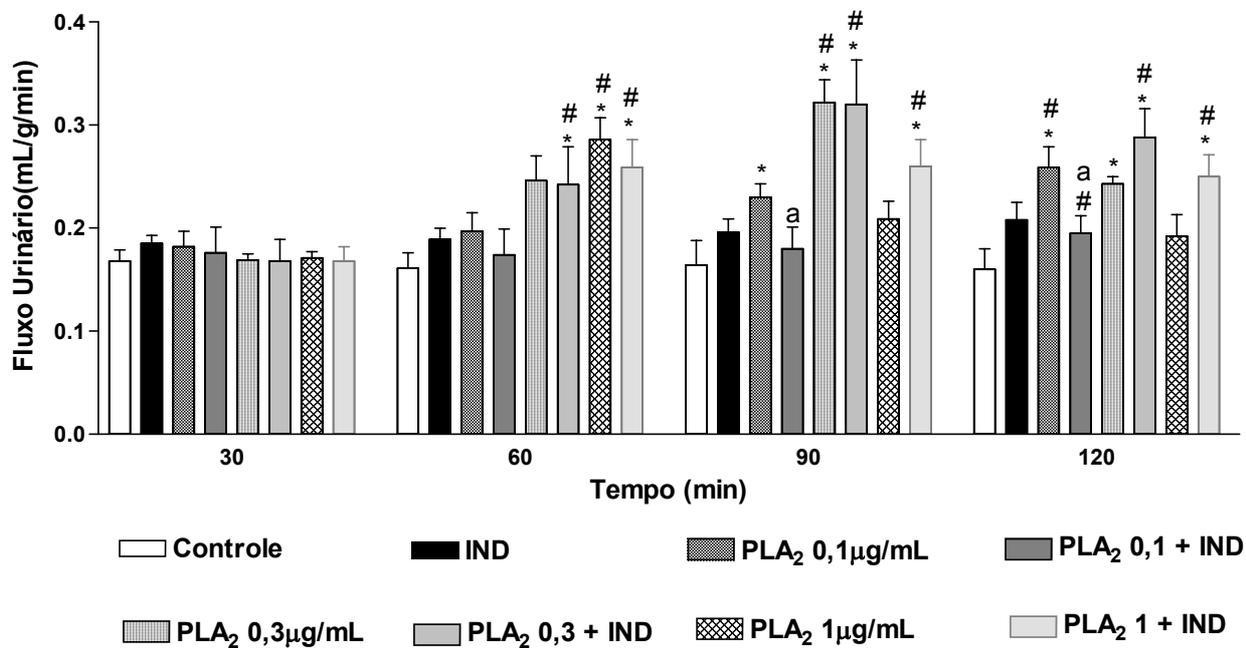


Figura 49. Efeitos da indometacina (10μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,1μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,3μg/mL) e indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (1μg/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^areversão do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

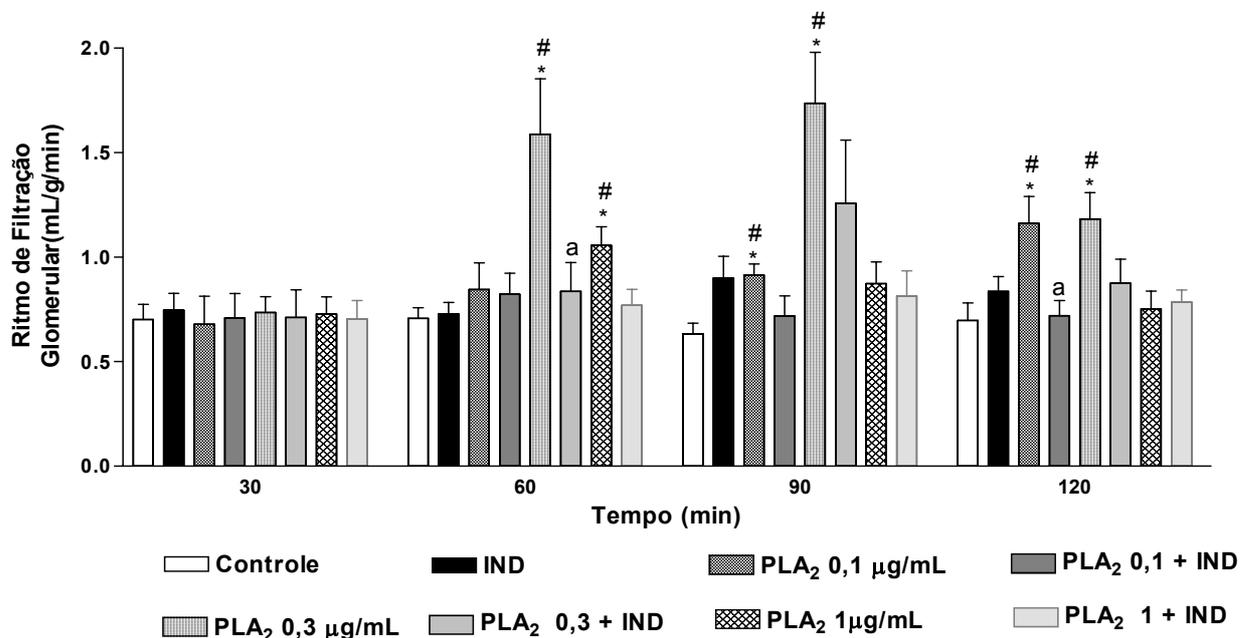


Figura 50. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

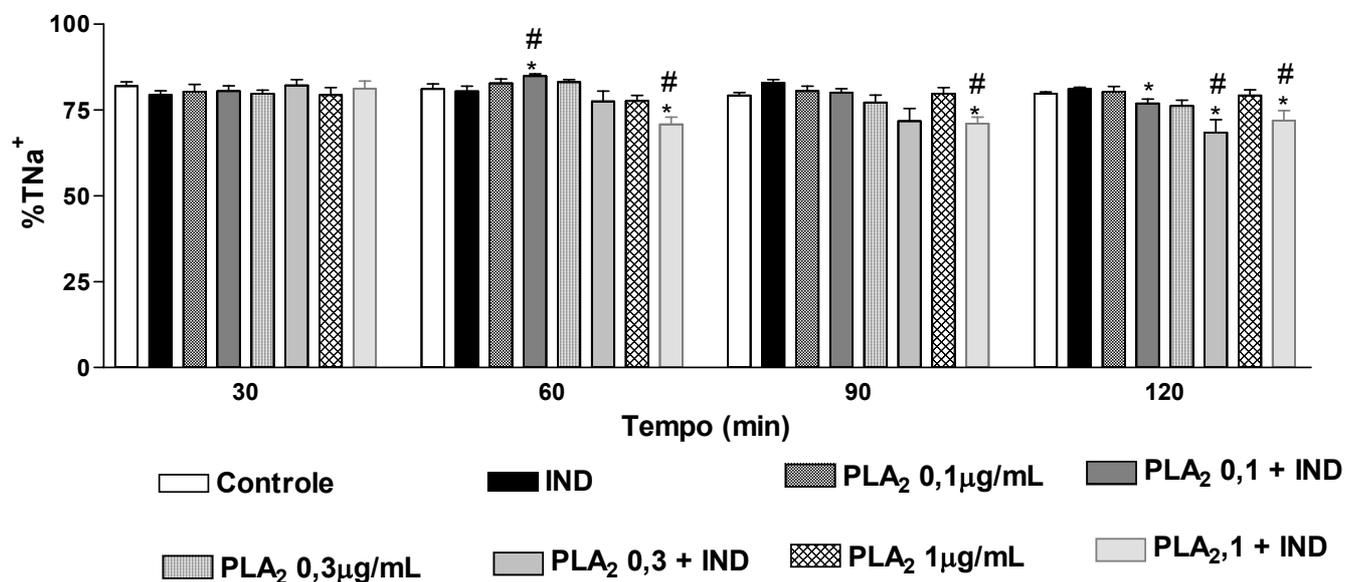


Figura 51. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no transporte tubular de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

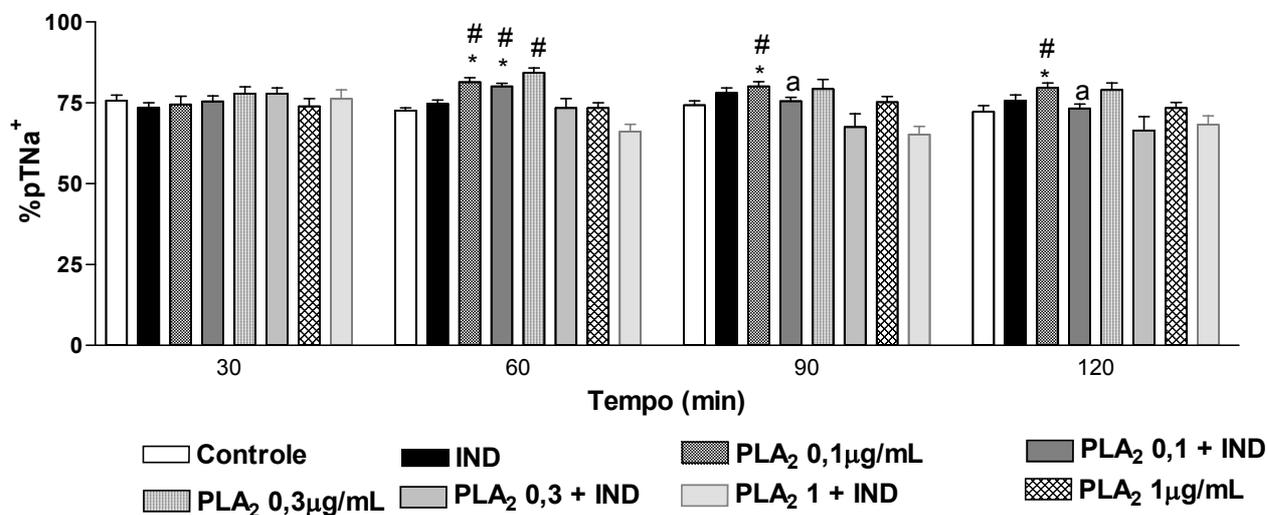


Figura 52. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no transporte tubular proximal de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

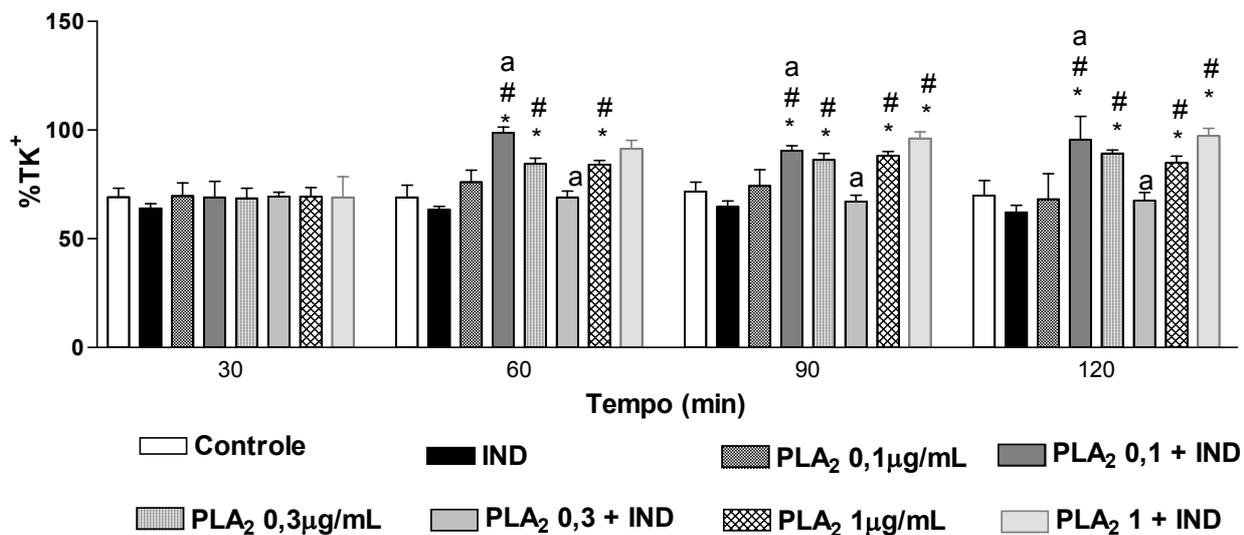


Figura 53. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no transporte tubular de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

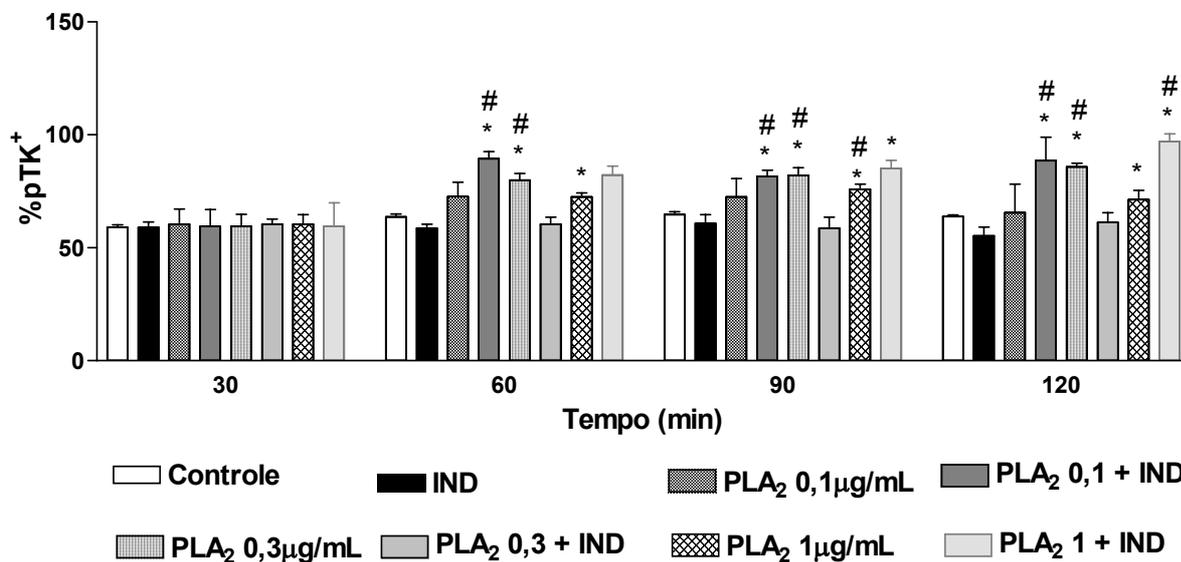


Figura 54. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no transporte tubular proximal de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

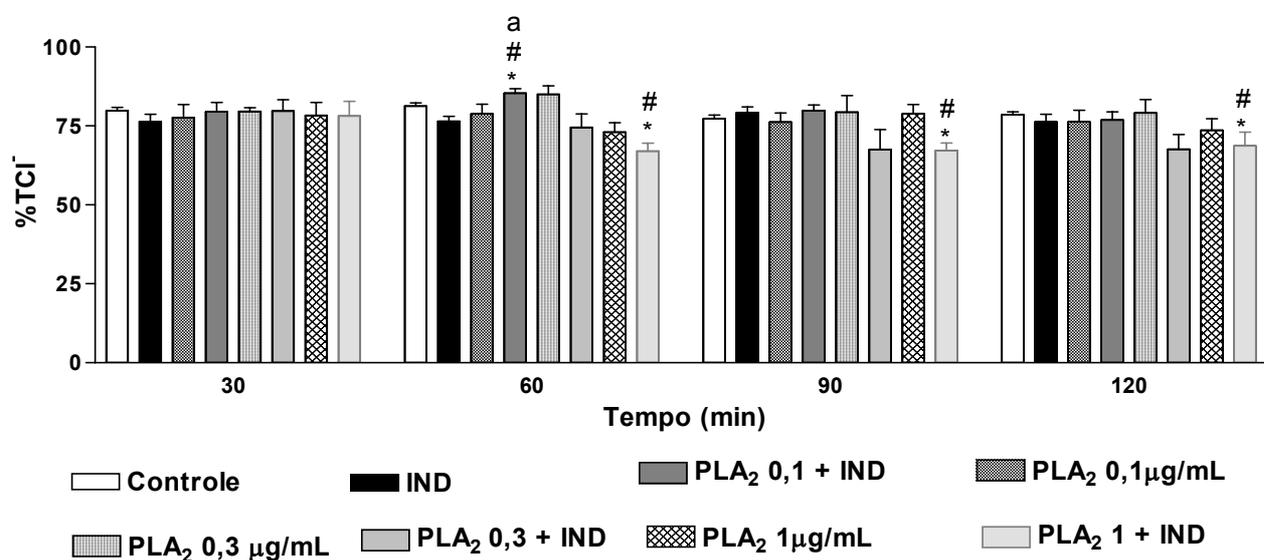


Figura 55. Efeitos da indometacina (10 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,1 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,3 μ g/mL) e indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (1 μ g/mL) no transporte tubular de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

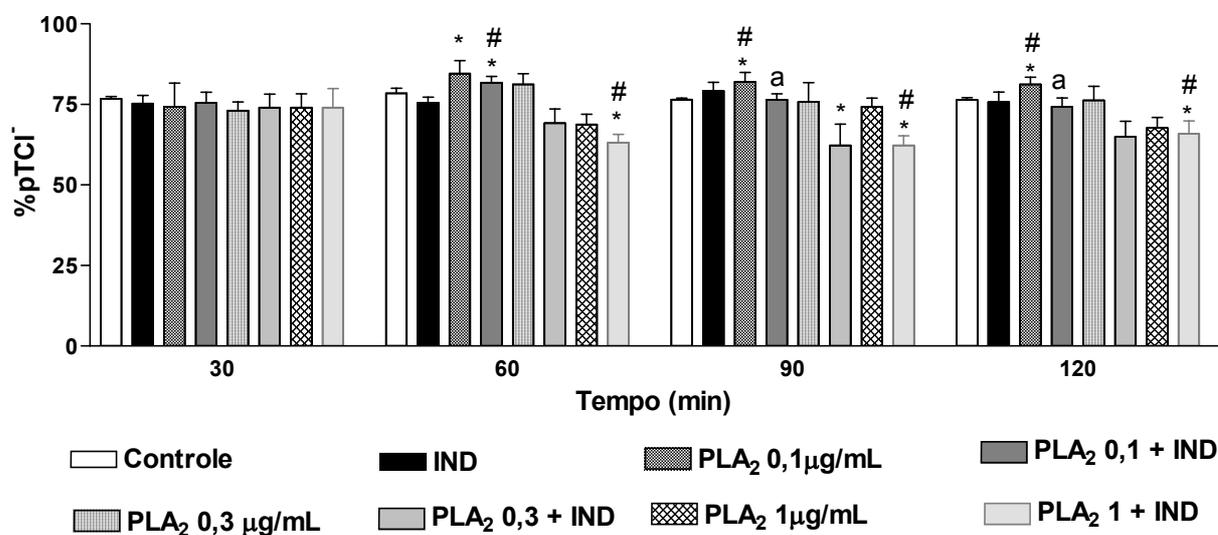


Figura 56. Efeitos da indometacina (10µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,1µg/mL), indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (0,3µg/mL) e indometacina (1µg/mL) + PLA₂ (1µg/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

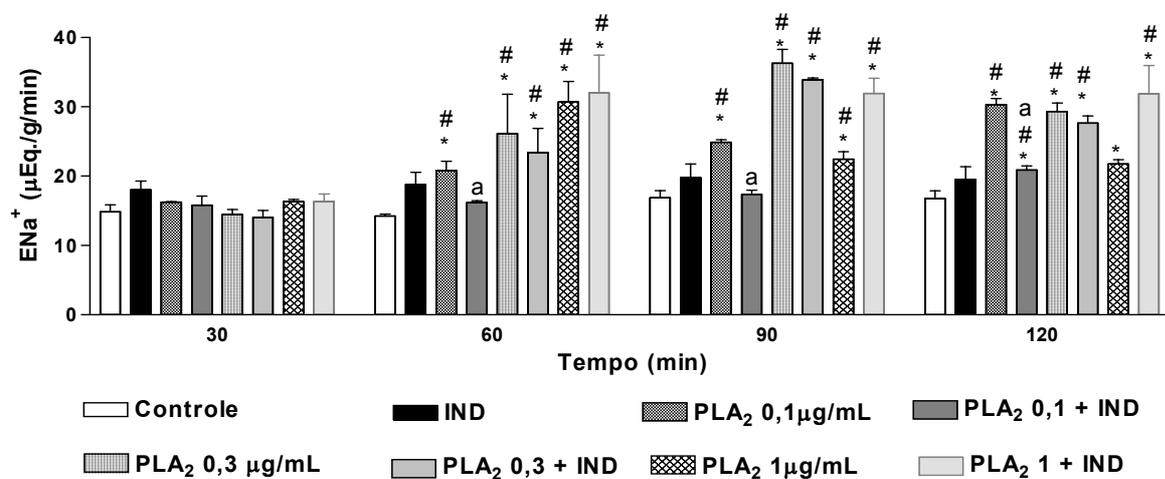


Figura 57. Efeitos da indometacina (10 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,1 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,3 μ g/mL) e indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (1 μ g/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

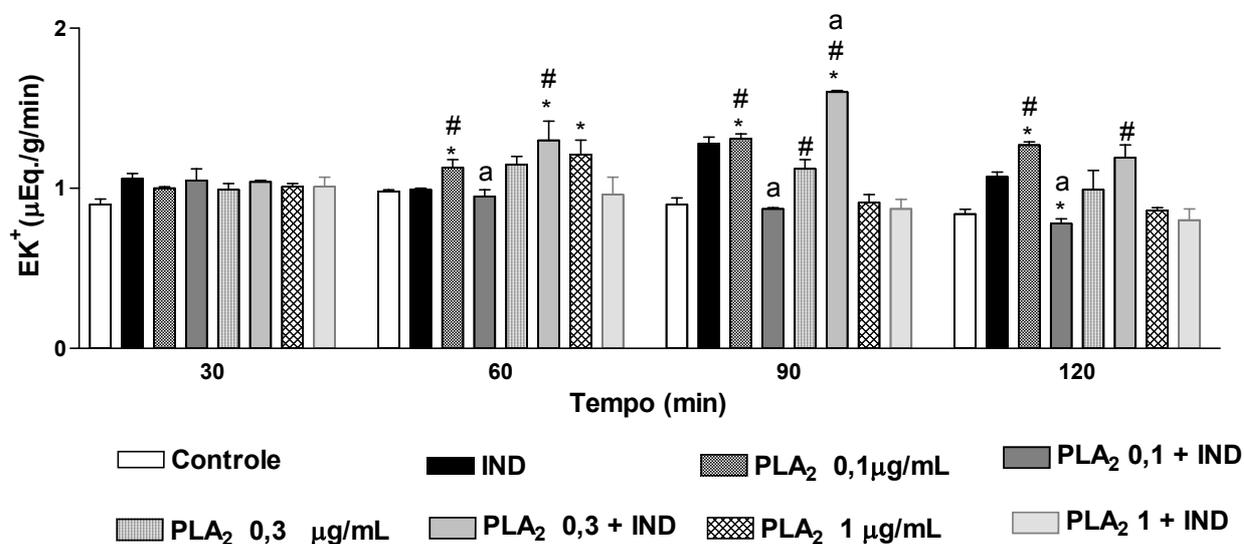


Figura 58. Efeitos da indometacina (10 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,1 μ g/mL), indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (0,3 μ g/mL) e indometacina (1 μ g/mL) + PLA₂ (1 μ g/mL) na excreção de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

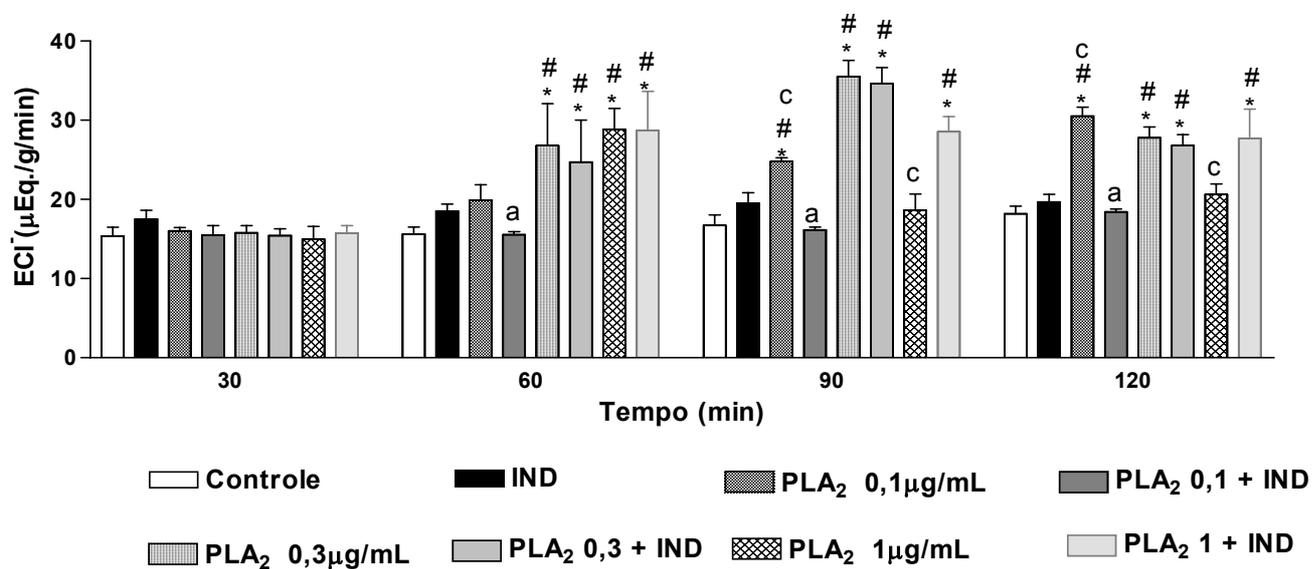


Figura 59. Efeitos da indometacina (10μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,1μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,3μg/mL) e indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (1μg/mL) na excreção de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

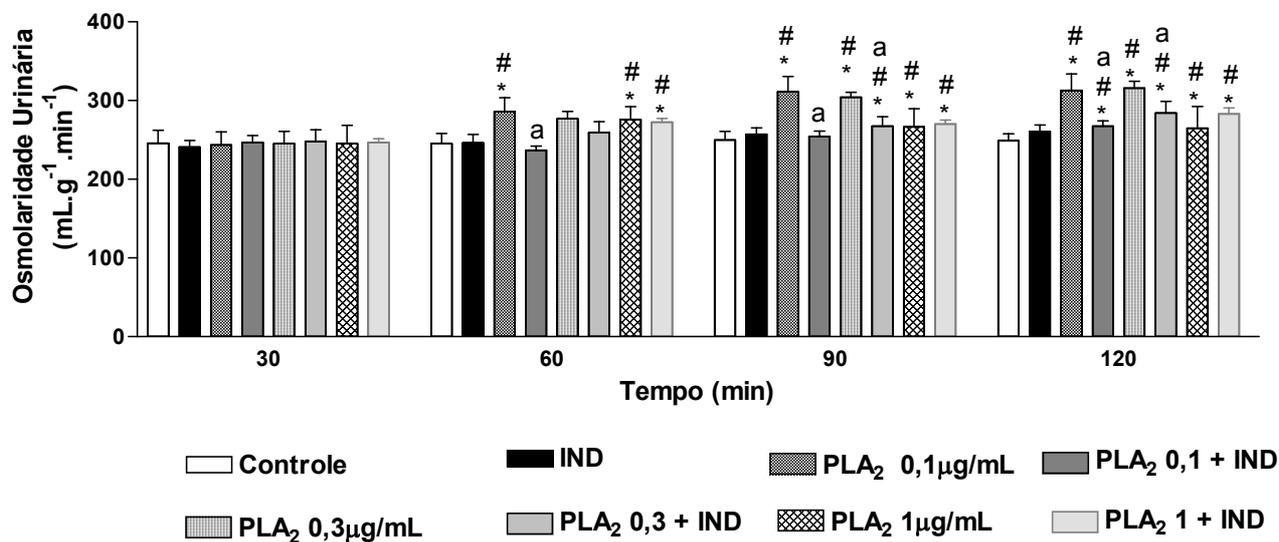


Figura 60. Efeitos da indometacina (10μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,1μg/mL), indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (0,3μg/mL) e indometacina (1μg/mL) + PLA₂ (1μg/mL) na osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = Indometacina.

Tabela 10

Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com indometacina

Tempo (min)	Controle (%)	IND	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + IND	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + IND	PLA2 1 µg/mL	PLA2 1 + IND
30	5,34 ± 0,31	6,03 ± 0,26	5,37 ± 0,23	5,25 ± 0,22	5,31 ± 0,64	5,14 ± 0,07	5,34 ± 0,55	5,14 ± 0,50
60	4,54 ± 0,16	5,69 ± 0,33	2,57 ± 0,20*#	4,72 ± 0,18 a	2,32 ± 0,34*#	4,36 ± 0,97a	3,27 ± 0,55	5,94 ± 1,06
90	4,96 ± 0,20	4,60 ± 0,35	2,46 ± 0,10*#	4,80 ± 0,31a	2,17 ± 0,15*#	3,14 ± 0,47*	3,18 ± 0,18*#	7,45 ± 1,33 a
120	4,80 ± 0,12	5,35 ± 0,73	2,59 ± 0,21*#	4,03 ± 0,39 a*	2,02 ± 0,38*#	1,14 ± 0,33*#	4,29 ± 0,56	4,67 ± 0,47

%dTNa⁺ = (dTNa⁺ X 100) / TNa⁺, onde: TNa⁺ = Sódio tubular transportado (Sódio filtrado e não excretado excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = indometacina

Tabela 11

Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com indometacina

Tempo (min)	Controle (%)	IND	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + IND	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + IND	PLA2 1 µg/mL	PLA2 1 + IND
30	6,24 ± 0,36	7,97 ± 0,41	6,13 ± 0,68	6,22 ± 0,75	6,05 ± 0,86	6,34 ± 0,40	6,20 ± 0,25	6,10 ± 1,27
60	6,07 ± 0,41	7,61 ± 0,50	3,68 ± 0,23	5,40 ± 1,06	3,64 ± 0,65*	5,56 ± 0,50	5,75 ± 0,06	2,58 ± 0,48a*#
90	5,70 ± 0,92	6,50 ± 0,37	3,83 ± 0,28*#	2,99 ± 0,23*#	3,10 ± 0,18*#	6,78 ± 1,32	5,66 ± 0,06	3,06 ± 0,74a
120	6,07 ± 0,63	8,17 ± 1,40	2,94 ± 0,38*	3,32 ± 0,42*#	2,68 ± 0,51*#	3,83 ± 2,05	5,20 ± 0,15 *	1,68 ± 0,17a*#

%dTK⁺ = (dTK⁺ X 100) / TK⁺, onde: TK⁺ = Potássio tubular transportado (Potássio filtrado e não excretado excretado). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = indometacina

Tabela 12

Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com indometacina

Tempo (min)	Controle (%)	IND	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + IND	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + IND	PLA2 1 µg/mL	PLA2 1 + IND
30	4,00 ± 0,23	5,15 ± 0,27	4,00 ± 0,18	4,25 ± 0,17	4,02 ± 0,52	4,06 ± 0,29	4,05 ± 0,07	4,03 ± 0,39
60	3,40 ± 0,24	5,87 ± 0,33	3,25 ± 0,45	3,74 ± 0,15	1,73 ± 0,25*#	3,78 ± 0,24a	2,85 ± 0,55	4,69 ± 0,86
90	3,69 ± 0,15	4,75 ± 0,35	2,57 ± 0,12*#	3,83 ± 0,25a	1,65 ± 0,10*#	5,04 ± 0,90a	2,60 ± 0,15	5,93 ± 1,11a
120	3,48 ± 0,09	5,64 ± 0,79	2,63 ± 0,05*#	3,21 ± 0,32*a	1,50 ± 0,28*#	3,48 ± 2,15	3,70 ± 0,59	3,69 ± 0,41

%dTCI⁻ = (dTCI⁻ X 100) / TCI⁻, onde: TCI⁻ = Cloreto tubular transportado (Cloreto filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. IND = indometacina

5.7 Estudo da participação da endotelina nos efeitos renais da Fosfolipase A₂ de *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado

Com o objetivo de investigar a participação da endotelina na ação renal desta PLA₂ realizou-se o bloqueio com tezosentan (TZ – antagonista dos receptores de endotelina, 3µg/mL) .

Após avaliação dos efeitos da PLA₂ do extrato bruto de *B. caissarum* em três diferentes concentrações observou-se que nenhuma destas apresentou efeito expressivo diante das demais, optando-se por realizar bloqueio das duas menores concentrações.

Tezosentan foi adicionado aos 30 minutos de experimento para realização do grupo controle. Nos experimentos para avaliação do bloqueio, o TZN foi adicionado no início do experimento (tempo=0) e PLA₂ foi adicionada aos 30 minutos, de um experimento com duração total de 120 minutos. Tezosentan sozinho não alterou nenhum parâmetro entre os avaliados na hemodinâmica renal.

Com relação à PLA₂ na concentração de 0,3µg/mL o tezosentan bloqueou a elevação do fluxo urinário aos 90 e 120 minutos (figura 63) e ritmo de filtração glomerular aos 60, 90 e 120 minutos (figura 64). As elevações dos transportes proximal de sódio e total de cloreto foram bloqueados aos 120 minutos (figuras 66 e 69, respectivamente). Ocorreu bloqueio dos efeitos da PLA₂ sobre as excreções de sódio e potássio aos 90 e 120 minutos (figura 71 e 72) e cloreto aos 60, 90 e 120 minutos (figura 73). A elevação da osmolaridade urinária foi bloqueada aos 90 e 120 minutos (figura 74) e os transportes distais de sódio e cloreto aos 60, 90 e 120 minutos (tabelas 13 e 15).

Esta concentração não bloqueou o efeito da PLA₂ sobre pressão de perfusão (figura 61), resistência vascular renal (figura 62), transportes totais de sódio (figura 65) e potássio (figura 67), proximais de potássio (figura 68) e cloreto (figura 70) e distal de potássio (tabela 14).

Na concentração menor (0,1µg/mL) ocorreu bloqueio da elevação do ritmo de filtração glomerular aos 90 e 120 minutos (figura 64), transporte tubular total de

sódio aos 90 e 120 minutos (figura 66) e cloreto aos 60, 90 e 120 minutos (figura 70). O TZN bloqueou a elevação da excreção de sódio e cloreto aos 90 e 120 minutos (figuras 71 e 73) (figuras 71 e 73) e osmolaridade urinária aos 60, 90 e 120 minutos (figura 74).

Esta concentração não bloqueou o efeito da PLA_2 sobre a pressão de perfusão (figura 61), resistência vascular renal (figura 62), fluxo urinário (figura 63), transportes totais de sódio (figura 65), potássio (figura 67) e cloreto (figura 69), proximal de potássio (figura 68), excreção de potássio (figura 72) e distal de sódio, potássio e cloreto (tabelas 13-15).

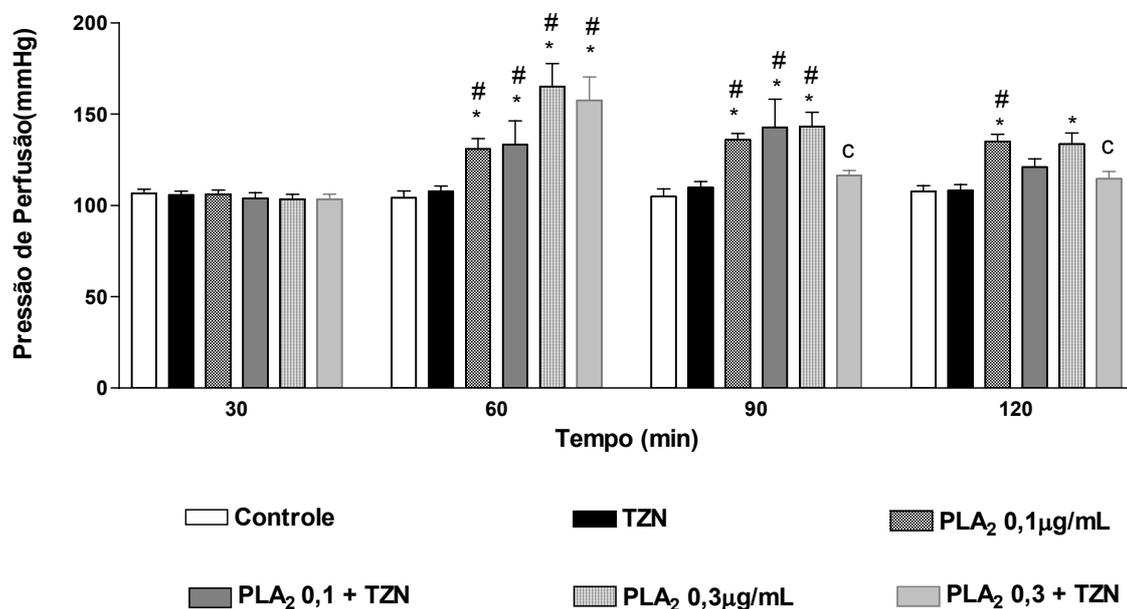


Figura 61. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) na pressão de perfusão, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. ^csignificância com relação ao mesmo grupo no tempo 60 minutos. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

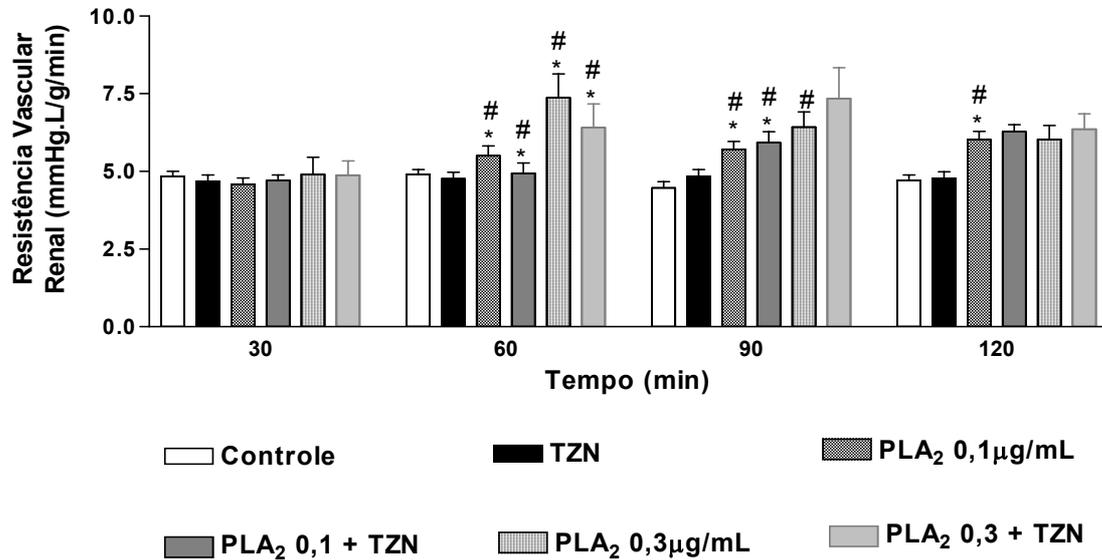


Figura 62. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) na resistência vascular renal, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. ^csignificância com relação ao mesmo grupo no tempo 60 minutos. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

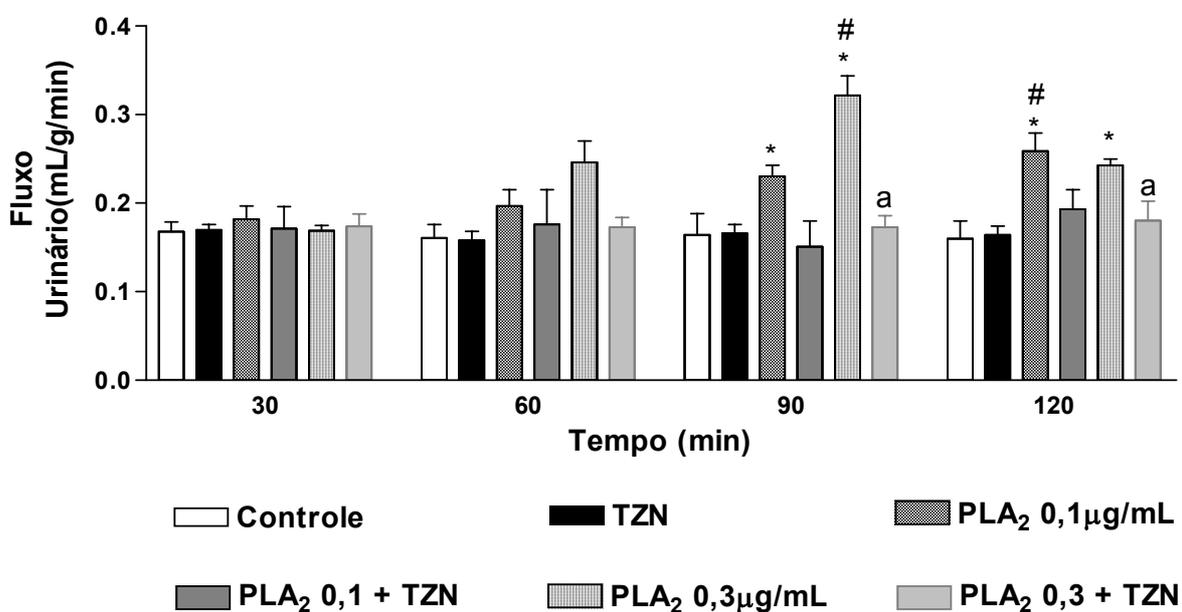


Figura 63. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no fluxo urinário, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

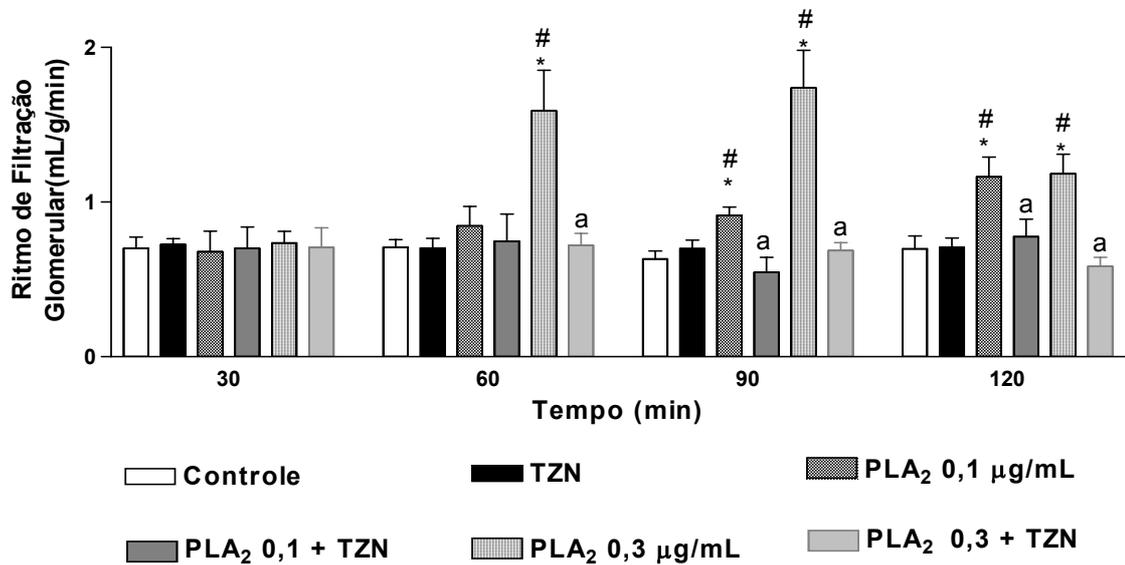


Figura 64. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no ritmo de filtração glomerular, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

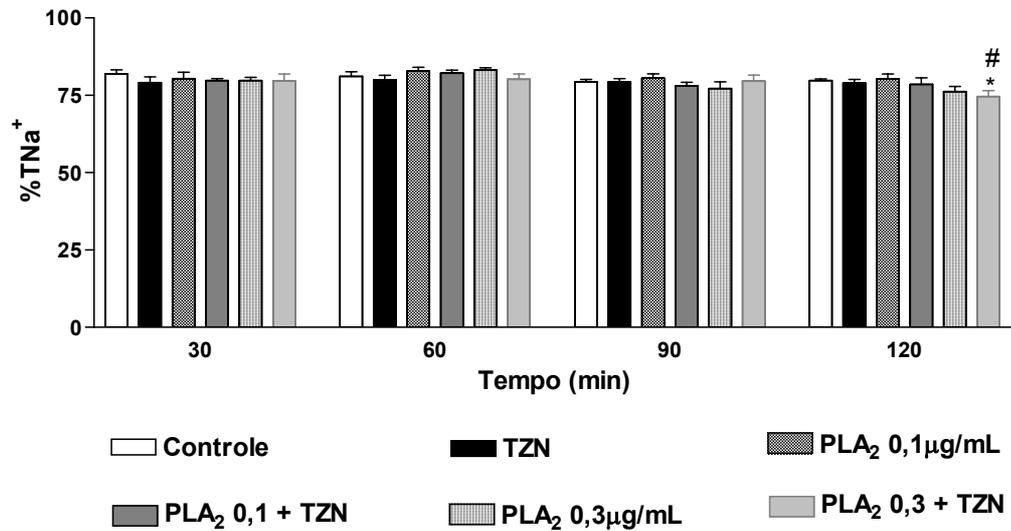


Figura 65. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no transporte tubular total de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

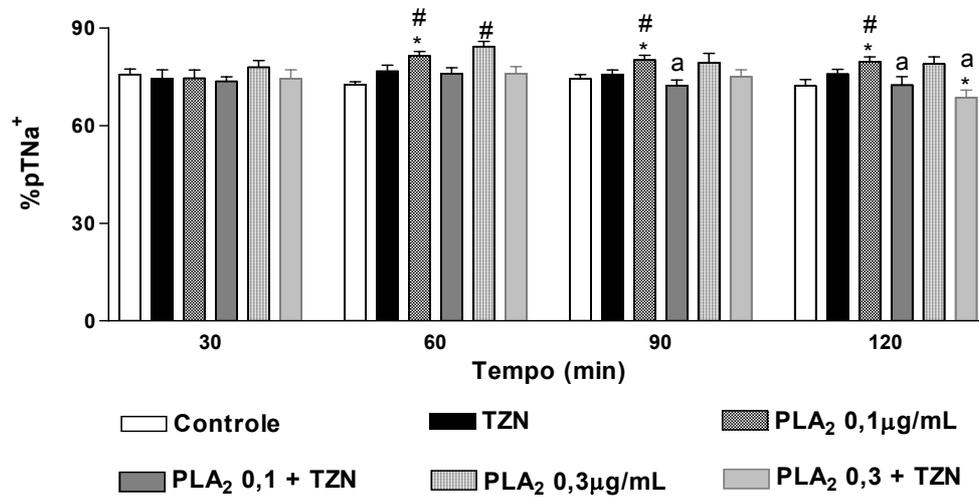


Figura 66. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

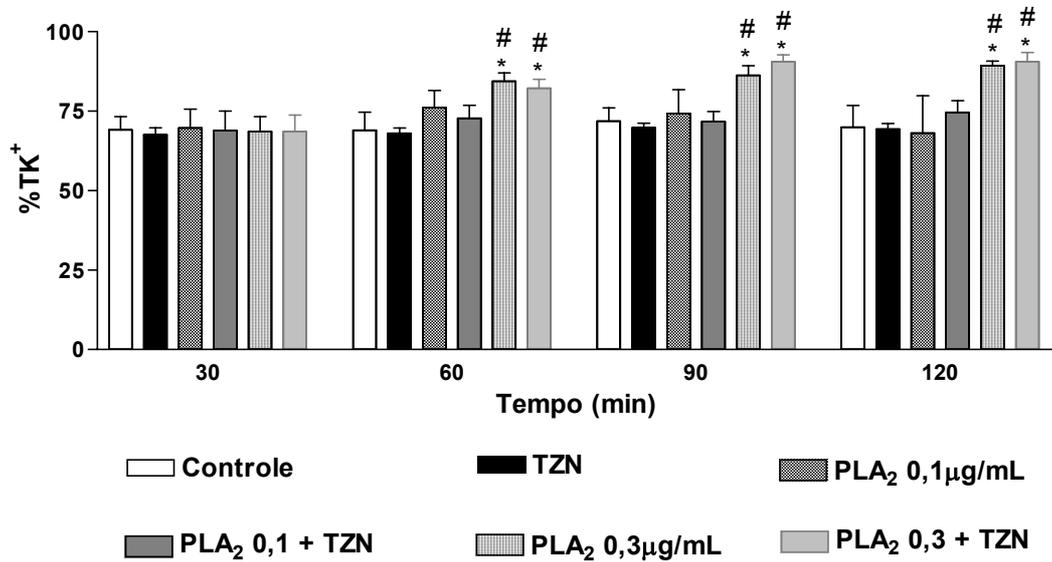


Figura 67. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no transporte tubular total de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

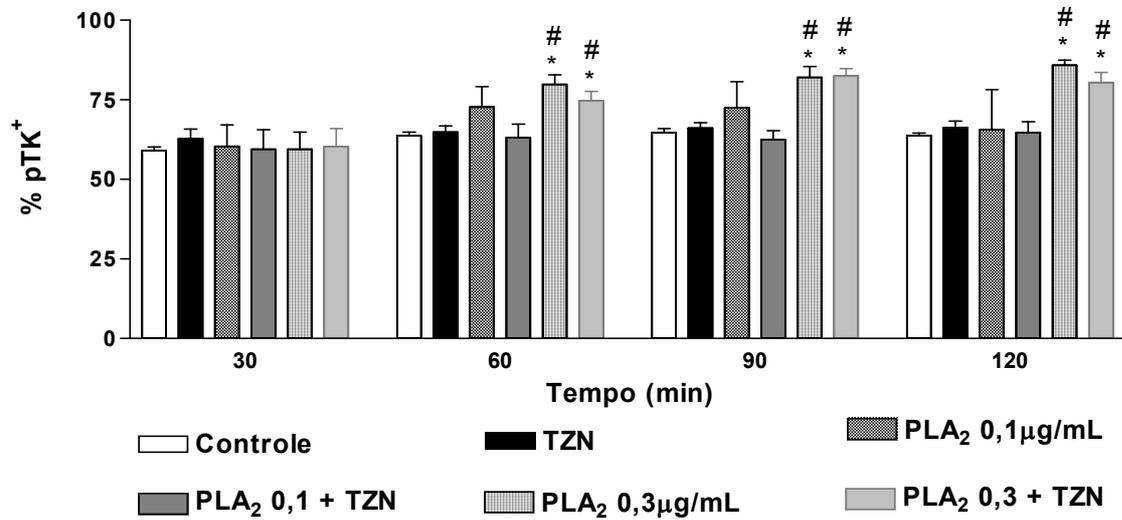


Figura 68. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

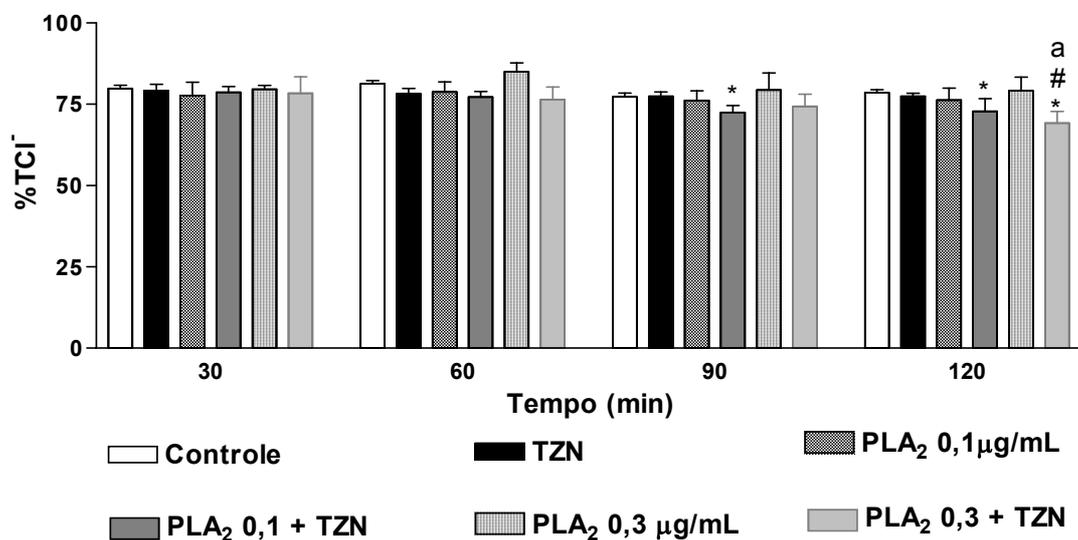


Figura 69. Efeitos do Tezosentan ($3\mu\text{g}/\text{mL}$), Tezosentan ($3\mu\text{g}/\text{mL}$)+ PLA_2 ($0,1\mu\text{g}/\text{mL}$) e Tezosentan ($3\mu\text{g}/\text{mL}$)+ PLA_2 ($0,3\mu\text{g}/\text{mL}$) no transporte tubular total de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA_2 no mesmo período de tempo. PLA_2 = Fosfolipase A_2 . TZN = Tezosentan.

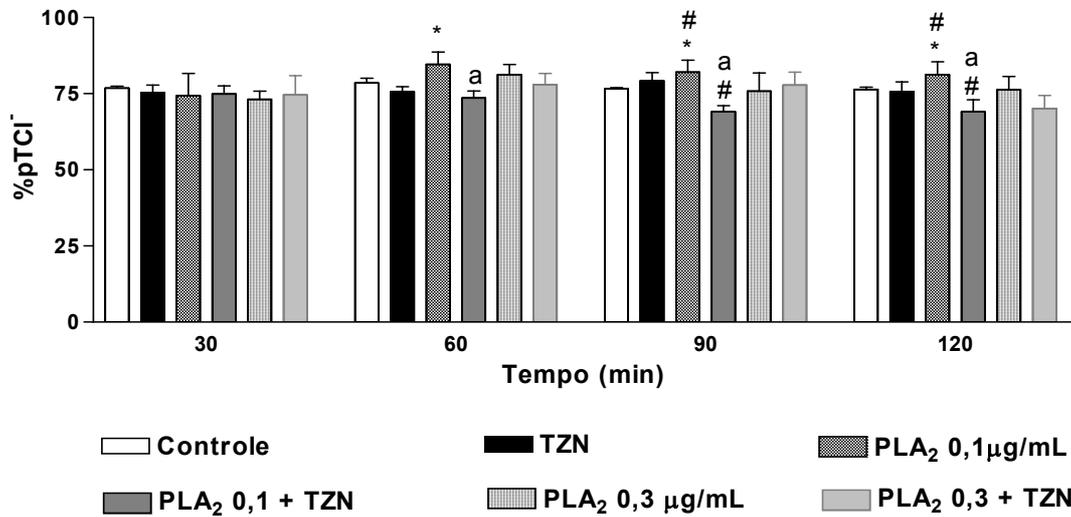


Figura 70. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) no transporte tubular proximal de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

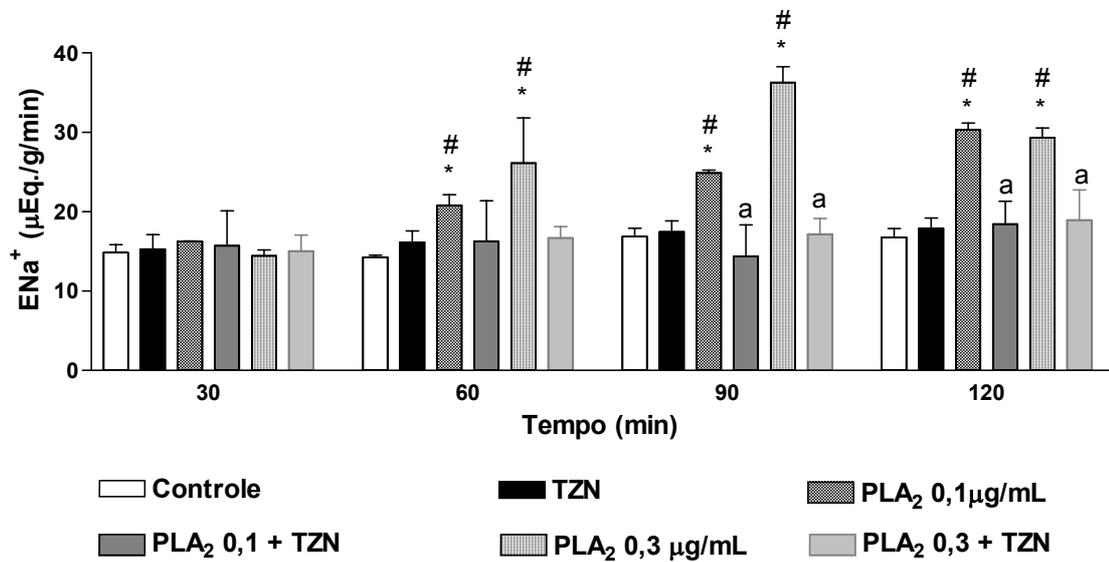


Figura 71. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) na excreção de sódio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

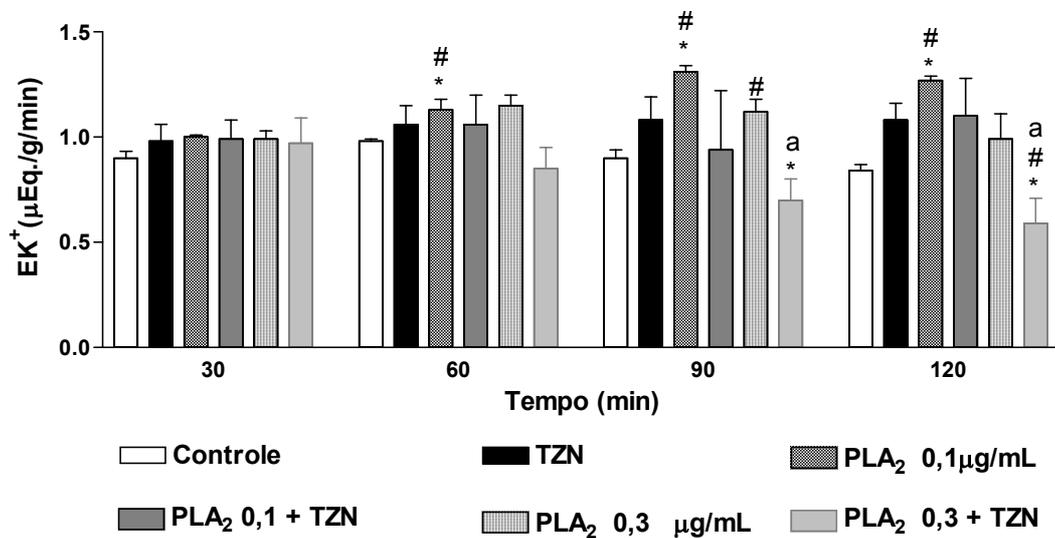


Figura 72. Efeitos do Tezosentan (3μg/mL), Tezosentan (3μg/mL)+ PLA₂ (0,1μg/mL) e Tezosentan (3μg/mL)+ PLA₂ (0,3μg/mL) na excreção de potássio, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

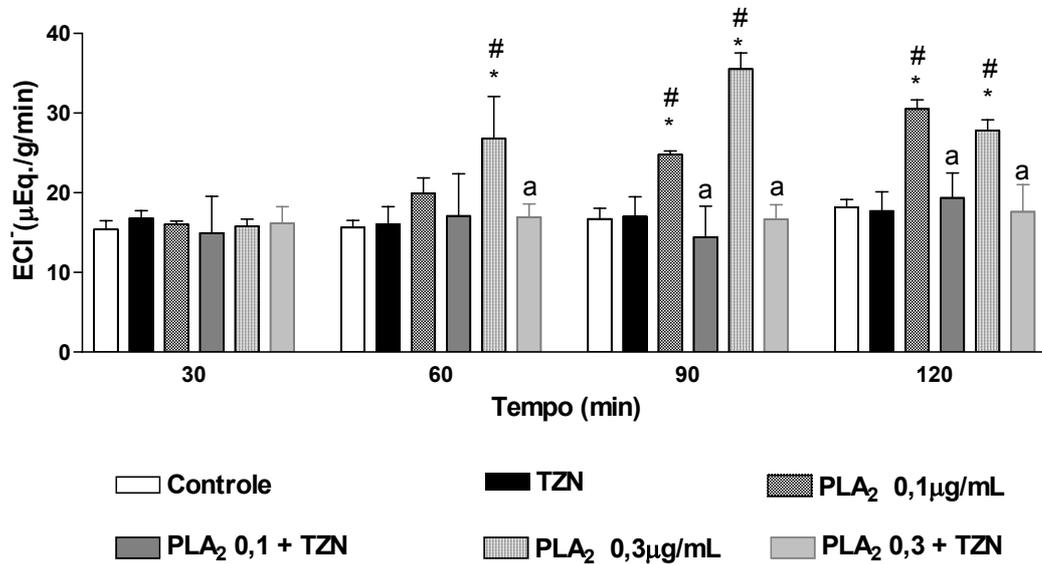


Figura 73. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) na excreção de cloreto, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

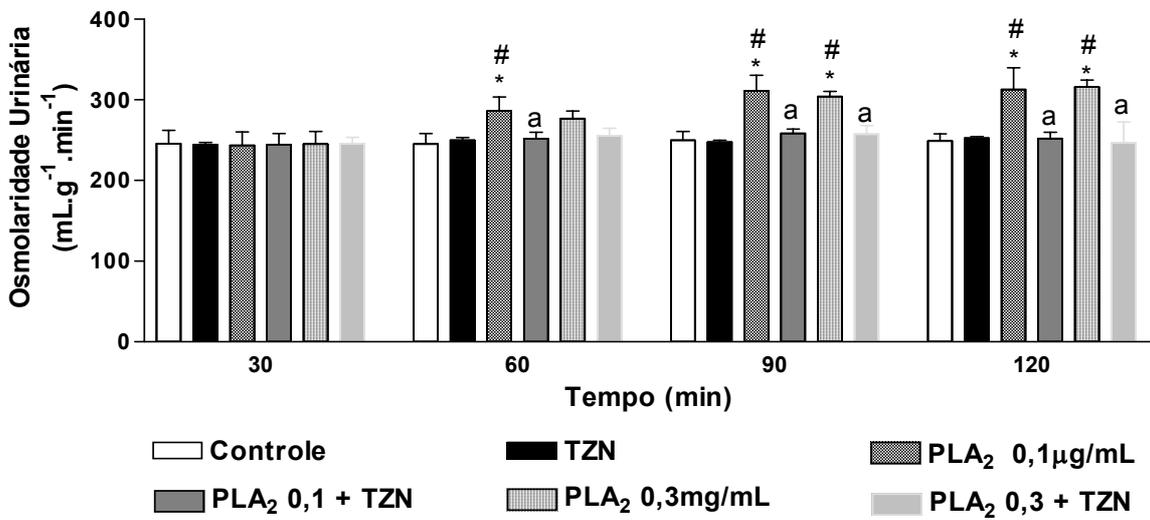


Figura 74. Efeitos do Tezosentan (3µg/mL), Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,1µg/mL) e Tezosentan (3µg/mL)+ PLA₂ (0,3µg/mL) sobre a osmolaridade urinária, em rim isolado de ratos. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^abloqueio do efeito da PLA₂ no mesmo período de tempo. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

Tabela 13

Percentual de transporte distal de sódio (%dTNa⁺) com relação ao sódio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com tezosentan

Tempo (min)	Controle (%)	TZN	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + TZN	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + TZN
30	5,34 ± 0,31	4,42 ± 0,45	5,37 ± 0,23	5,34 ± 0,71	5,31 ± 0,64	5,41 ± 0,48
60	4,54 ± 0,16	4,39 ± 0,20	2,57 ± 0,20*#	4,48 ± 0,72	2,32 ± 0,34*#	3,96 ± 0,35 ^a
90	4,96 ± 0,20	4,58 ± 0,52	2,46 ± 0,10*#	4,09 ± 0,89	2,17 ± 0,15*#	4,23 ± 0,24 ^a
120	4,80 ± 0,12	3,77 ± 0,17	2,59 ± 0,21*#	4,84 ± 1,23	2,02 ± 0,38*#	6,53 ± 0,44 ^{a#}

%dTNa⁺ = (dTNa⁺ X 100) / TNa⁺, onde: TNa⁺ = Sódio tubular transportado (Sódio filtrado e não excretado excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). #Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan

Tabela 14

Percentual de transporte distal de potássio (%dTK⁺) com relação ao potássio tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com tezosentan

Tempo (min)	Controle (%)	TZN	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + TZN	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + TZN
30	6,24 ± 0,36	6,40 ± 0,62	6,13 ± 0,68	6,29 ± 0,77	6,05 ± 0,86	6,39 ± 0,47
60	6,07 ± 0,41	6,54 ± 0,36	3,68 ± 0,23	4,56 ± 0,90	3,64 ± 0,65*	3,55 ± 0,49* [#]
90	5,70 ± 0,92	6,54 ± 0,75	3,83 ± 0,28 [#]	3,82 ± 1,70	3,10 ± 0,18 [#]	3,39 ± 0,23 [#]
120	6,07 ± 0,63	5,31 ± 0,22	2,94 ± 0,38*	4,30 ± 1,24	2,68 ± 0,51 [#]	5,03 ± 0,43

%dTK⁺ = (dTK⁺ X 100) / TK⁺, onde: TK⁺ = Potássio tubular transportado (Potássio filtrado e não excretado excretado). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. *Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^ªBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan

Tabela 15

Percentual de transporte distal de cloreto (%dTCI⁻) com relação ao cloreto tubular transportado em perfusão de rim isolado de ratos tratados com PLA₂ de *Bunodosoma caissarum* e bloqueio com tezosentan

Tempo (min)	Controle (%)	TZN	PLA2 0,1 µg/mL	PLA2 0,1 + TZN	PLA2 0,3 µg/mL	PLA2 0,3 + TZN
30	4,00 ± 0,23	3,80 ± 0,38	4,00 ± 0,18	4,06 ± 0,53	4,02 ± 0,52	4,13 ± 0,35
60	3,40 ± 0,24	3,79 ± 0,17	3,25 ± 0,45	3,60 ± 0,60	1,73 ± 0,25 [#]	2,90 ± 0,26 ^{a*}
90	3,69 ± 0,15	3,98 ± 0,46	2,57 ± 0,12 ^{*#}	3,30 ± 0,74	1,65 ± 0,10 ^{*#}	3,06 ± 0,17 ^{a*}
120	3,48 ± 0,09	3,27 ± 0,15	2,63 ± 0,05 ^{*#}	3,95 ± 1,06	1,50 ± 0,28 ^{*#}	4,82 ± 0,30 ^{a*}

%dTCI⁻ = (dTCI⁻ X 100) / TCI⁻, onde: TCI⁻ = Cloreto tubular transportado (Cloreto filtrado e não excretado – valor absoluto). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de = Bonferroni) e teste t de Student, considerando p<0,05. ^{*}Comparação entre os diferentes tempos 60, 90 e 120 e o controle interno do grupo (tempo 30). [#]Comparação com controle externo na mesma faixa de tempo. ^aBloqueio do efeito da PLA₂ na mesma concentração. PLA₂= Fosfolipase A₂. TZN = Tezosentan.

5.8 Estudo da expressão gênica da adenosina, renina, TNF- α e interleucina 1 β (IL1 β) em rins perfundidos com Fosfolipase A₂ de *B. caissarum* (0,1 μ g/mL)

Os resultados foram expressos em relação ao gene 18S rRNA (Controle). Observou-se aumento significativo da expressão relativa de TNF α (C = 1,00 \pm 0,00 vs. PLA₂ = 1,116 \pm 0,033*, com p<0,0001 – **Figura 75**) e do receptor de adenosina A2a (C = 1,0 \pm 0,01 vs. PLA₂ = 1,238 \pm 0,043*, com p<0,0001 – **Figura 76**). Entretanto não houve diferença estatística nos resultados encontrados para os demais genes estudados (renina, IL-1 β , Receptores A1, A2b e A3).

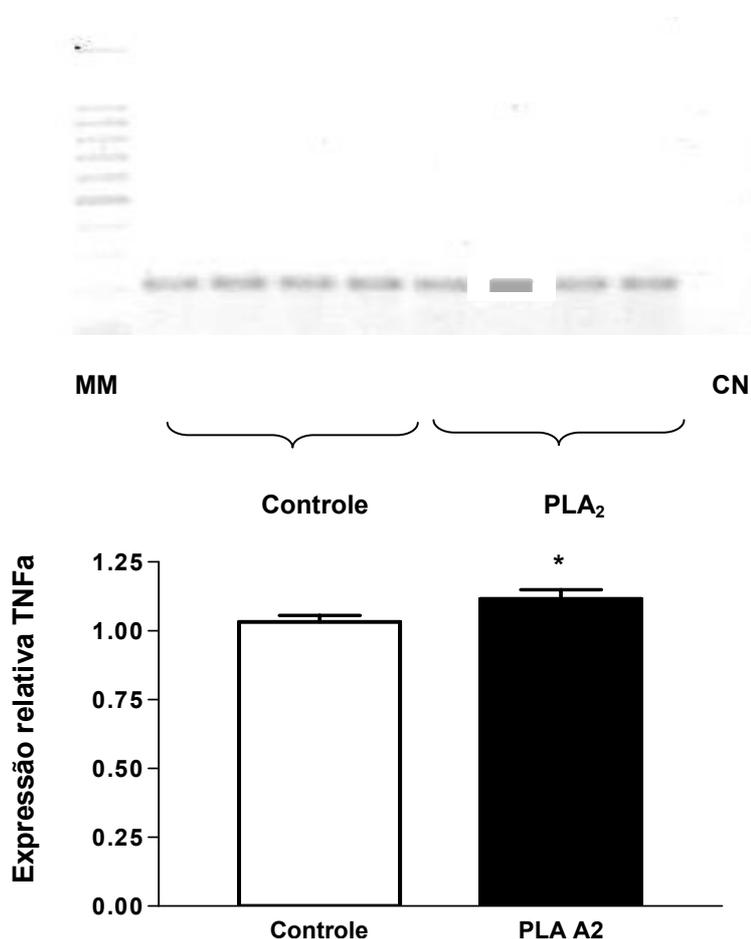


Figura 75. Expressão relativa de TNF α em rins perfundidos com solução de Krebs Henseleit (controle) ou tratados com a fosfolipase A₂ (PLA₂) isolada da anêmona marinha *B. caissarum*. Análise estatística foi realizada pelo teste t de Student, considerando p<0,05. * p<0,05 com relação ao controle. MM = Massa molecular. CN = Controle negativo.

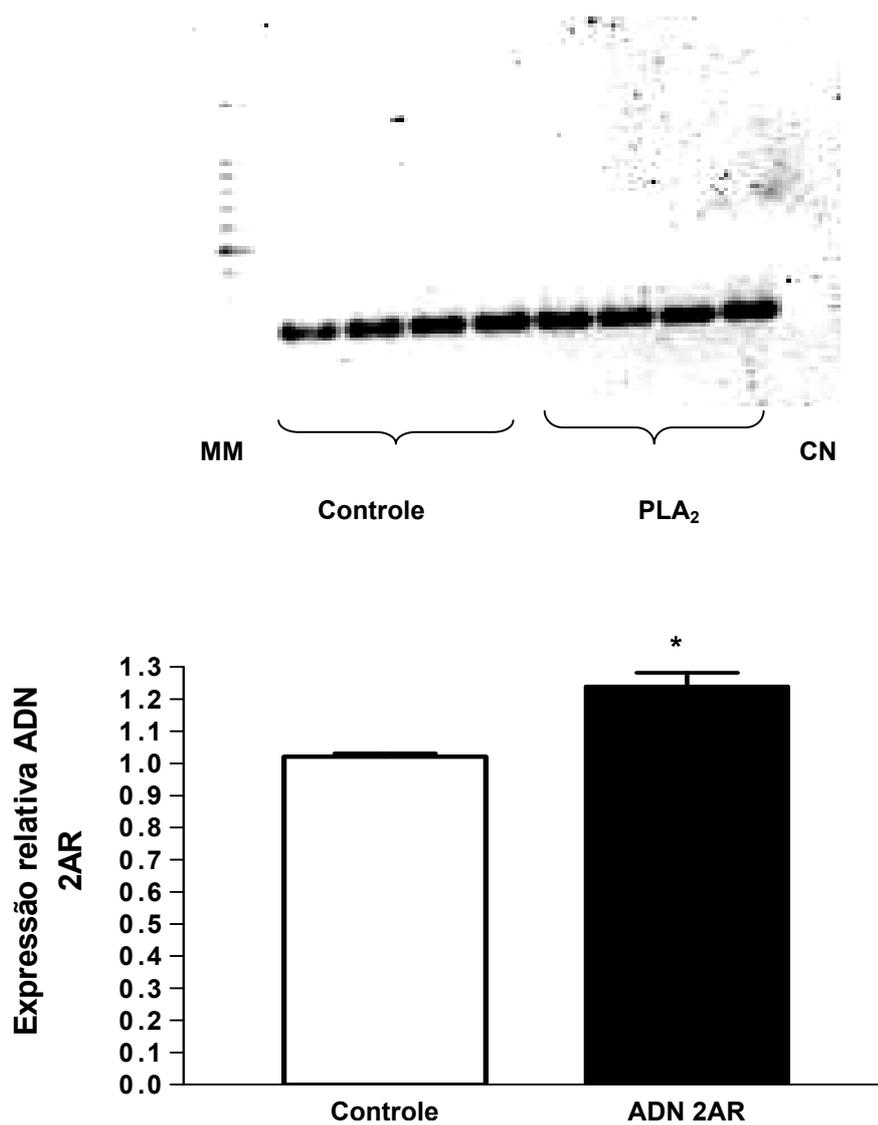


Figura 76. Expressão relativa do receptor A_{2a} de adenosina em rins perfundidos com solução de Krebs Henseleit (controle) ou tratados com a fosfolipase A₂ (PLA₂) isolada da anêmona marinha *B. caissarum*. Análise estatística foi realizada pelo teste t de Student, considerando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ com relação ao controle. MM = Massa molecular. CN = Controle negativo.

5.9 Resumos dos principais efeitos causados pela presença do extrato bruto e da PLA2 da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* em perfusão de rim isolado.

Quadro 2. Resumo dos efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com Indometacina e tezosentan

↑ - aumento do efeito; ↓ - diminuição do efeito; a – bloqueio do efeito de BcE. BcE – Extrato bruto de *B. caissarum*.

Grupo	PP	RVR	FU	RFG	TNa ⁺	pTNa ⁺	TK ⁺	pTK ⁺	TCI ⁻	pTCI ⁻	ENa ⁺	EK ⁺	ECI ⁻	UOSM	dTNa ⁺	dTK ⁺	dCI ⁻
BcE (1µg/mL)	↑	↑		↓								↓		↑			
BcE (3µg/mL)	↑	↑	↑	↑					↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
BcE (10µg/mL)	↑	↑	↑	↑							↑	↑	↑	↑			
BcE (3 µg/mL) + IND (10µg/mL)	↑ a	↑ a	↓ a	↓ a			↑	↑		a	↓a	↓a	a	a	a	a	a
BcE (3 µg/mL) + TZN (3µg/mL)	↑ a	↑ a	↑ a						a	a	↑a	↑a	↑a	↑	↓		↓

Quadro 3. Resumo dos efeitos da PLA₂ de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com indometacina

↑ - aumento do efeito; ↓ - diminuição do efeito; **a** – bloqueio do efeito de PLA₂. PLA₂ – Fosfolipase A₂. IND - Indometacina

Grupo	PP	RVR	FU	RFG	TNa ⁺	pTNa ⁺	TK ⁺	pTK ⁺	TCI ⁻	pTCI ⁻	ENa ⁺	EK ⁺	ECI ⁻	UOSM	dTNa ⁺	dTK ⁺	dCI ⁻
PLA ₂ (0,1µg/mL)	↑	↑	↑	↑		↑				↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
PLA ₂ (0,3µg/mL)	↑	↑	↑	↑			↑	↑			↑		↑	↑	↓	↓	↓
PLA ₂ (1µg/mL)	↑	↑	↑	↑			↑	↑			↑	↑	↑	↑	↓	↓	
PLA ₂ (0,1µg/mL) + IND (10µg/mL)	↑ a	↑	a	a	↑	↑ a	↑	↑	↑	↑ a	↑ a	↓ a	a	↑ a	↓ a	↓	↓ a
PLA ₂ (0,3µg/mL) + IND (10µg/mL)	↑	↑	↑	a	↓		a			↓	↑	↑	↑	↑ a	↓ a		a
PLA ₂ (1µg/mL) + IND (10µg/mL)	↑	↑	↑		↓		↑	↑		↓	↑		↑	↑	a	↓ a	

Quadro 4. Resumo dos efeitos da PLA₂ de *B. caissarum* em perfusão de rim isolado e bloqueios com Tezosentan

↑ - aumento do efeito; ↓ - diminuição do efeito; a – bloqueio do efeito de PLA₂. PLA₂ – Fosfolipase A₂. IND – Indometacina

Grupo	PP	RVR	FU	RFG	TNa ⁺	pTNa ⁺	TK ⁺	pT K ⁺	TCI ⁻	pTCI ⁻	ENa ⁺	EK ⁺	ECI ⁻	UOSM	dTNa ⁺	dTK ⁺	dCI ⁻
PLA ₂ (0,1µg/mL) + TZN (3µg/mL)	↑	↑		a		a			↓	↓ a	a		a	a			
PLA ₂ (0,3µg/mL) + TZN (3µg/mL)	↑	↑	a	a	↓	↓ a	↑	↑	↓ a		a	↓ a	a	a	↑ a	↑	↑ a

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Extrato Bruto de *B. Caissarum*

Estudos prévios têm descrito diversos efeitos das anêmonas marinhas, como atividade hemolítica (Bernheimer and Avigad, 1976; Mebs and Gebauer, 1980; Macek and Lebez, 1981; Mebs et al., 1983; Monroy-Estrada et al., 2006), cardíaca (Bunc et al., 1999; Galettis and Norton, 1990) e neurotóxica (Wang et al., 2004; Lagos et al., 2001; Kawai et al., 2004; Fogh et al., 1990).

Diversos venenos isolados de outros animais, como serpentes (Havt et al., 2001; Martins et al., 1998, 2002; Barbosa et al., 2002, 2005), algas (Nobre et al., 2001), peixes (Facó et al., 2003), plantas (Havt et al., 2003) e escorpiões (Alves, et al., 2005), afetam a hemodinâmica renal em perfusão de rim isolado, o que já foi demonstrado em nosso grupo através dos trabalhos citados.

Mizuno et al. (2007) mostraram que o veneno da anêmona marinha *Phyllodiscus semoni* induz várias injúrias renais após injeção intravenosa em ratos. Este efeito parece se caracterizar por anormalidades glomerulares, com severo dano no endotélio glomerular e alterações patológicas, incluindo mesangiólise e lesão do epitélio glomerular, com extensiva lesão no epitélio tubular e necrose epitelial tubular do córtex para a medula, além de necrose tubular renal.

O extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* causou intensas alterações renais, com elevação da pressão de perfusão, resistência vascular renal e fluxo urinário nas três concentrações estudadas. Foram observadas disparidades entre os efeitos das três

concentrações, com diminuição do ritmo de filtração e excreção de potássio na menor concentração, enquanto as demais promoveram elevação destes parâmetros.

As excreções de sódio, potássio e cloreto foram elevadas pelas concentrações de 3µg/mL e 10µg/mL. Na concentração de 3µg/mL houve diminuição dos transportes totais e proximal de cloreto, assim como no transporte total de sódio com relação ao controle externo. Esta concentração também promoveu diminuição dos transportes distais de sódio, potássio e cloreto, o que pode ter contribuído para o aumento na excreção destes eletrólitos. A concentração de 10µg/mL promoveu alterações discretas no transporte total de potássio quando comparado ao controle externo e, mesmo sem alterar os transportes distais de sódio, potássio e cloreto, esta concentração promoveu aumento na excreção destes eletrólitos comparável a concentração de 3µg/mL, o que pode ser justificar pelo aumento na filtração glomerular destes íons na concentração de 10µg/mL, que promoveu um aumento no ritmo de filtração glomerular superior a concentração de 3µg/mL.

A pressão de perfusão e a resistência vascular periférica foram alteradas pelas três concentrações estudadas, todavia a elevação destes parâmetros foi mais evidenciada na concentração de 3µg/mL, que utilizamos nos experimentos com leito vascular mesentérico com a finalidade de verificar a ação vascular deste extrato. Todavia conforme os resultados obtidos ficou evidente que o extrato bruto de *B. caissarum* não exerce efeitos diretos em vasos de resistência e que a elevação de pressão de perfusão e resistência vascular periférica podem ocorrer através da liberação de mediadores vasoativos, enfatizando-se a ação indireta deste extrato sobre estes parâmetros.

Indometacina e Tezosentan foram usados para avaliar o possível papel da ciclooxigenase e da endotelina na mediação dos efeitos renais do extrato bruto de *B. caissarum*. Os experimentos com leito vascular mesentérico permitiram observar que o extrato de *B. caissarum* não alterou a pressão de perfusão basal e nem no leito vascular pré-contraído com fenilefrina. Estes resultados enfatizam o que já comentamos sobre a elevação da pressão de perfusão e resistência vascular renal ocorrerem por ação indireta deste extrato na vasculatura. Uma explicação possível é que *B. caissarum* promova a liberação de substâncias sintetizadas pelas células renais, como prostaglandinas, citocinas, bradicinina, frações do complemento, fator de agregação plaquetária (Barraviera *et. al.*, 1995; Facó *et. al.*, 2003) e/ou endotelina (Chen *et. al.*, 2002).

Indometacina inibiu fortemente os efeitos do extrato bruto de *B. caissarum*. Catella-Lawson (1999) mostraram que o uso de indometacina é importante na inibição de ambas as isoformas de COX, causando aumento transitório na retenção de sódio (mediado pela inibição de COX 2) e o declínio da taxa de filtração glomerular (devido a inibição de COX 1). Em nossos experimentos indometacina bloqueou os efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* (3µg/mL) e isoladamente a indometacina promoveu discreta elevação da osmolaridade urinária, todavia mesmo diante deste efeito a indometacina foi eficiente no bloqueio das alterações de Uosm na presença do extrato bruto de *B. caissarum*.

O bloqueio exercido pelo tratamento com indometacina mostrou que as prostaglandinas e os demais derivados da ação da COX parecem exercer um importante papel na mediação dos efeitos do extrato bruto de *B. caissarum* em perfusão

de rim isolado, fato este que não exclui a possibilidade de participação de outros mediadores.

O mecanismo de excreção renal de sódio exercido pelo extrato bruto de *B. caissarum* pode apresentar semelhanças com aquele sugerido por Lopes *et al.* (2004) para bradicinina (BK). Segundo estes autores a bradicinina, através dos receptores específicos (B2), estimula a liberação de uma fosfolipase A₂ BK-induzida, cuja atividade libera ácido araquidônico (AA) dos fosfolipídios de membrana que sofre ação da cicloxigenase e conversão a prostaglandina E₂ (PGE₂), que seria o mediador responsável pelos efeitos inibitórios da bradicina, caracterizados pela inibição da ação da bomba de Na⁺-K⁺/ATPase na membrana basolateral das células tubulares renais. A inibição desta bomba diminui a geração de um gradiente eletroquímico para o sódio na direção luz tubular-interior celular, o que retém sódio na luz tubular e aumenta sua excreção, assim como altera os fenômenos de reabsorção/excreção por simporte, antiporte, fluxo de massa e transportes ativo e passivo de diversas substâncias que dependem deste gradiente gerado pela bomba de Na⁺-K⁺-ATPase basolateral. O aumento da reabsorção de sódio após inibição da síntese de prostaglandinas parece ocorrer, em parte, pela estimulação da bomba de Na⁺-K⁺-ATPase, o que corrobora a veracidade do mecanismo descrito (Lee *et al.*, 2004).

Prostanóides como PGI₂ e PGE₂ parecem também atuar nos transportes de sódio e potássio através do sistema renina-angiotensina, efeito este que se contrapõe aos efeitos citados anteriormente. De fato, o que determina qual efeito estas prostaglandinas assumem na regulação do balanço de sódio (PGE₂) e potássio (PGI₂ e possivelmente PGE₂) parecem ser as condições basais do balanço fisiológico de sódio. Acredita-se que em situações em que a ação do sistema renina-angiotensina está

diminuída ou insuficiente para manter o balanço eletrolítico, o aumento na expressão de COX-2 e síntese de PGs ativa a síntese e liberação de renina, levando ao aumento da atividade de angiotensina II e aldosterona resultando no aumento da reabsorção tubular com restabelecimento da homeostase. Uma vez que isto ocorre, a expressão de COX-2 é reduzida através da inibição por angiotensina II, e a produção e liberação de renina são reduzidas (Harris, 2002).

Os níveis basais de prostaglandinas (principalmente PGI₂ e PGE₂) são importantes na manutenção do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular e diminuição dos níveis destes eicosanóides pode comprometer a função renal, assim como uso indiscriminado de antiinflamatórios não esteroidais, como a indometacina, podem provocar importantes alterações na função renal, que podem ser mediadas por inibição da síntese de prostaglandinas, inibição da fosforilação oxidativa, disfunção mitocondrial e alterações na borda em escova do epitélio tubular renal (microvilos da membrana) (Harris, 2002; Basivireddy *et al.*, 2005). Hormônios locais no rim também parecem exercer um importante papel regulatório na natriurese e diurese, como o peptídeo natriurético atrial e óxido nítrico. Ambos atuam pelo caminho da guanilil ciclase, que é inibido pela indometacina, gerando retenção de sódio e água (Lee *et al.*, 2004).

O peptídeo vasoconstrictor endotelina apresenta uma variedade de efeitos farmacológicos no sistema cardiovascular e em outros sistemas, como o rim (Masaki, 1998). A principal endotelina produzida no rim é a isoforma I (ET-1), através das células mesangiais, sendo a vasculatura renal particularmente sensível aos efeitos vasoconstrictores deste peptídeo quando comparado com outros vasos (Benigni *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 1998). A infusão de ET-1 exógena reduz fluxo plasmático renal e

filtração glomerular, com aumento da resistência vascular renal. Estes efeitos são parcialmente ou completamente prevenidos por antagonistas dos receptores de endotelina (Cheng and Harris, 2004; Sorokin e Kohan, 2003).

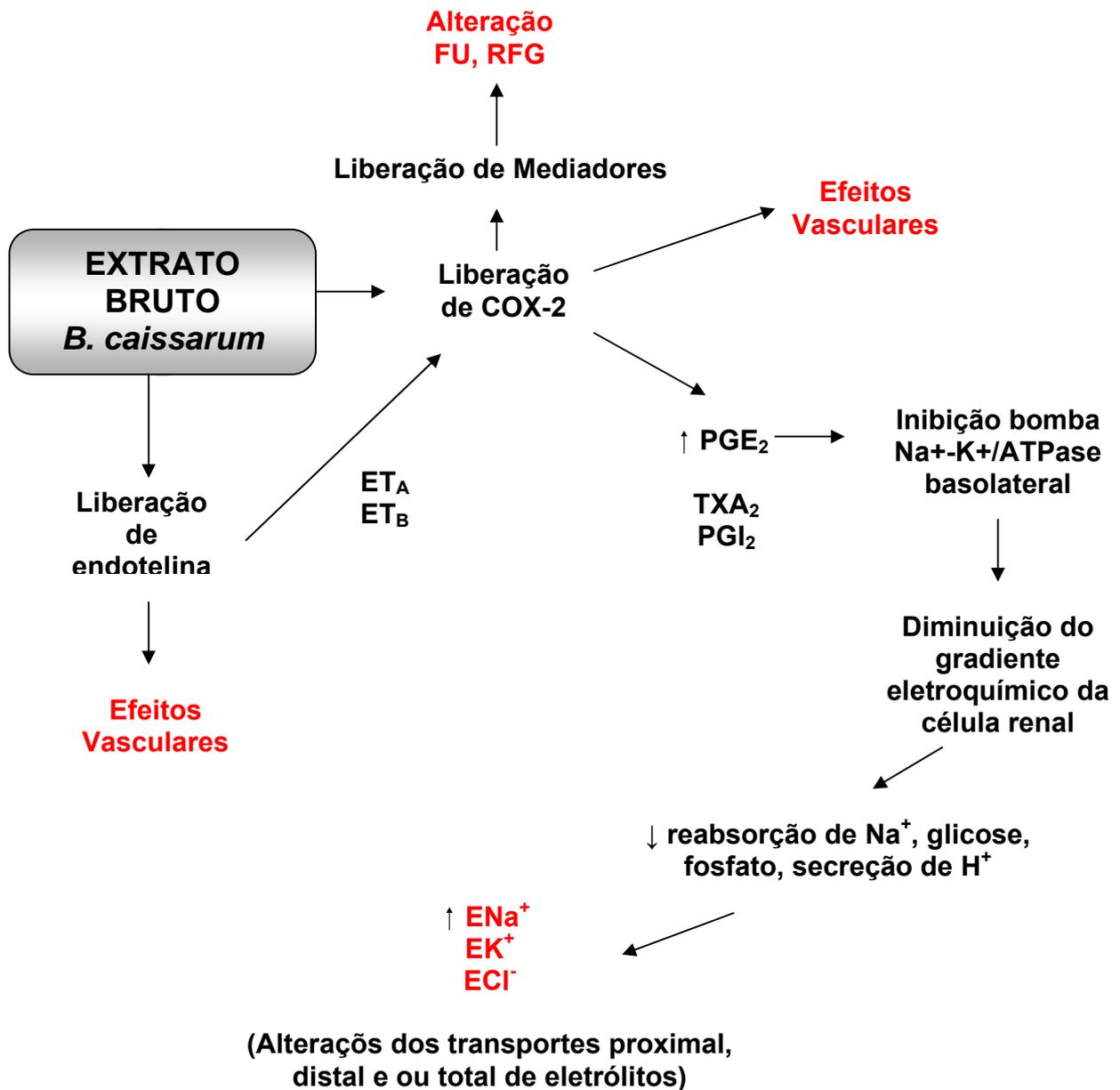
No presente trabalho nós testamos os efeitos do tezosentan, um antagonista competitivo com elevada afinidade pelos receptores ETA e ETB e maior potência no subtipo ETA (Clozel *et al.*, 1999). Tezosentan na concentração de 3 µg/mL não promoveu alterações dos parâmetros renais estudados.

Tezosentan bloqueou parcialmente os efeitos do extrato bruto de *B. caissarum*, sendo seus principais efeitos na pressão de perfusão e resistência vascular renal, fenômenos vasculares diretamente afetados pela vasoconstrição mediada pela endotelina. Ocorreu diminuição dos efeitos do extrato bruto sobre FU, UOSM, ENa⁺, EK⁺, ECl⁻ de forma menos pronunciada do que com indometacina. A adição de tezosentan ao extrato bruto de *B. caissarum* promoveu diminuição dos transportes tubulares distais de sódio e cloreto, com aumento dos transportes totais destes eletrólitos e redução na excreção dos mesmos. No caso do cloreto essa diminuição da excreção provavelmente ocorreu pelo aumento no transporte proximal deste eletrólito, o que ocorreu também para o sódio, mas este dado não apresentou significância estatística.

Nossos resultados sugerem que endotelina pode ser um importante mediador nas alterações renais induzidas pelo extrato bruto de *B. caissarum*, o que parece ser causado por danos nas células mesangiais ou epitélio glomerular, como demonstrado por Mizuno *et al.* (2007) em outras espécies de anêmonas marinhas.

Os mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos renais do extrato bruto e PLA₂ são complexos e não foram completamente elucidados pela nossa pesquisa,

diante dos dados obtidos propomos os seguintes mecanismos de ação para o extrato bruto:



6.2 Fosfolipase A₂ de *B. Caissarum*

Nos Cnidários a PLA₂ pode estar presente em tecidos da cavidade gastrovascular (tecido digestivo – gastroderme) e nematocistos dos tentáculos (Nevalainen *et al.*, 2004). Em nossos experimentos utilizamos o extrato bruto de *B. caissarum* obtido dos tentáculos o que exclui a presença de PLA₂ da cavidade gastrovascular e concentra esta enzima oriunda dos nematocistos.

Como observados em nossos resultados, a fosfolipase A₂ do extrato bruto de *B. caissarum* é uma fosfolipase de Classe III, mesmo grupo das abelhas (KUCHLER *et al.*, 1989) invertebrados, como as águas vivas (LOTAN *et al.*, 1995), mamangaba (HOFFMAN *et al.*, 1997) e escorpião (ZAMUDIO *et al.*, 1997; CONDE *et al.*, 1999).

Algumas outras fosfolipases A₂ de animais marinhos já foram isoladas, como as estrelas do mar *Asteria pectinifera* (Kishimura *et al.*, 2000) e *Acanthaser planci* (Shiomi *et al.*, 1998) que podem ser agrupadas nos grupos das PLA₂s secretórias I e II (Six e Dennis, 2000) baseando-se na homologia estrutural com venenos de serpentes e PLAs de mamíferos (Nevalainen *et al.*, 2004). Também já foram isoladas fosfolipases A₂ do veneno do caracol marinho *Cone magus*, grupo IX (McIntosh *et al.*, 1995), anêmonas marinhas, como *A. Carciniopados* (Talvinen e Nevalainen, 2002) e *Aiptasia pallida* (Grotendorst e Hessinger, 1999), águas-vivas, como *Rhopilema Nomadica* (Lotan *et al.*, 1995) e atividade fosfolipásica de esponjas marinhas (Porífera) como *Cymbastela coralliophila*, *Spirastrella vagabunda* e *Theonella swinhoei*, todavia ainda não foram sequenciadas (Nevalainen *et al.*, 2004).

Na pressão de perfusão a concentração maior promoveu um pico pressórico mais precoce que as demais, todavia em pouco tempo a pressão retornou a níveis não

significativos, o que não ocorreu com as concentrações menores que sustentaram a elevação da pressão por mais tempo.

A concentração de 0,1µg/mL apresentou um efeito semelhante a ação/ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, com elevação nos transportes tubulares proximal de sódio e cloreto e elevação substancial da excreção de potássio. Enquanto que as concentrações maiores apresentaram efeitos próximos a drogas diuréticas poupadoras de potássio ou antagonistas de receptores da aldosterona, com aumento nos transportes total e proximal de potássio e acentuada excreção de sódio e cloreto. Esse aumento na excreção de eletrólitos pode ter sido fundamental na elevação da osmolaridade urinária, cujo controle na perfusão de rim isolado fica livre da influência da vasopressina.

Em nosso grupo outras fosfolipases A_2 de venenos já foram estudadas na perfusão de rim isolado, como as PLA_2 s das serpentes *Bothrops moojeni* que apresentou como efeitos aumento da PP, RVR, FU e RFG e diminuição do transporte de sódio, efeitos distintos daqueles observados no veneno total desta serpente (Barbosa *et al.*, 2002) e PLA_2 de *Bothrops insularis*, uma miotoxina que apresentou como efeitos renais aumento da PP, RVR, FU e RFG e diminuição dos transportes de sódio e cloreto (Braga *et al.*, 2007).

As fosfolipases de venenos apresentam uma grande diversidade molecular com formas cataliticamente ativas ou inativas. Desta forma, os efeitos tóxicos das PLAs de venenos podem não ser atribuídos a sua atividade catalítica, sugerindo que elas podem ligar-se a alvos protéicos (Valentin *et al.*, 1999).

Para verificação dos efeitos vasculares da fosfolipase A_2 procedemos a realização dos experimentos em leito vascular mesentérico, cujos dados reproduziram

os efeitos observados para o extrato bruto, sugerindo-se um efeito vascular indireto, necessitando desta maneira de pesquisarmos a participação de quais mediadores estariam influenciando nos efeitos renais desta PLA₂.

Diferentemente do que ocorreu para o extrato bruto, a PLA₂ não apresentou nenhuma concentração com características que justificassem o prosseguimento dos experimentos com a mesma, optando-se desta maneira por realizarmos o bloqueio com indometacina nas três concentrações estudadas e com tezosentan nas duas concentrações menores.

Os efeitos da adição de indometacina não alteraram substancialmente os fenômenos vasculares pressão de perfusão e resistência vascular renal, assim como FU e RFG, o que sugere pouca ou nenhuma participação efetiva dos derivados da COX na mediação das alterações destes parâmetros.

Ocorreu bloqueio dos efeitos da PLA₂ no transporte proximal de sódio e cloreto, assim como bloqueio da excreção de potássio e cloreto, com diminuição da excreção de sódio, o que provocou elevação dos transportes destes três eletrólitos, provavelmente pelo bloqueio, mesmo que discreto, dos efeitos da PLA₂ nos transportes distais de sódio e cloreto e diminuição da excreção de sódio, cloreto e potássio. A diminuição da excreção de eletrólitos pode ter colaborado para o bloqueio parcial da elevação da osmolaridade urinária.

O tezosentan foi mais eficaz no bloqueio dos efeitos da concentração intermediária, não alterando os efeitos da PLA₂ nos parâmetros vasculares pressão de perfusão e resistência vascular renal. Diante destes dados tezosentan foi eficaz no bloqueio da excreção de eletrólitos, provavelmente pela elevação dos transportes

distais, todavia neste contexto seu principal efeito consistiu em poupar a perda de potássio ocasionada pela PLA₂.

A indometacina promoveu um bloqueio mais eficaz do que o tezosentan com relação aos efeitos renais do extrato bruto de *B. caissarum* e sua fração de PLA₂. A atividade da cicloxigenase parece ser estimulada por ET-1, resultando primariamente num aumento de PGE₂ e discreto aumento de tomboxano A₂ e indução de PLA₂ e COX-2 via receptor ETA. Estes achados podem explicar o porque de tezosentan ter inibido somente parcialmente os efeitos renais do extrato bruto de *B. caissarum* e sua fração PLA₂ e indometacina ter exercido uma inibição mais afetiva (Fukunaga *et al.*, 1996).

Diante dos dados observados optamos por investigar a participação de outros mediadores na mediação dos efeitos da fração de PLA₂, sendo investigada a participação de renina, adenosina (A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃), TNF- α e IL-1 β . Para esta etapa dos experimentos utilizamos rins perfundidos com menor concentração de PLA₂ testada (0,1 μ g/mL)

O grupo tratado com PLA₂ de *B. caissarum* apresentou alteração na expressão gênica de TNF- α e receptor A_{2a} de adenosina e o receptor A₃ de adenosna foi o receptor menos expresso no rim.

A PLA₂ promoveu aumento da expressão gênica de TNF- α , o que pode ter ocorrido porque o efeito inflamatório local promovido pela PLA₂ é uma reação de fase aguda, nas quais TNF- α se eleva.

O TNF α é o mais importante e o mais estudado fator de necrose tumoral. Para Loyola *et al* (2005) sua função está diretamente ligada ao aumento da expressão de

todas as citocinas pró-inflamatórias, a ativação da transcrição de fatores nucleares e, especialmente, do fator NF- κ B, responsável pela sua ativação.

O TNF α também é extremamente citotóxico, aspecto verificado em diversos estudos com células cultivadas *in vitro*, e também causador de necrose hemorrágica em tumores *in vivo*. Corroborando com a visão de Prieto *et al* (2004) estes fatores irão depender diretamente da concentração da citocina, e da atuação em células próximas ou em outros tecidos, promovendo ativação leucocitária, aumentando a junção dos vasos e estimulando a produção de outras citocinas como as IL-1, IL-6 e IL-8, bem como o estímulo à ativação dos linfócitos T e B. Por outro lado, atuando de modo endócrino, as reações serão sistêmicas e estimularão, principalmente, as atividades de ordem hepática, produção de citocinas IL-1 e IL-6, além dos sistemas de coagulação, indução da febre e a proliferação de células hematopoiéticas, levando ao estado de caquexia.

Todavia a expressão destas citocinas, como IL-1 β ocorrem em função da sua produção por macrófagos/monócitos, células mesangiais, epiteliais tubulares e glomerulares (Almeida Prado, 1997), sendo a presença de macrófagos e monócitos deficiente em nosso método, o que pode justificar a ausência de elevação da expressão gênica desta citocina em nosso estudo .

Os quatro tipos de receptores de adenosina têm sido encontrados tanto na medula como no córtex renal de ratos, com elevação dos níveis de mRNA e proteínas (Morton *et. al.*, 1998; Zou *et. al.*, 1999; Jackson *et. al.*, 2002). Embora o mapeamento dos receptores de adenosina no rim ainda seja limitado, já se pode afirmar o predomínio de A₁ na arteríola aferente (Hansen e Schermann, 2003), existindo

também no glomérulo, túbulo contorcido proximal e ducto coletor, enquanto A_{2a} predomina na arteríola eferente (Modlinger e Welch, 2003), A_{2b} em todos vasos preglomerulares e ramo descendente dos vasos retos (Hansen e Schernmann, 2003) e A_3 parecem estar em microvasos preglomerulares (Jackson e Dubey, 2001).

Os receptores medeiam a ação parácrina da adenosina através de mecanismos de ação distintos, sendo os receptores A_1 e A_3 acoplados a proteína G_i sensível a toxina pertussis, gerando inibição da adenil ciclase, enquanto os receptores A_{2a} e A_{2b} ativam proteína G_s e estimulam adenil ciclase com produção de AMP cíclico (Jackson e Dubey, 2001).

No rim a ação da adenosina varia conforme os receptores, sendo vasoconstricção, retenção de sódio, feedback tubuloglomerular, inibição da liberação de renina com ativação de A_1 (Jackson e Dubey, 2001; Welch, 2002; Modlinger e Welch, 2003) e vasodilatação por ativação de A_{2a} (Jackson e Dubey, 2001). Alguns estudos em cultura de células mesangiais (Dubey *et. al.*, 1997) e músculo liso vascular (Dubey *et. al.*, 1996, 1998, 1999) indicam que a proliferação de A_{2b} inibe proliferação celular e produção da matriz extracelular, mais estudos são necessários para elucidação das funções dos receptores A_{2b} e A_3 (Jackson e Dubey, 2001).

De acordo com Modlinger e Welch (2003) os principais efeitos renais da adenosina ocorrem mediados pelos receptores A_1 e A_{2a} . Em nosso estudo a expressão de receptores A_1 não se alterou, entretanto diante do aumento na expressão gênica de A_{2a} , sugere-se que a PLA_2 de *B. caissarum* promove uma *up regulation* destes receptores.

Cooper *et. al.* (1995) estudaram a ação de uma purina extraída da anêmona marinha *B. caissarum*, a caissarona, em íleo de cobaias e concluíram que a caissarona

apresenta uma baixa potência como antagonista dos receptores de adenosina. Neste estudo não foi estudada a seletividade desta fração quanto aos receptores A₁, A₂ e A₃.

A vasoconstrição mediada por A₁ ocorre provavelmente por um efeito constritor principal no músculo liso de vasos preglomerulares (Holz e Stheinhausen, 1987), entretanto nos néfrons justaglomerulares a vasoconstrição parece ocorrer também nas arteríolas eferentes (Nishiyama *et al.*, 2001). Acredita-se que a angiotensina II potencialize a vasoconstrição nas arteríolas eferentes mediada por A₁, o que pode justificar a ação deste mediador no mecanismo de feedback tubuloglomerular (Jackson, 2001), mesmo sabendo-se que ação agonista em A₁ promove inibição da secreção de renina (Jackson, 1991, 2001; Jackson e Dubey, 2001).

Em nossos experimentos não houve alteração da expressão gênica (mRNA) de renina. De acordo com Castrop *et al.* (2000) a produção/liberação de renina e avaliação de seus efeitos podem ser neutralizadas por outros fatores em situações que excluem mecanismos sistêmicos, como a perfusão de rim isolado.

A PLA₂ de *B. caissarum* promoveu importantes efeitos vasculares que parecem não envolver mediação da endotelina, pouca mediação da COX e *up regulation* de receptores A_{2a} de adenosina, cujo principal efeito é vasodilatação, ao que pode estar envolvido com o fenômeno inflamatório produzido pela PLA₂, como um mecanismo de proteção devido a elevação da pressão de perfusão. De acordo com Bart *et al.* (2006) a ação do agonistas seletivo do receptor A_{2a} de adenosina CGS21680, promoveu diminuição na liberação de TNF- α , o que sugere que a elevação na expressão de A_{2a} pode ter sido um mecanismo compensatório fisiológico e não um efeito farmacológico da PLA₂.

Ativação dos receptores A_1 incrementa os mecanismos de transporte tubular proximal, com aumento da ação de simportadores do Na^+ -glicose e Na^+ -fosfato na luz tubular e simporte Na^+ - 3HCO_3^- na membrana basolateral. Estes efeitos parecem ocorrer mediante diminuição de cAMP, devido a inibição da adenilciclase pela adenosina (Coulson *et al.*, 1991; Balakrishann *et. al*, 1993; Buren *et. al.*, 1993; Cai *et. al*, 1994, 1995).

É conhecido que drogas antagonistas seletivos dos receptores A_1 de adenosina, inibem a ação do receptor A_1 de adenosina sobre a adenilciclase, estimulando esta enzima com elevação de AMP cíclico, causando diurese e natriurese (Welch, 2002), geralmente com efeitos mínimos sobre o balanço de potássio (Kuan *et. al.*, 1993).

A PLA_2 promoveu aumento da reabsorção proximal de sódio e cloreto, com diminuição do transporte distal, entretanto causou aumento da excreção final de sódio e cloreto, com elevação do RFG e FU na segunda metade dos experimentos, efeito global semelhante aos observados com o uso de outros antagonistas de A_1 , como o FK453 (Balakrishann *et. al*, 1993; Buren *et. al.*, 1993), o que nos desperta para novas tentativas na investigação dos efeitos de A_1 nos rins perfundidos com PLA_2 de *B. Caissarum*.

Os mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos renais do extrato bruto e PLA_2 são complexos e não foram completamente elucidados pela nossa pesquisa, diante dos dados obtidos propomos os seguintes mecanismos de ação para o extrato bruto:

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

O extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* promove importantes alterações renais no sistema de perfusão de rim isolado. Este efeito envolve a participação de cicloxigenase e seus produtos e, em menor grau, de endotelina. As alterações eletrolíticas observadas podem envolver interferências no funcionamento da bomba de Na⁺-K⁺/ATPase, ocasionando excreção de eletrólitos e alteração nos padrões normais de transporte de sódio, potássio e cloreto.

A fosfolipase A₂ do extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* exerce efeitos renais semelhantes ao extrato bruto, sendo estes efeitos mais pronunciados em concentrações menores. A participação da cicloxigenase parece ser menos intensa do que com extrato bruto, sendo possível também a ocorrência de aumento na expressão gênica de receptores de adenosina do tipo A_{2a}. A ação da endotelina parece controversa, sendo possível uma ação agonista fraca direta da PLA₂ nos receptores ET_A, e/ou ET_B, a investigar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIBA S, HATAZAWA R, ONO K, KITATANI K, HAYAMA M, SATO T. Secretory phospholipase A₂ mediates cooperative prostaglandin generation by growth factor and cytokine independently of preceding cytosolic phospholipase A₂ expression in rat gastric epithelial cells. **J Biol Chem**;276:21854–21862. 2001.

ALÉS, E.; N.H. GABILAN, M.F. CANO-ABAD, A.G. GARCIA AND M.G. LÓPEZ. The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca⁺⁺ in chromaffin cells, **J. Biol. Chem.** 275, pp. 37488–37495, 2000.

ALMEIDA PRADO, EB. 1997. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Citocinas e progressão de doença renal. **J. Bras. Nefrol.** 19(3): 306-312, 1997.

ALVES RS, DO NASCIMENTO NR, BARBOSA PS, KERNTOPF MR, LESSA LM, DE SOUSA CM, MARTINS RD, SOUSA DF, DE QUEIROZ MG, TOYAMA MH, FONTELES MC, MARTINS AM, MONTEIRO HS. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon.** Sep 1;46(3):271-6, 2005.

AMARAL, C.F.S., RESENDE, N.A., DA SILVA, O.A, RIBEIRO, M.M.F., MAGALHÃES, R.A., REIS, R.J., CARNEIRO, J.G. AND CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 28: 220-227, 1986.

AMORA DN, SOUSA TM, MARTINS AM, BARBOSA PSF, MAGALHAES MR, TOYAMA MH, FONTELES MC, DE MENEZES DB, MONTEIRO HS. *Effects of Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon.** 47(3): 260-4, 2006.

AMORIM, M.F., MELLO, R.F., SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. Mem. Inst. Butantan, v. 34, p.137-157, 1969.

ANDERLUH, G.; P. MACEK. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). **Toxicon**. 40 pp. 111–124, 2002.

BABU UV, BHANDARI SPS, GARG HS. Hariamide, a novel sulfated sphingolipid from a *Zoanthus* sp. of the Indian coast. **J Nat Prod** 60: 1307-1309, 1997.

BALAKRISHNAN VS, COLES GA, WILLIAMS JD. A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function. **Am J Physiol**. 265 (4 Pt 2):F504-10, 1993.

BARBOSA PS, HAVT, A, FACO PE, SOUZA TM , BEZERRA IS , FONTELES MC, TOYAMA MH, MARANGONI S, NOVELLO JC, MONTEIRO HSA. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. 40:1427-1435, 2002.

BARNES, RSK; CALOW, P. E OLIVE, PJW. Os invertebrados, uma nova síntese. São paulo: Atheneu Editora. 526p. 1995.

BARRAVIERA B, COELHO KY, CURI PR, MEIRA DA. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus Durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of Sao Paulo, Brazil). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 37(1):63-9, 1995.

BART P. RAMAKERS, NIELS P. RIKSEN, GERARD A. RONGEN, JOHANNES G. VAN DER HOEVEN, PAUL SMITS, PETER PICKKERS. The effect of adenosine receptor agonists on cytokine release by human mononuclear cells depends on the specific Toll-like receptor subtype used for stimulation. **Cytokine**, Volume 35, Issues 1-2, Pages 95-99, July 2006.

BASIVIREDDY J, JACOB M, BALASUBRAMANIAN KA. Indomethacin induces free radical-mediated changes in renal brush border membranes. **Arch Toxicol.** 79(8):441-50. 2005.

BERNHEIMER AW, AVIGAD LS. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 73(2):467-71, 1976.

BERNTSON EA, FRANCE SC, MULLINEAUX LS. Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. **Mol Phylogenet Evol.** 13(2):417-33, 1999.

BERRES, L. Biologically active compounds from coelenterates, **Pure Appl. Chem.** 54 1981-1994, 1982.

BONVENTRE JV, HUANG Z, TAHERI MR, O'LEARY E, LI E, MOSKOWITZ MA, SAPIRSTEIN A. **Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2.** **Nature.**390:622–625. 1997.

BOUILLON, J. Embranchement des Cnidaires (Cnidaria). In: Grassé, P-P. (ed) *Traité de Zoologie, Cnidaires*, Tome III, Fascicule 2, Paris: Masson. p. 1-28, 1994.

BRUHN T, SCHALLER C, SCHULZE C, SANCHEZ-RODRIGUEZ J, DANNMEIER C, RAVENS U, HEUBACH JF, ECKHARDT K, SCHMIDTMAYER J, SCHMIDT H, ANEIRO S, WACHTER E, BERESS L. Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. **Toxicon.** 39(5):693-702, 2001.

BUNC M, DREVENSEK G, BUDIHNA M, SUPUT D. Effects of equinatoxin II from *Actinia equina* (L.) on isolated rat heart: the role of direct cardiotoxic effects in equinatoxin II lethality. **Toxicon.** 37(1):109-23, 1999.

CAI H, BATUMAN V, PUSCHETT DB, PUSCHETT JB. Effect of KW-3902, a novel adenosine A1 receptor antagonist, on sodium-dependent phosphate and glucose transport by the rat renal proximal tubular cell. **Life Sci.** 55(10):839-45, 1994.

CAI H, PUSCHETT DB, GUAN S, BATUMAN V, PUSCHETT JB. Phosphate transport inhibition by KW-3902, an adenosine A1 receptor antagonist, is mediated by cyclic adenosine monophosphate. **Am J Kidney Dis.** 26(5):825-30, 1995.

CASTROP H, KAMMERL M, MANN B, JENSEN BL, KRÄMER BK, KURTZ A. Cyclooxygenase 2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency. **Pflugers Arch.** 441(2-3):235-40, 2000.

CATELLA-LAWSON F, MCADAM B, MORRISON BW, KAPOOR S, KUJUBU D, ANTES L, LASSETER KC, QUAN H, GERTZ BJ, FITZGERALD GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. **J Pharmacol Exp Ther.** 289(2):735-41, 1999.

CHEN B, JIANG D, TANG L. Effects of advanced glycation end products and hypoxia on endothelin-1 secretion by bovine retinal microvascular pericytes. **Yan Ke Xue Bao.** 18(2):84-6, 2002.

CHENG HF, HARRIS RC. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. **Hypertension.** (Review) 43(3):525-30, 2004.

CLOZEL JP, VENIANT MM, QIU C, SPRECHER U, WOLFGANG R, FISCHLI W. Renal vascular and biochemical responses to systemic renin inhibition in dogs at low renal perfusion pressure. **J Cardiovasc Pharmacol.** 34(5):674-82, 1999.

COGAN MG. Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule. **Hypertension.** (Review). 15(5):451-8, 1990.

CONDE R, ZAMUDIO FZ, BECERRIL B, POSSANI LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. **FEBS Lett.** 5;460(3):447-50, 1999.

COOPER RA, DE FREITAS JC, PORRECA F, EISENHOUR CM, LUKAS R, HUXTABLE RJ. The sea anemone purine, caissarone: adenosine receptor antagonism. **Toxicol.** 33(8):1025-31, 1995.

CORREIA CRD, COSTA PRR, FERREIRA VF. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. **Quim Nova** 25: 82-89, 2002.

COULSON R, JOHNSON RA, OLSSON RA, COOPER DR, SCHEINMAN SJ. Adenosine stimulates phosphate and glucose transport in opossum kidney epithelial cells. **Am J Physiol.** (6 Pt 2):F921-8, 1991.

DAVIDSON FF, DENNIS EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. **J Mol Evol.** 31(3):228-38, 1990.

DE CASTRO RC, LANDUCCI EC, TOYAMA MH, GIGLIO JR, MARANGONI S, DE NUCCI G, ANTUNES E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. **Toxicol.** 38(12):1773-85, 2000.

DEEKAJORNDECH T, KINGWATANAKUL P, WANANUKUL S. Acute renal failure in a child with jellyfish contact dermatitis. **J Med Assoc Thai.** 87 Suppl 2:S292-4, 2004.

DENNIS, EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **Trends Biol., Sci** 16, 3-5, 1994.

DENNIS, EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biol.**, Sci 22, 1-2, 1997.

DIOCHOT S, BARON A, RASH LD, DEVAL E, ESCOUBAS P, SCARZELLO S, SALINAS M, LAZDUNSKI M. 2A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. **EMBO J.** 7;23(7):1516-25, 2004.

DIOCHOT S, LORET E, BRUHN T, BÉRESS L, LAZDUNSKI M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. **Mol Pharmacol.** 64(1):59-69, 2003.

DIOCHOT S, SCHWEITZ H, BÉRESS L, LAZDUNSKI M. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. **J Biol Chem.** 20;273(12):6744-9, 1998.

DUBEY RK, FLAMMER J, LÜSCHER TF. Angiotensin II and insulin induce growth of ciliary artery smooth muscle: effects of AT1/AT2 antagonists. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 39(11):2067-75, 1998.

DUBEY RK, GILLESPIE DG, JACKSON EK. Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. **Hypertension.** 33(1 Pt 2):190-4, 1999.

DUBEY RK, GILLESPIE DG, MI Z, JACKSON EK. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. **Circulation.** 21;96(8):2656-66, 1997.

DUBEY RK, MI Z, GILLESPIE DG, JACKSON EK. Cyclic AMP-adenosine pathway inhibits vascular smooth muscle cell growth. **Hypertension.** 28(5):765-71, 1996.

ENO AE, KONYA RS, IBU JO. Biological properties of a venom extract from the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. **Toxicon**. 36(12):2013-20, 1998.

ENOMOTO A, MURAKAMI M, VALENTIN E, LAMBEAU G, GELB MH, KUDO I. Redundant and segregated functions of granule-associated heparin-binding group II subfamily of secretory phospholipases A2 in the regulation of degranulation and prostaglandin D2 synthesis in mast cells. **J Immunol** 165:4007–4014. 2000;

FACÓ, PE; BEZERRA, GP; BARBOSA, PSF; MARTINS, AMC; GUIMARÃES, JÁ; FERREIRA, ML; MONTEIRO, HSA. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Topical** 38(6): 479-482, 2005.

FAUTIN, DAPHNE G.; ROMANO, SANDRA L. Anthozoa. Sea Anemones, Corals, Sea Pens. Version 03 October 2000. <http://tolweb.org/Anthozoa/17634/2000.10.03> in **The Tree of Life Web Project**, <http://tolweb.org/> 2000.

FAUTIN, DAPHNE G.; ROMANO, SANDRA L. Cnidaria. Sea anemones, corals, jellyfish, sea pens, hydra. Version 24 April 1997. <http://tolweb.org/Cnidaria/2461/1997.04.24> in **The Tree of Life Web Project**, <http://tolweb.org/> 1997.

FONTELES, M.C., COHEN, J.J., BLACK, A.J. AND WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** 244: 235-246, 1983.

FREITAS JC, ELENA LA. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Braz J Med Biol Res** 24: 1245-1249, 1991.

FREITAS JC, SAWAYA MI. Increase of mammalian intestinal motility by the iminopurine caissarone isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Toxicon**. 28(9):1029-37, 1990.

FUKUNAGA M, FUJIWARA Y, OCHI S, YOKOYAMA K, SHOJI T, FUKUHARA Y, ORITA Y, KAMADA T, BADR KF, UEDA N. Mechanism of induction of prostaglandin E2 production by endothelin 1 in cultured rat mesangial cells. **Exp Nephrol.** 4(6):340-9, 1996.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature:** 288: 373-376, 1980.

GALETTIS P, NORTON RS. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone, *Actinia tenebrosa*. **Toxicon.** 28(6):695-706, 1990.

GELB MH, VALENTIN E, GHOMASHCHI F, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. **J Biol Chem** ;275:39823–39826. 2000.

GIJON, M. A., SPENCER, D. M., KAISER, A. L. AND LESLIE, C. C. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. **J. Cell Biol.** 145, 1219±1232. 1999.

GLASER KB, SUNG A, BAUER J, WEICHMAN BM. Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. Involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors. **Biochem Pharmacol.** 9;45(3):711-21, 1993.

GONDRAN M., ECKELI A.L., MIGUES P.V., GABILAN N.H., RODRIGUES A.L.S. The crude extract from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* elicits convulsions in mice: Possible involvement of the glutamatergic system. **Toxicon.** 40 (12), pp. 1667-1674, 2002.

GRACE KJS, JACOBS RS. The anti-inflammatory and analgesic activities of zoanthamine, a new structural alkaloid from the toxic colonial zoanthid, *Zoanthus* sp. **FASEB J** 2: A1109, 1998.

GRACIANO ML, NORONHA, IL. Peptídeos Vasoativos e o rim. In: Miguel Carlos Riella (org). *Princípios da Nefrologia e Distúrbios Eletrolíticos*. 4ed. Guanabara Koogan, p. 69-89, 2003.

GRANGER JP, HALL JE. Acute and chronic actions of bradykinin on renal function and arterial pressure. **Am J Physiol**. 248(1 Pt 2):F87-92, 1985.

GROTENDORST, GR; HESSINGER, D.A. Enzymatic characterization of the major phospholipase A2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom, **Toxicon** 38, pp. 931–943, 2000.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon** 33 : 1405-1424. 1995.

HACKENTAL, E.; PAUL, M, GANTEN, D, TAUGNER, R. Morphology, physiology and molecular biology of rennin secretion. **Physiol. Rev**. 70: 1067, 1990.

HAN WK, SAPIRSTEIN A, HUNG CC, ALESSANDRINI A, BONVENTRE JV. Cross-talk between cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2 alpha) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA2 regulates cPLA2 alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. **J Biol Chem**;278:24153–24163. 2003.

HANSEN PB, SCHNERMANN J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**. (Review) 285(4):F590-9, 2003.

HARRIS RC. Cyclooxygenase-2 and the kidney: functional and pathophysiological implications. **J Hypertens Suppl.** (Review) 20(6):S3-9, 2002.

HAVT, A, FONTELES MC, MONTEIRO HSA. The renal effects of Bothrops jararacussu venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon.** 39:1841-1846, 2001.

HOFFMAN DR, JACOBSON RS. Allergens in Hymenoptera venom. XXVII: bumblebee venom allergy and allergens. **J Allergy Clin Immunol.** 97(3), 1996.

HOFFMAN, DK; FITT, WK; FLECK, J. Checkpoints in the life-cycle of *Cassiopea* spp.: control of metagenesis and metamorphosis in a tropical jellyfish. **Int. J. dev. Biol.** 40:331-338, 1996.

HOLZ FG, STEINHAUSEN M. Renovascular effects of adenosine receptor agonists. **Ren Physiol.** 10(5):272-82, 1987.

HSUEH, WA, ANTONIPILLAI, I. Renin-angiotensin. In: Textbook of nephrology, 3^o ed., edição, editado por Massery, SG e Glassock, RJ. Pp. 197, 1995.

HURT-CAMEJO, E., CAMEJO, E., PEILOT, H., ÖÖRNI, K., KOVANEN, P. Phospholipase A2 in Vascular Disease. **Circ. Res.** 89:298-304. 2001.

JACKSON EK, DUBEY RK. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. **Am J Physiol Renal Physiol.** (Review) 281(4):F597-612, 2001.

JACKSON EK, ZHU C, TOFOVIC SP. Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. **Am J Physiol Renal Physiol.** 283(1):F41-51, 2002.

JIANG, X-Y; W.-L. YANG, H.-P. CHEN, H.-B. TU, W.-Y. WU, J.-W. WEI, J. WANG, W.-H. LIU AND A.-L. XU. Cloning and characterization of an acidic cytolysin cDNA from sea anemone *Sagartia rosea*, **Toxicon** 40, pp. 1563–1569, 2002.

KAWAI N, KONNO K. Molecular determinants of two neurotoxins that regulate sodium current inactivation in rat hippocampal neurons. **Neurosci Lett.** 6;361(1-3):44-6, 2004.

KENNEDY, B. P., C. SORAVIA, J. MOFFAT, L. XIA, T. HIRUKI, S. COLLINS, S. GALLINGER, AND B. BAPAT. Overexpression of the nonpancreatic secretory group II PLA2 messenger RNA and protein in colorectal adenomas from familial adenomatous polyposis patients. **Cancer Res.** 58:500. 1998.

KENNEDY, B. P., P. PAYETTE, J. MUDGETT, P. VADAS, W. PRUZANSKI, M. KWAN, C. TANG, D. E. RANCOURT, W. A. CROMLISH. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. **J. Biol. Chem.** 270.1995.

KISHIMURA H, OJIMA T, HAYASHI K, NISHITA K. cDNA cloning and sequencing of phospholipase A2 from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 126(4):579-86, 2000.

KOSCINCZUK P, BORDA JT, MARUÑAK S, ACOSTA DE PÉREZ O, MUSSART DE COPPO N. Renal injury in rats poisoned by venom of *Bothrops neuwiedii* diporus from Argentina. **Medicina (B Aires).** 64(4):320-4, 2004.

KUAN CJ, HERZER WA, JACKSON EK. Cardiovascular and renal effects of blocking A1 adenosine receptors. **J Cardiovasc Pharmacol.** 21(5):822-8, 1993.

KUCHLER K, GMACHL M, SIPPL MJ, KREIL G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. **Eur J Biochem.** 1;184(1):249-54, 1989.

KURAMOTO M, HAYASHI K, YAMAGUCHI K, YADA M, TSUJI T, UEMURA D. Structure-activity relationship of norzoanthamine exhibiting significant inhibition of osteoporosis. **Bull Chem Soc Jpn** 71: 771-779, 1998.

LAGOS P, FREITAS JC, DURAN RC, SILVEIRA R. Identification of hemolytic and neurotoxic activities in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. **Braz J Med Biol Res** 34: 895-902, 2001.

LAMBEAU G, LAZDUNSKI M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol Sci.** (Review) 20(4):162-70, 1999.

LAMBEAU,G. ; LAZDUNSKI,M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol.** Sci. 20 162-170.1999.

LANIO, ME; V. MORERA, C. ALVAREZ, M. TEJUCA, T. GÓMEZ, F. PAZOS, V. BESADA, D. MARTÍNEZ, V. HUERTA, G. PADRÓN AND M.A. CHÁVEZ. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*, **Toxicon** 39 pp. 187–194, 2001.

LEE J, KIM SW, JUNG TK, OH Y, PARK CS, MA SK, KIM NH, CHOI KC. Indomethacin decreases particulate guanylyl cyclase activity in rat kidney. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 31(4):207-11, 2004.

LEITZ, T. Induction of settlement and metamorphosis of cnidarian larvae: signals and signal transduction. **Invertebr. Reprod. Dev.** 31:109-122, 1997.

LESLIE, C. C.Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272, 16709-16712. 1997.

LIMA, D. Postado em 29/09/07. Disponível em: www.mundodabiologia.blogspot.com, Acessado em 27/11/2007.

LOPES AG, SOARES AC, SANTOS DP, FERNANDES MS, LEÃO-FERREIRA LR, QUINTANA-GOMES E, CARUSO-NEVES C. PLA2/PGE2 are involved in the inhibitory

effect of bradykinin on the angiotensin-(1-7)-stimulated Na(+)-ATPase activity of the proximal tubule. **Regul Pept.** 15;117(1):37-41, 2004.

LOTAN A, FISHMAN L, LOYA Y, ZLOTKIN E. Delivery of a nematocyst toxin. **Nature.** 8;375(6531):456, 1995.

LOYOLA, A.J.C.; CASTRO, L.C.M.; CHAIBUD, S.C.W.; XIMENES, A.C. Infliximab no tratamento da artrite psoriásica grave. *An Bras Dermatol.*, v.80, n.5, p.535-537, 2005.

MACEK P, LEBEZ D. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH. **Toxicon.**19(2):233-40, 1981.

MACEK, P. Polypeptide cytolytic toxin from sea anemones (Actiniaria), **FEMS Microbiol. Immunol.** 105, pp. 121–130, 1992.

MALPEZZI E.L.A.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 24, pp. 1245–1249, 1991.

MALPEZZI EL, MATSUI DH, GROOTE SC, FREITAS GM, SANTELLI GM, FERNANDES JB. Antitumoral activity in an organic extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Toxicon** 33: 291, 1993.

MARGOLIUS HS. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hypertension.** (Review). 26(2):221-9, 1995.

MARTÍN-BENI TO, J.; F. GAVILANES, V. DE LOS RÍOS, J.M. MANCHEÑO, J.J. FERNANDEZ; J.G. GAVILANES. Two-dimensional crystallization on lipid monolayers and three-dimensional structure of sticholysin II, a cytolytic toxin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, **Biophys. J.** 78, pp. 3186–3194, 2000.

MARTINS, A.M.C., GUEDES, E. O., MENEZES, D.B., MONTEIRO, H.S.A; FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. 36: 1441-1450, 1998.

MARTINS, A.M.C., TOYAMA, M.H., HAVT, A., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C., FONTELES, M.C. ; MONTEIRO, H.S.A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* Venom Components that Induce Renal Toxicity in Isolated Rat Kidneys. **Toxicon**, vol.40, pp.1165-1171, 2002.

MCCOY DE, BHATTACHARYA S, OLSON BA, LEVIER DG, AREND LJ, SPIELMAN WS. The renal adenosine system: structure, function, and regulation. **Semin Nephrol**. 13(1):31-40, 1993.

MCINTOSH JM, GHOMASHCHI F, GELB MH, DOOLEY DJ, STOEHR SJ, GIORDANI AB, NAISBITT SR, OLIVERA BM. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. **J Biol Chem**. 24;270(8):3518-26, 1995.

MCPHERSON, JC E JACOBS, RS. An 18.5kDa protein from the amebocyte of *Limulus polyphemus*, homologous to the previously described amebocyte aggregating factor, expresses alternative phospholipases A2 activity. **Comp.Biochem. Physiol.**, B 127, 31-44, 2000.

MEBS D, GEBAUER E. Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone. *Stoichactis* sp. **Toxicon**. 18(1):97-106, 1980.

MEBS D, LIEBRICH M, REUL A, SAMEJIMA Y. Hemolysins and proteinase inhibitors from sea anemones of the Gulf of Aqaba. **Toxicon**. 21(2):257-64, 1983.

MIGOTTO, A. E. - Centro de Biologia Marinha – USP – Disponível em: <http://www.usp.br/cbm/artigos/galeria/cnidaria/anthozoa/caissarum.html>. Acessado em: 05/12/2007

MIGOTTO, A.E. Anthozoan bleaching on the southerastern coast of Brazil in the summer of 1994. In: Proceedings of the VI International Conference on Celenterate Biology, **The Netherlands**: 329-335, 1997.

MIGUES, PV; R.B. LEAL, M. MANTOVANI, M. NICOLAU; N.H. GABILAN. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, **NeuroReport** 10, pp. 67–70, 1999.

MIZUNO M, NISHIKAWA K, YUZAWA Y, KANIE T, MORI H, ARAKI Y, HOTTA N, MATSUO S. Acute renal failure after a sea anemone sting. **Am J Kidney Dis.** 36(2):E10, 2000.

MIZUNO M, NOZAKI M, MORINE N, SUZUKI N, NISHIKAWA K, MORGAN BP, MATSUO S. A Protein Toxin from the Sea Anemone *Phyllodiscus semoni* Targets the Kidney and Causes a Severe Renal Injury with Predominant Glomerular Endothelial Damage. **Am J Pathol.**, 171(2):402-14, 2007.

MODLINGER PS, WELCH WJ. Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 12(5):497-502, 2003.

MONROY-ESTRADA HI, SEGURA-PUERTAS L, GALVÁN-ARZATE S, SANTAMARÍA A, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ J. The crude venom from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* induces haemolysis and slight peroxidative damage in rat and human erythrocytes. **Toxicol In Vitro.** 21(3):398-402, 2006.

MONTEIRO, H. S. A.; DA SILVA, I. M. S. C.; MARTINS, A. M. C.; FONTELES, M. C. Effects of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 1347-1352, 2001.

MORTON MJ, SIVAPRASADARAO A, BOWMER CJ, YATES MS. Adenosine receptor mRNA levels during postnatal renal maturation in the rat. **J Pharm Pharmacol.** 50(6):649-54, 1998.

MOTTE S, MCENTEE K, NAEIJE R. Endothelin receptor antagonists. **Pharmacol Ther.** (Review). 110(3):386-414, 2006.

MÜLLER, W.A., WIEKER, F.; EIBEN, R. Larval adhesion, releasing stimuli and metamorphosis. In *Coelenterate ecology and behavior*. Edited by G.O. Mackie. Plenum Press, New York e London. Pp. 339-346, 1976.

MÜLLER, WA; LEITZ, T. Metamorphosis in the Cnidaria. **Can. J. Zool.** 80: 1755-1771, 2002.

NAIR, X., D. NETTLETON, D. CLEVER, K. M. TRAMPOSCH, S. GHOSH, R. C. FRANSON. Swine as a model of skin inflammation: phospholipase A2-induced inflammation. **Inflammation** 17:205. 1993.

NEVALAINEN TJ, PEURAVUORI HJ, QUINN RJ, LLEWELLYN LE, BENZIE JA, FENNER PJ, WINKEL KD. Phospholipase A2 in cnidaria. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 139(4):731-5, 2004.

NEVALAINEN, T. J. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. **Clin. Chem.** 39:2453. 1993.

NISHIYAMA A, FUJISAWA Y, FUKUI T, RAHMAN M, KONDO N, OGAWA Y, FANZHU L, GUOXING Z, KIMURA S, ABE Y. Role of nitric oxide in regional blood flow in angiotensin II-induced hypertensive rats. **Hypertens Res.** 24(4):421-7, 2001.

NOBRE, A.C.L., COÊLHO, G.R., COUTINHO, M.C.M., MENEZES, D.B., FONTELES, M.C. MONTEIRO, H.S.A. The role of Phospholipase A₂ and ciclooxigenase and renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicon.** 39: 721- 724, 2002.

NOBRE, AC, JORGE MC, MENEZES DB, FONTELES MC, MONTEIRO HSA. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Braz J Med Biol Res.** 32:985-988, 1999.

OLIVEIRA JS, REDAELLI E, ZAHARENKO AJ, CASSULINI RR, KONNO K, PIMENTA DC, FREITAS JC, CLARE JJ, WANKE E. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. **J Biol Chem.** 6;279(32):33323-35, 2004. Erratum in: J Biol Chem. 15;279(42):44229.

OLIVEIRA JS, ZAHARENKO AJ, DE FREITAS JC, KONNO K, DE ANDRADE SA, PORTARO FC, RICHARDSON M, SANT'ANNA OA, TAMBOURGI DV. Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: purification and biological characterization. **Biochim Biophys Acta.** 1760(3):453-61, 2006a.

OLIVEIRA JS, ZAHARENKO AJ, FERREIRA WA JR, KONNO K, SHIDA CS, RICHARDSON M, LUCIO AD, BEIRAO PS, DE FREITAS JC. BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. **Biochim Biophys Acta.** 1764(10):1592-600, 2006b.

PIROTZKY E, NINIO E, BIDAULT J, PFISTER A, BENVENISTE J. Biosynthesis of platelet-activating factor. VI. Precursor of platelet-activating factor and acetyltransferase activity in isolated rat kidney cells. **Lab Invest.** 51(5):567-72, 1984.

PRÉVOT A, LIET JM, SEMAMA DS, JUSTRABO E, GUIGNARD JP, GOUYON JB. Disparate effects of chronic and acute theophylline on cyclosporine A nephrotoxicity. **Pediatr Nephrol.** 17(6):418-24, 2002.

RAAB, W., KAISER, E. Nephrotoxic Action Of Snake Venoms. **Mem. Inst. Butantan,** 33: 1017-1020, 1966.

RABKIN, R E DAHL, DC. Hormones and the kidney. In: Diseases of the kidney. 5^a edição, editado por Schrier, RW. E Gottschalk, CW. Little, Brown and Company, p. 283. **Ren Physiol.** 10(5):272-82, 1993.

REDDY, S. T., M. V. WINSTEAD, J. A. TISCHFIELD, H. R. HERSCHMAN. Analysis of the secretory phospholipase A2 that mediates prostaglandin production in mast cells. **J. Biol. Chem.** 272:13591. 1997.

RINEHART KL, SHAW PD, SHIELD LS, GLOER JB, HARBOUR GC, KOKER MES, SAMAIN D, SCHWARTZ RE, TYMIAK AA, WELLER DL, CARTER GT, MUNRO MH, HUGHES RG, RENIS HE, SWYNNENBERG EB, STRINGFELLOW DA, VAVRA JJ, COATS JH, ZURENKO GE, KUENTZEL SL, LI LH, BAKUS GJ, BRUSCA RC, CRAFT LL, YONG DN, CONNER JL. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. **Pure Appl Chem** 53: 795-817. 1981.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados. Ed. São Paulo: Roca, 1996.

SAND, S.M., PUNDARE, N.M. Autopsy Study of Cases of Snake Bite With Special Reference To Renal Lesions. **J. Postgrad. Med.**, 18: 181-188, 1972.

SATAKE Y, DIAZ BL, BALESTRIERI B, LAM BK, KANAOKA Y, GRUSBY MJ, ARM JP. Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. **J Biol Chem.** ;279:16488–16494.2004.

SCHRIER RW, WANG W, POOLE B, MITRA A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J Clin Invest.** 2004 Jul;114(1):5-14. Review. **Erratum in: J Clin Invest.** 114(4):598. Agosto 2004

SCHMETTERER L, DALLINGER S, BOBR B, SELENKO N, EICHLER HG, WOLZT M. Systemic and renal effects of an ET(A) receptor subtype-specific antagonist in healthy subjects. **Br J Pharmacol.**124(5):930-4, 1998.

SCOTT DL, OTWINOWSKI Z, GELB MH, SIGLER PB. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science.** 14;250(4987):1563-6, 1990. Erratum in: *Science* 10;252(5007):764, 1991.

SEEDAT, Y.K., REDDY, J., EDINGTON, D.A. Acute Renal Failure Due To Proliferative Nephritis From Snake Bite Poisoning. **Nephron**, 13: 455-463, 1974.

SHIOMI KA, KAZAMA A, SHIMAKURA K, NAGASHIMA Y. Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. **Toxicon.** 36(4):589-99, 1998.

SHIOMI, K.; W.-H. QIAN, X.-Y. LIN, K. SHIMAKURA, Y. NAGASHIMA; M. ISHIDA, Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*, **Biochim. Biophys. Acta** 1335, pp. 191–198, 1997.

SILVA, O.A., LÓPEZ, M., GODOY, P. Intensive Care Unit Treatment Of Acute Renal Failure Following Snake Bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28: 401-407, 1979.

SIX DA, DENNIS EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta.** (Review) 31;1488(1-2):1-19. 2000.

SITPRIJA, V. BOONPUCKNAVIG, V. Snake And Nephrotoxicity. In: Lee, C.Y. (Edit.) **Snake Venoms.** New York: Springer-Verlag, Cap. 28, P. 997-1018, 1979.

SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. Nephrotoxicity in snake envenomation. **J. Nat. Toxins**, v. 8, p. 271-277, 1999.

SOROKIN A, KOHAN DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. **Am J Physiol Renal Physiol.** 285(4):F579-89, 2003.

TALVINEN KA, NEVALAINEN TJ. Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia cariniopados*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 132(3):571-8, 2002.

TEIXEIRA CF, LANDUCCI EC, ANTUNES E, CHACUR M, CURY Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon.** (Review) 15;42(8):947-62, 2003.

TEIXEIRA, E.H., HAVT, A, BARBOSA, P.S.F., MENESES, D.B., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S.A, SAMPAIO, A.H., CAVADA, B.S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein and peptide letters.** 8, 477-484, 2001.

THIERES. Disponivel em: www.pupt.org/arquivos/professores/biologia/Cnidarios.pdf .
Acessado em: 27/11/2007.

UECHI, G.I.; H. TOMA, T. ARAKAWA ; Y. SATO. Biochemical and physiological analyses of a hemolytic toxin isolated from a sea anemone *Actinaria villosa*, **Toxicon** 45, pp. 761–766, 2005.

UOZUMI N, KUME K, NAGASE T, NAKATANI N, ISHII S, TASHIRO F, KOMAGATA Y, MAKI K, IKUTA K, OUCHI Y, MIYAZAKI J, SHIMIZU T. **Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. Nature**;390:618–622. 1997.

VADAS, P., J. BROWNING, J. EDELSON, AND W. PRUZANSKI. Extracellular Phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. **J. Lipid Mediators** 8:1. 1993.

VARAGUNAM, T. PANABOKKE, R.G. Bilateral Cortical Necrosis Of The Kidney Following Snake Bite. **Postgrad. Med. J.**, 46: 449-451, 1970.

VALENTIN E, GHOMASHCHI F, GELB MH, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. **J Biol Chem.** 17;275(11):7492-6, 2000.

VALENTIN E, KODURI RS, SCIMECA JC, CARLE G, GELB MH, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. J. Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2).**Biol Chem.** 274:19152–19160. 1999.

VALENTIN E, KODURI RS, SCIMECA JC, CARLE G, GELB MH, LAZDUNSKI M, LAMBEAU G. Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** 274 19152^19160.1999.

VALENTIN E, LAMBEAU G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488; 59-70. 2000.

VALENTIN E, LAMBEAU G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**. (Review) 82(9-10):815-31, 2000.

VAN BUREN M, BIJLSMA JA, BOER P, VAN RIJN HJ, KOOMANS HA. Natriuretic and hypotensive effect of adenosine-1 blockade in essential hypertension. **Hypertension**. 22(5):728-34, 1993.

VENKATESWARLU Y, RAO MR, VENKATESHAM U. A new dibromotyrosine-derived metabolite from the sponge *psammaphysilla purpurea*1. **J Nat Prod**. 61(11):1388-9, 1998.

WANG JM, ROH SH, KIM S, LEE CW, KIM JI, SWARTZ K J. Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels. **J Gen Physiol**. 123(4):455-67, 2004.

WATSON,GM. Ultrastructure and cytochesmistry of developing nematocysts. in D.A Hessinger and H.M. Lenhoff (eds.) *The biology of nematocysts*. Academic Press, Amsterdam and other cities. Pp. 143-164, 1988.

WEINHEIMER A. Spraggins R. The occurrence of two new prostaglandin derivates (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *eChemistry of Coelenterates, XV*. **Tetrahedron Lett**. 59: 5185-5188, 1969.

WEINRAUCH, Y., P. ELSBACH, L. M. MADSEN, A. FOREMAN, AND J. WEISS. The potent anti-*Staphylococcus aureus* activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. **J. Clin. Invest**. 97:250. 1996.

WELCH WJ. Adenosine type 1 receptor antagonists in fluid retaining disorders. **Expert Opin Investig Drugs**. (Review). 11(11):1553-62, 2002.

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **J Hypertens Suppl**. 6(4):S188-91, 1988.

ZAMUDIO FZ, CONDE R, ARÉVALO C, BECERRIL B, MARTIN BM, VALDIVIA HH, POSSANI LD. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. **J Biol Chem**. 272(18):11886-94, 1997.

ANEXOS

ANEXOS

Trabalhos apresentados em congressos com o tema da tese:

- Resumos publicados em anais de congressos - Painéis

1. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; ARAUJO LIMA, ALGC ; SANTOS, J. V. A. ; STUDART NETO, A. ; TOYAMA, M H ; BARBOSA, P. S. F. ; FONTELES, M. C. ; MONTEIRO, H. S. A. . EFEITOS RENAIIS DA PLA2 DO EXTRATO BRUTO DE *BUNODOSOMA CAISSARUM* EM PERFUSÃO DE RIM ISOLADO. In: II REUNIÃO REGIONAL DA FESBE, 2007, RECIFE. II REUNIÃO REGIONAL DA FESBE - CD ROOM, 2007.
2. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; JORGE, A. R. C. ; ARAUJO LIMA, ALGC ; ARAGAO, F. O. F. ; STUDART NETO, A. ; HAVT, A. ; TOYAMA, M H ; BARBOSA, P. S. F. ; MONTEIRO, H S A . Estudo dos Efeitos Biologicos e bloqueio com indometacina do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* em rim isolado de rato e leito vascular mesentérico. In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, 2007, Ribeirao Preto. 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental - Anais, 2007.
3. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; JORGE, A. R. C. ; PEREIRA, C. D. M. A. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; SANTOS, J. V. A. ; TOYAMA, M H ; BARBOSA, P. S. F. ; FONTELES, M. C. ; MONTEIRO, H. S. A. . Bloqueio do efeitos renais do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* pelo Tezosentan. In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, 2007, Ribeirao Preto. 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental - Anais do Congresso, 2007.

4. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; SILVA NETO, A. G. ; TOYAMA, M H ; MARTINS, A. M. C. ; BARBOSA, P. S. F. ; FONTELES, M. C. ; MONTEIRO, H. S. A. . Effect of the Pla2 isolated from sea anemone *Bunodosoma caissarum* on renal perfusion. In: 9th Pan-American Section Congress of the International Society of Toxinology, 2007, Juriquilla. 9th Pan-American Section Congress of the International Society of Toxinology, 2007.
5. MONTEIRO, H S A ; MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; AMORA, D. N. ; TOYAMA, M H ; MARTINS, A M C ; FONTELES, M C ; MONTEIRO, F. C. D. . Effects of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* venom on renal perfusion and mesenteric bed vessels. In: 15th WORLD CONGRESS ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS, 2006, GLASGOW. RESUMOS DO CONGRESSO, 2006.
6. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. DE S. ; BARBOSA, P. S. F. ; MARTINS, A. M. C. ; TOYAMA, M H ; MONTEIRO, H S A . *Bunodosoma caissarum* effects on perfused rat kidney and arteriolar mesenteric bed. In: 15th WORLD CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2006, BEIJING. LIVRO DE RESUMOS, 2006.
7. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; TOYAMA, M H ; MARTINS, A M C ; BARBOSA, P. S. F. ; MONTEIRO, H S A . Indometacin Blockage the *Bunodosoma caissarum* Venom Effects on Kidney Renal Perfusion. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXINOLOGIA SBTx, 2006, FORTALEZA. CD ROOM, 2006.
8. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; SOUSA, Ieda Pereira de ; TOYAMA, M H ; MARTINS, A M C ; FONTELES, M C ; MONTEIRO, H S A . Concentração-response Curve of the Sea Anemone *Bunodosoma caissarum* Venom on Kidney Renal Perfusion. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXINOLOGIA SBTx, 2006, FORTALEZA. CD ROOM, 2006.

- Apresentações de Trabalho - ORAL

1. MARTINS, R. D. ; ALVES, R. S. ; OLIVEIRA, I. M. S. ; ARAUJO LIMA, ALGC ; SANTOS, J. V. A. ; STUDART NETO, A. ; TOYAMA, M H ; BARBOSA, P. S. F. ; FONTELES, M C ; MONTEIRO, H S A . EFEITOS RENAIIS DA PLA2 DO EXTRATO BRUTO DE BUNODOSOMA CAISSARUM EM PERFUSÃO DE RIM ISOLADO. 2007. (Apresentação de Trabalho/Comunicação). **II REUNIÃO REGIONAL FESBE**

- Paper Enviado ao Periódico *Toxicon*

Purification, characterization and biological effects of phospholipase A₂ from sea anemone *Bunodosoma caissarum*

René D. Martins¹; Renata S. Alves¹; Alice M.C. Martins²; Paulo Sergio F. Barbosa¹; Janaina S.A.M. Evangelista³; João José F. Evangelista¹; Rafael M. Ximenes¹; Marcos H. Toyama⁴; Daniela O. Toyama⁵; Alex Jardelino F. Souza⁶; Diego J. B. Orts⁴; Sérgio Marangoni⁶; Dalgimar B. de Menezes⁷; Manassés C. Fonteles⁵; Helena S. A. Monteiro¹.

¹Department of Physiology and Pharmacology - Institute of Biomedicine and Clinical Research Unit - Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³Veterinary Faculty, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴São Vicente Unit, Campus of Litoral Paulista, Paulista State University (UNESP), São Paulo, Brazil.

⁵Mackenzie Presbyterian University, São Paulo, Brazil

⁶UNICAMP, IB, Biochemistry Department, Campinas, São Paulo, Brazil

⁷Department of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Address for correspondence:

Dr. Helena Serra Azul Monteiro
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará
CEP- 60.420 - 970
PO BOX 3229 - Fortaleza -Ce - Brasil
Phone: (085) 33668248
Fax: (085) 32815212
E.mail- serrazul@baydenet.com.br
martinsalice@gmail.com

Abstract

Sea anemones contain a variety of biologically active substances. *Bunodosoma caissarum* is a sea anemone from *Cnidaria phylum*, found only in Brazilian coastal waters. The aim of the work was to study the biological effects of PLA₂ from the anemone *Bunodosoma caissarum*. Specimens of *B. caissarum* were collected at the São Vicente Channel on the southern coast of the State of São Paulo, Brazil. Reverse phase HPLC of the crude extract of *B. caissarum* disclosed three PLA₂ active proteins named as BcPLA₂1, BcPLA₂2 and BcPLA₂3. The MALDI-TOF mass spectrometry of BcPLA₂1 showed one main peak of 14.7KDa. The N-terminal amino acid sequence of BcPLA₂1 showed high amino acid identity with other PLA₂ group III isolated from the Mexican lizard PA23 HELSU, HELSU, PA22 HELSU and with honey bee *Apis mellifera* PLA₂ and 1POC_A. BcPLA₂1 also showed significant homology with bee PLA₂. The enzymatic activity induced by native BcPLA₂1 (20µg/well) was reduced by chemical treatment with p-bromophenacyl bromide (p-BPB) and with morin. BcPLA₂1 strongly

induced increase of insulin secretion in presence of high glucose concentration. The treatment of BcPLA₂1, with morin abolished the effect induced by native BcPLA₂1, whereas p-BPB only reduced the insulinotropic effect induced by BcPLA₂1. In isolated kidney, the PLA₂ from *Bunodosoma caissarum* increased the perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow, glomerular filtration rate, and sodium, potassium and chloride excretion. As to the mesenteric blood vessels, BcPLA₂1 did not increase the perfusion pressure on mesenteric vascular bed. In conclusion, PLA₂ isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, a group III phospholipase, promoted renal effects and induced insulin secretion in presence of high glucose concentration.

Key Words: *Bunodosoma caissarum*, phospholipase A₂, biological effects.

1. INTRODUCTION

Sea anemones contain a variety of biologically active substances including some potent toxins. The composition of cnidarians venoms is not known in detail, but it appears that their venoms include a variety of proteic (peptides, proteins, enzymes and proteinase inhibitors) and non-proteic substances (purines, quaternary ammonium compounds, biogenic amines and betaines) (Malpezzi et al., 1993; Grotendorst and Hessinger, 2000; Anderluh and Macek, 2002). The nematocysts possess a high concentration of polypeptides and proteins that act as neurotoxins, hemolysins and enzymes, and are responsible for a variety of effects (cardiotoxicity, dermatitis, local itching, swelling, erythema, paralysis, pain and necrosis) (Oliveira et al., 2006a). Among the substances isolated there are some polypeptides which interact with voltage-sensitive sodium channels (Cunha et al., 2005), potassium channels (including the hERG channel), acid-sensing ion channel, pore-forming toxins (actinoporins), protease inhibitors (Diochot et al., 1998, 2003, 2004; Bosmans and Tytgat, 2007).

The purine caissarone was the first adenosine receptor antagonist described from a marine organism that elicits anomalies in sea urchin eggs and increases the intestinal

motility in mammals (Freitas and Sawaya, 1986, 1990; Cooper et al., 1995). It was also reported that alcoholic extracts of the whole body of *B. caissarum* had an antimitotic effect when tested on sea urchin eggs (Malpezzi and Freitas, 1990). The venom extracted from the nematocysts of this anemone through electric stimuli presents a high hemolytic activity on the erythrocytes of different species of vertebrates (fish, toad, snake, mouse and rat) (Malpezzi and Freitas, 1991) and this effect has been attributed to a 20 kDa protein with phospholipase A₂ activity, caissarolysin I (Oliveira et al., 2006a). The same protein also induced glutamate release from rat synaptosomes and exocytosis in bovine chromaffin cells (Migues et al., 1999; Alés et al., 2000).

PLA₂s have been identified in a marine invertebrates (McIntosh et al., 1995; MacPherson and Jacobs, 2000; Kishimura et al., 2000; Talvinen and Nevalainen, 2002; Nevalainen et al., 2004a, 2004b), in hard corals, fire coral, crown-of-thorns starfish, sea cucumber, marine sponges and both acontia and tentacles of Cnidaria (Nevalainen, 2004a, 2004b).

Envenomation by the sea anemone *Phyllodiscus semoni* causes fulminant dermatitis and acute renal failure in humans (Masashi et al., 2007). Its described renal effects induced by snakes (Martins et al., 1998; Havt et al., 2001; Barbosa et al., 2002; Amora et al., 2006), fish (Facó et al., 2005), spiders (Abdulkader et al., 2008) and scorpions (Alves et al., 2005) have been described. In some instances these effects could be associated with complement (C)-activating components in the venoms that indirectly contribute to tissue damage (Yamamoto et al., 2002; Bertazzi et al., 2003; Rodrigues et al., 2004; Tambourgi et al., 2004). No direct association between sea anemone venoms and C activation has been reported, although the sea anemone-derived toxin AvTX-60A has recently been reported to exhibit structural similarities to terminal pathway C proteins (Oshiro et al., 2004).

Bunodosoma caissarum is a sea anemone from *Cnidaria phylum*, which is found only in Brazilian coastal waters, comprises benthic and pelagic aquatic animals including the classes Anthozoa (hard corals, soft corals, sea pens, sea anemones), Hydrozoa (hydroids, fire corals), Scyphozoa (jellyfish) and Cubozoa (box jellyfish) (Nevalainen et al., 2004b). Sea anemones possess tentacles that are used for capturing prey, as well as for protection against predators (Cunha et al., 2005). These structures contain

cnidocytes with organelles known as nematocysts, that contain fire harpoon-like microscopic structures (cnida) that penetrate the surface layer of the victim and deliver a mixture of highly toxic substances (Cunha *et al.*, 2005; Nevalainen *et al.*, 2004b).

The aim of the present work was to study the biological effects of PLA₂ isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum* on isolated perfused kidney, arteriolar mesenteric bed and insulin secretion.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Crude protein extracts preparation

Sixty specimens of *B. caissarum* (weighing approximately 13 grams each) were collected during periods of low tide by free diving at different rocky shores of the São Vicente Channel on the southern coast of Sao Paulo, Brazil. The animals were transported alive and starved in an aquarium for 72h to eliminate any contents from the gastrovascular cavity. Tentacles of animals were removed from the body using forceps and immediately immersed in an ice-cold aqueous solution of 0.1%TFA. Tentacles were then subjected to three cycles of freezing and unfreezing. After the last cycle, the solution was centrifuged at 20.000xg for 60min at 4°C. The supernatant was recovered and filtered through a 0.45 micrometers filter, followed by a second ultrafiltration through a 0.22 micrometers filter. The protein from the crude extract was obtained by acid precipitation using a 10% trifluoroacetic acid solution. The acid precipitation was done at 4°C and the resulting solution was centrifuged at 4500xg for 10 minutes at 4°C. The protein pellet was then dissolved in water until complete dissolution and then lyophilized.

2.2 Purification and Isolation of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum*

The lyophilized crude extract obtained previously was dissolved in 200µL of TFA (0.1% trifluoroacetic acid; buffer A) until complete dissolution, followed by clarification by means of high-speed centrifugation (4500xg for 3min). The supernatant was then eluted on a Bondapack C18 reverse phase HPLC column (0.78 x 30cm). Protein elution was performed using a non-linear gradient of buffer B (66.6% of acetonitrile in 0.1% TFA) at

a constant flow rate of 2.0 mL/min. Chromatographic run was monitored at A214 nm and the fraction obtained was then lyophilized. The purity of the PLA₂ purified by HPLC was conducted as described by Hernandez-Oliveira et al. (2005) using a Tricine SDS-PAGE and MALDI-TOFF mass spectrometry.

2.2.1 Amino acid composition of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum*

The amino acid analysis was made according to the protocols described by Fonseca *et al.* (2006). Approximately one nmol of the purified protein was hydrolyzed with 6N HCl (200µL) in presence of 10µL of phenol. The amino acid hydrolysis was carried out at 106°C for 24 h; then the excess of HCl was removed and the hydrolyzed amino acids were redried with an aqueous solution (ethanol: water: triethylamine; 2:2:1 by vol). The post-column derivatization was performed with an aqueous solution of phenylisothiocyanate (ethanol: water: triethylamine: phenylisothiocyanate; 7:1:1:1 by volume). Either sample or amino acid standard was derivatized using a PICO-TAG amino acid analyzer system. The analysis of PTH-amino acid was conducted using a PICOTAG amino acid analyzer (Waters).

2.2.2 N-terminal amino acid sequencing of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum*.

The protein sequencing followed as previously described by de Oliveira et al. (2003). Basically, two milligrams of the purified protein were dissolved in 200µL of a 6 mol/L guanidine chloride solution (Merck, Darmstadt, Germany) containing 0.4 mol/L of Tris-HCl and 2mmol/L EDTA (pH 8.15). Nitrogen was blown over the top of the protein solution for 15 minutes, it was then reduced with DTT (6M, 200µL) and Nitrogen was blown again for 90 minutes. After this incubation time 80µL of iodoacetic acid were added to the solution in the tube (50mM of cold iodoacetic and carboxymethylated ¹⁴C-iodoacetic acid), nitrogen was again blown over the surface of the solution and the reaction tube was sealed. To remove the excess of reagent and to purify PLA₂ protein we used a preparative C5 reverse phase column; peptides were separated by linear gradient of acetonitrile (66% in 0.1% of TFA), at a constant flow rate of 2.5mL/ min for 90minutes; the first 15 minutes run only buffer A in HPLC so as to remove the salts and reagents; the chromatography was monitored at 214nm, after purification and PLA₂

active peak was lyophilized. The amino acid sequences of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum* (BcPLA₂) were determined using an Applied Biosystems model Procise f gas-liquid protein sequencer. The phenylthiohydantoin (PTH) derivatives of the amino acids were identified with an Applied Biosystems model 450 microgradient PTH-analysis.

2.4. Measurement of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum* activity

PLA₂ activity was conducted following the protocol described by Wen-Hwa et al. (1999) modified by Toyama et al. (2003) for 96-well plate. The standard assay mixture contained 200mL of buffer (10mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂, 100mM and NaCl, pH 7.8), 20mL of substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (4N3OBA), manufactured by BIOMOL, USA), 20mL of water and 20mL of PLA₂ giving a final volume of 260mL. After the addition of PLA₂ native or chemically modified (20µg), the mixture was incubated for up to 40min at 37°C, the absorbance being read at 10min intervals. Enzyme activity, expressed as the initial velocity of the reaction (Vo), was calculated based on the increase in absorbance after 20min. All assays were done in triplicate and the absorbance at 425nm was measured by a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The chemical treatment of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum* (BcPLA₂) with p-Bromophenacyl bromide (p-BPB) was done according to the protocol described by Landucci *et al.* (2000) and the treatment of BcPLA₂ with morin was made following as described by Iglesias *et al.* (2005).

2.5 Insulin secretion

The measurement of insulin secretion was conducted as described by Toyama et al. (2000). Briefly, rat islets were isolated by collagenase digestion of the pancreas. For static secretion, groups of five islets were first incubated for 45min at 37°C in Krebs-bicarbonate buffer of the following composition (in mmol/L): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 15 HEPES, and 5.6 glucose, supplemented with 3 g of

bovine serum albumin/L and equilibrated with a mixture of 95% O₂-5% CO₂, pH 7.4. The medium was then replaced by fresh Krebs-bicarbonate buffer and the islets incubated for a further 1h with medium containing different concentrations of glucose in the absence or presence of BcPLA₂ native and previous chemically modified BcPLA₂ with morin (BcPLA₂: morin) and modified with p-BPB (BcPLA₂: p-BPB). The insulin content of the medium at the end of the incubation period was measured by radioimmunoassay (Nogueira *et al.*, 2005).

2.6 Perfused kidney assay

Adult male Wistar rats (260-320g) were fasted for 24h with free access to water. The rats were anesthetized with sodium pentobarbitone (50mg/kg, i.p). After careful dissection of the right kidney, the right renal artery was cannulated via the mesenteric artery without interrupting blood flow as described by Bowman (1970) and modified by Fonteles *et al.* (1983). The perfusate consisted of a modified Krebs-Henseleit solution (MKHS) of the following composition (in mmol/L): 118.0 NaCl, 1.2 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄.7H₂O, 2.50 CaCl₂ and 25.0 NaHCO₃. Six grams of bovine serum albumin (BSA) were added to 100mL of MKHS, and dialyzed for 48h at 4°C against 10 volumes of MKHS. Immediately before the beginning of each perfusion protocol, 100mg of urea, 50mg of inulin and 50mg of glucose were added to every 100mL of perfusate and pH was adjusted to 7.4. In each experiment 100mL of MKHS were recirculated for 120 minutes. The perfusion pressure (PP) was measured at the tip of the stainless steel cannula in the renal artery. Samples of urine and perfusate were collected at 10min intervals for analysis of sodium and potassium level by flame photometry; inulin, as described by Wasler *et al.* (1955) and modified by Fonteles *et al.* (1983); and osmolality, measured in a vapor pressure osmometer (Wescor 5100C, USA). The chloride analysis was carried out using a LabTest kit. BcPLA₂ was added to the system 30min after the beginning of each perfusion. The renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR), excretions of sodium (ENa⁺), potassium (EK⁺) and chloride (ECI⁻) were also determined (Martinez-Maldonado and Opava-Stitzer, 1978).

2.7 Isolated perfused arteriolar mesenteric bed

The perfusion was done following the descriptions of McGregor (1965). Briefly, Wistar rats, weighing 280-350g were anesthetized with sodium pentobarbitone (50 mg/Kg, body weigh). After opening the abdomen, the pancreatic-duodenal, ileum-colic and colic branches of the superior mesenteric artery were tied. Then, the superior mesenteric artery was cleaned of the surrounding tissue and cannulated with a polyethylene tube (PE20). The intestine was separated from the mesenteric bed by cutting close to the intestinal border of mesentery. The mesenteric bed was perfused with Krebs solution containing: 114.0mM of NaCl; 4.96mM of KCl; 1.24mM of KH_2PO_4 ; 0.5mM of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 24.99mM of NaHCO_3 ; 2.10mM of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; and 3.60mM of glucose. The perfusion solution was kept warmed at 37°C and the mesenteric bed was perfused by a constant flow (4mL/min) and variable perfusion pressure was measured for 80min after the equilibration period. In this set up, the direct vascular effects of BcPLA₂ (3μg/mL/min.; n = 6), infused at a constant rate (0.1 mL/min), were examined and compared to the infusion of the vehicle alone at the same rate.

2.8 Statistical analysis

Results are shown as mean ± S.E.M of six experiments for each group. Differences between groups were compared by using Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) with significance set at 5%.

3. RESULTS

3.1 Purification and Isolation of PLA₂ from the *Bunodosoma caissarum*

Reverse phase HPLC chromatography of crude extract disclosed three PLA₂ active proteins named as BcPLA₂1, BcPLA₂2 and BcPLA₂3 (Figure 1). BcPLA₂1 was the main fraction and appears as one main of 14kDa after the treatment of the protein with DTT (1M) and in absence of these treatments BcPLA₂1, appear one protein band of approximately 30 kDa. The MALDI-TOF mass spectrometry showed that BcPLA₂1, has (showed one) a main peak of 14706Da.

3.2 Amino acid composition and sequencing of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum*

The N-terminal amino acid sequence of BcPLA₂1 showed high amino acid identity with other group III PLA₂ isolated from the Mexican lizard PA23 HELSU, HELSU, PA22 HELSU and with honey bee Apis PLA₂ and 1POC_A. BcPLA₂1 also showed significant homology with bee PLA₂ (Apis PLA₂ and 1POC_A). The N-terminal analysis showed that BcPLA₂1 has a conserved calcium binding region as well as a conserved catalytic site (Figure 2a). The figure 2b showed the amino acid composition results of BcPLA₂1, with the presence of 10 half cystein and a great amount of non polar and polar amino acid.

3.3 Enzymatic action and Insulin secretion.

BcPLA₂1 showed a moderate enzymatic activity using a 4N3OBA (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid) as substrate. Aliquots of BcPLA₂ were incubated with p-BPB (3.5µM) or the morin (3.5µM) for 30 minutes and the excess of reagent was cleaned by reverse phase HPLC; the chemically treated PLA₂ was used for experiments of enzymatic activity and insulin secretion. Enzymatic activity induced by native BcPLA₂1, (20µg/well; n=20) was reduced by chemical treatment with p-BPB (PLA₂1: p-BPB) and with morin (PLA₂1: Morin) (p<0.05, n=20) (Figure 3a). BcPLA₂1 strongly induced insulin secretion increasing in presence of high glucose concentration (p<0.05; n=12; figure 3b)

and did not induce any significant effect under lower glucose concentration (Glucose 2.8mM). The chemical treatment of BcPLA₂1, with morin abolished the effect induced by native BcPLA₂1, ($p < 0.05$; $n = 12$) whereas p-BPB only reduced the insulinotropic effect induced by BcPLA₂1, ($p < 0.05$; $n = 12$) (Figure 3b).

3.4 Renal Effects of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum*

Bunodosoma caissarum PLA₂ altered the renal parameters studied. The group treated with 1µg/mL BcPLA₂1 increased perfusion pressure (figure 4a), renal vascular resistance (figure 4b), urinary flow (figure 5a), glomerular filtration rate (figure 5b) at 60 min of perfusion. The sodium (figure 6a), potassium (figure 6b) and chloride (figure 6c) excretion also increased significantly when compared of the control group.

The group treated with 0.3µg/mL BcPLA₂1 increased perfusion pressure (figure 4a) and renal vascular resistance (figure 4b) at 60, 90 and 120min. However, the urinary flow (figure 5a) and glomerular filtration rate (figure 5b) increased only at 90 and 120 min of perfusion when compared of the control group. The sodium, potassium and chloride excretion increased significantly after the infusion of the venom.

At a lower concentration of BcPLA₂1 (0.1 µg/mL) which was used in perfused kidney assay showed a similar response as the group treated with BcPLA₂1 at 0.3µg/mL. The main difference was that potassium excretion increased only at 90 and 120 min of perfusion.

3.5 Effects of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum* on mesenteric blood vessels.

BcPLA₂1 (3µg/mL/min) did not increase the perfusion pressure on mesenteric vascular bed. The perfusion pressure varied from control (PP =) to (41.60 ± 1.08 mmHg) after BcPLA₂1 infusion. Mesenteric blood vessels were submitted to contraction in the presence of phenylephrine ($_{\text{control}}\text{PP} = 38.93 \pm 0.97\text{mmHg}$ and $_{\text{Phe}}\text{PP} = 127.60 \pm 6.80\text{mmHg}$).

In fact it (PP) varied from 38.93 ± 0.97 mmHg (Control group) to 41.60 ± 1.08 mmHg (after BcPLA₂1 infusion).

4. DISCUSSION

PLA₂ isolated from the sea anemone is poorly characterized in the reports to date, if compared to snake venom PLA₂ or to those from other sources such as insects. The *Bunodosoma caissarum* extract displayed three main PLA₂ isoforms. The eletrophoretic analysis of BcPLA₂1 showed a typical monomer dimmer transition, which is responsible for increasing the enzymatic activity of PLA₂ (Toyama et al., 2005). Our results showed that BcPLA₂ was purified with a high molecular homogeneity.

The amino acid residues found in the positions 6 – 14 (W10, G12, G14) are the ones proposed to be the Ca²⁺ binding segment, similarly found in other group III secretory PLA₂ from the lizards, bee venoms and human group III PLA₂. The amino acid residues corresponding to positions 29 to 40 correspond to the catalytic site that displayed H(36) and D(37) corresponding to H(48) and D(49) of the catalytic site of the enzymatically active pancreatic PLA₂. According to our amino acid alignment results both these segments are highly conserved for all amino acid sequences listed in the figure 2 with amino acid sequence identity of approximately 90%. The presence of 10 half cystein as determined by amino acid analysis suggests that BcPLA₂1 expresses 5 disulphide bridges. These results strongly suggest that BcPLA₂1 is a novel PLA₂ of the same group III of the PLA₂ from the bees (*Apis mellifera*) and lizards (*Heloderma suspectum*) The primary structure of group III PLA₂s is distinct from that of group I and II PLA₂s, and only the Ca²⁺-loop and the active site are conserved in these group III PLA₂. The overall three dimensional structure of bee venom group III PLA₂ however reveals the striking features of the PLA₂ fold including a well-defined Ca²⁺-loop, three large α -helices, and a β -wing-like structure. Thus BcPLA₂ may have the same molecular properties as those of bee or lizard PLA₂.

BcPLA₂1 belongs to group III PLA₂ similar to that found in the bee and lizard and in this case this PLA₂ stimulates insulin secretion only at high glucose concentration. Glucose-induced insulin secretion depends on the metabolism of this sugar to increase the ATP/ADP ratio that in turn blocks K⁺ATP channels and causes B-cell membrane depolarization. The resulting massive influx of Ca²⁺, mainly through the Ca²⁺ voltage-dependent L-type channels, increases cytosolic Ca²⁺ concentration and stimulates insulin secretion (Nogueira et al., 2005). Our results suggest that insulinotropic effect

induced by BcPLA₂1 was strongly dependent on glucose since this effect was observed for high glucose concentration in the incubation medium.

Despite numerous studies, the molecular basis for the selective and specific pharmacological action of PLA₂s of *Bunodosoma caissarum* venom is still unclear. Basically, the primary targets should be located outside the cell, and thus the mechanism of action could involve: 1) the intrinsic catalytic activity of venom PLA₂, i.e., its ability to release potent biologically active fatty acids and lysophospholipids from membrane lipids; 2) the interfacial binding of PLA₂ to the membrane lipid bilayer which, without any phospholipids hydrolysis, may affect cellular functions by perturbing cellular membranes; and 3) the binding of venom PLA₂ to specific proteins located at the cell surface (Lambeau and Lazdunski, 1999; Valentin and Lambeau, 2000). Our results using the BcPLA₂ treated with morin suggest that the enzymatic activity of BcPLA₂1 is not crucial for the pharmacological activity of this PLA₂. Both morin and p-BPB strongly decrease the enzymatic activity of PLA₂; p-BPB specifically binding to His residues on the active site of PLA₂ (Landucci et al., 2000); whereas morin strongly inhibits the enzymatic activity of PLA₂ by altering the three dimensional structure of the PLA₂ as shown by Igliesias et al. (2005).

BcPLA₂1 produced renal vascular and glomerular alterations such as increase in perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow, glomerular filtration rate and electrolytes transport.

It is known that several PLA₂s isolated from snakes affect renal haemodynamics on isolated kidney perfusion. Barbosa *et al.* (2002) and Machado Braga *et al.* (2008) obtained similar results with the PLA₂ isolated from *Bothrops moojeni* and *Bothrops insularis* venoms, respectively. These PLA₂s from *Bothrops* venoms caused an increase in perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow and glomerular filtration rate, similar effects were obtained with BcPLA₂1. However, BcPLA₂1 increased potassium transport and did not cause changes in sodium and chloride transport, while PLA₂s from *Bothrops* venoms reduced sodium and chloride transport and did not alter potassium transport.

Mizuno and Coworkers (2007) showed that the venom of the sea anemone *Phyllodiscus semoni* induced severe renal injuries when injected intravenously in rat. It

caused glomerular abnormalities consisting of severe endothelial damages which include mesangiolytic and glomerular epithelial damage and extensive tubular epithelial damage including necrosis extending from the renal cortex to outer medulla.

Venoms probably exert their effects on cells and tissues by means of pharmacological properties determined by several biologically active components (Monteiro *et al.*, 2001).

The model of mesenteric blood vessels permitted the observation that BcPLA₂1 did not alter basal perfusion pressure on mesenteric vascular bed. This result suggests that the increase in renal perfusion pressure and in renal vascular resistance, previously observed in isolated perfused rat kidney, did not occur by direct BcPLA₂1 action on renal vasculature.

In conclusion, PLA₂ isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*, a group III phospholipase, might have promoted indirect renal effects, and induced insulin secretion in the presence of high glucose concentration.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

5. REFERENCES

- Abdulkader, R.C., [Barbaro, K.C.](#), [Barros, E.J.](#), [Burdmann, E.A.](#) (2008). Nephrotoxicity of insect and spider venoms in latin America. [Semin Nephrol.](#) 28(4), 373-82.
- Alés, E., Gabilan N.H., Cano-Abad, M.F., Garcia, A.G., and López, M.G. (2000). The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca^{++} in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 275(48), 37488–95.
- Alves, R.S., do Nascimento, N.R., Barbosa, P.S., Kerntopf, M.R., Lessa, L.M., de Sousa, C.M., Martins, R.D., Sousa, D.F., de Queiroz, M.G.R, Toyama, M.H., Fonteles, M.C., Martins, A.M.C, Monteiro, H.S.A (2005). Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 46(3), 271-6.
- Amora, D.N., Sousa, T.M., Martins, A.M., Barbosa, P.S.F., Magalhães, M.R., Toyama, M.H., Fonteles, M.C., de Menezes, D.B., Monteiro, H.S. (2006). *Effects of Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 47(3), 260-4.
- Anderluh, G., Macek, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*). *Toxicon.* 40, 111–124.
- Barbosa, P.S., Havt, A., Faco, P.E., Souza, T.M., Bezerra, I.S., Fonteles, M.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C., Monteiro, H.S.A. (2002). Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 40, 1427-1435.
- Bertazzi (2003). Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system *in vivo*. *Toxicon* 41(4), 501-8.
- Bosmans, F., Tytgat, J. (2007) Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na^+ channels. *Toxicon* 49(4), 550-60.

Bowman, R. H. (1970). Gluconeogenesis in the isolated perfused isolated rat kidney. J. Biol. Chem, 245, 1604-1612.

Bowman, R.H.J., Maack, T. (1974). Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and eletrolyte in perfused rat kidney, Am J. Physiol. 226, 1604-1612.

[Cooper, R.A., de Freitas, J.C., Porreca, F., Eisenhour, C.M., Lukas, R., Huxtable, R.J. \(1995\).](#) The sea anemone purine, caissarone: adenosine receptor antagonism. *Toxicon*. 33(8), 1025-31.

Cunha, R.B., Santana, A.N., Amaral, P.C., Carvalho, M.D., Carvalho, D.M., Cavalheiro, E.A., Maigret, B., Ricart, C.A., Cardi, B.A., Sousa, M.V., Carvalho, K.M. (2005). Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 45(2), 207-17.

Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L., Lazdunski, M. (1998). Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J Biol Chem*. 20, 273(12)

Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, L., Lazdunski, M. (2003). APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol*. 64(1), 59-69.

Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J*. 23(7), 1516-25, 2004.

De Oliveira, D.G., Toyama, M.H., Martins, A.M.C., Havt, A., Nobre, A.C.L., Marangoni, S., Camara, P.R., Antunes, E., de Nucci, G., Beliam, L.O.S., Fonteles, M.C., Monteiro,

H.S.A. (2003). Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 42 (1), 53-62.

Facó, P.E., Bezerra, G.P., Barbosa, P.S.F., Martins, A.M.C., Guimarães, J.Á., Ferreira, M.L., Monteiro, H.S.A. (2005). Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(6), 479-482.

[Freitas, J.C., Sawaya, M.I. \(1990\).](#) Increase of mammalian intestinal motility by the iminopurine caissarone isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon*. 28(9), 1029-37.

[Freitas, J.C., Sawaya, M.I.](#) (1986). Anomalies in sea-urchin egg development induced by a novel purine isolated from the sea-anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* 24(8), 751-5.

Fonseca, F.V., Antunes, E., Morganti, R.P., Monteiro, H.S.A., Martins, A.M.C., Toyama, D.O., Marangoni, S., Toyama, M.H. (2006). Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein Journal* 25(3), 183-192.

Fonteles, M.C., Cohen, J.J., Black, A.J., Wertheim, S.J. (1983). Support of kidney function by long-fatty acids derived from renal tissue, *Am. J. Physiol.* 244, 235-246.

Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A. (2000). Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931–943.

Havt, A., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A. (2001). The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. *Toxicon* 39, 1841-1846.

Hernandez-Oliveira, S., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. (2005). Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA(2) from *Crotalus durissus terrificus* (South american rattlesnake) venom. *Protein Journal* 24(4), 233-242.

Yamamoto, C., Tsuru, D., Oda Ueda, N., Ohno, M., Hattori, S., Kim, S.T. (2002). Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. *Immunology* 107(1), 111-7.

Iglesias, C.V., Aparício, R., Rodrigues-Simioni, L., Camargo, E.A., Antunes, E., Marangoni, S., Toyama, D.D., Beriam, L.O.S., Monteiro, H.S.A., Toyama, M.H. (2005). Effects of morin on snake venom phospholipase A(2) (PLA(2)). *Toxicon* 46(7), 751-758.

Kishimura, H., Ojima, T., Hayashi, K., Nishita, K. (2000). cDNA cloning and sequencing of phospholipase A2 from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 126(4), 579-86.

Landucci, E.C.T., Castro, R.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., de Nucci, G., Antunes, E. (2000). Inflammatory Oedema Induced by the Lys-49 Phospholipase A₂ Homologue Piratoxin-I in the Rat and Rabbit: Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochemical Pharmacology* 59, 1289 – 1294.

Lambeau, G., Lazdunski, M. (1999), Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 162–170.

Lee, W.H., Toyama, M.H., Soares, A.M., Giglio, J.R., Marangoni, S., Polikarpov, I., (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49

phospholipase A(2) from the venom of *Bothrops pirajai* Acta Crystallographica section D-Biological Crystallography 55, 1229 – 1230.

MacGregor, D.D. (1965). The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat, J. Physiol. 177, 21-30.

Machado Braga, M.D., Martins, A.M.C., Alves, C.D., De Menezes, D.B., Martins, R.D., Barbosa, P.S.F., De Sousa, I.M.O, Toyama, M.H, Toyama, D.O, Diz Filho, E.B.S, Fagunde, F.H.R , Fonteles, M.C, Monteiro, H.S.A. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon. 2008;51(2):181-90.

Macpherson, J.C., Jacobs, R.S. (2000). An 18.5kDa protein from the amebocyte of *Limulus polyphemus*, homologous to the previously described amebocyte aggregating factor, expresses alternative phospholipases A₂ activity. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 127(1), 31-44.

Malpezzi, E.L., Freitas, J.C. (1990). Antimitotic effect of an extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* on sea urchin egg development. Braz J Med Biol Res. 23(9), 811-4.

Malpezzi E, L.A., Freitas, J.C. (1991). Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Braz. J. Med. Biol. Res. 24, 1245–1249.

Malpezzi, E.L., Matsui, D.H., Groote, S.C., Freitas, G.M., Santelli, G.M., Fernandes, J.B. (1993). Antitumoral activity in an organic extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Toxicon 33, 291.

Martinez-Maldonado, M., Opava-Stitzer, S. (1978). Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea, J. Physiol. 280, 487-497.

Martins, A.M.C., Guedes, E.O., Menezes, D.B., Monteiro, H.S.A., Fonteles, M.C. (1998). Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36, 1441-1450.

Mcintosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R., Olivera, B.M. (1995). Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J Biol Chem.* 270(8), 3518-26.

Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H. (1999). Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *NeuroReport* 10, 67–70.

Mizuno, M., Nozaki, M., Morine, N., Suzuki, N., Nishikawa, K, Morgan, B.P., Matsuo, S. (2007). A protein toxin from the sea anemone *Phyllodiscus semoni* targets the kidney and causes a severe renal injury with predominant glomerular endothelial damage. *Am J Pathol.* 1(2), 402-14.

Monteiro, H.S., da Silva, I.M., Martins, A.M., Fonteles, M.C. (2001). Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz J Med Biol Res.* 34(10), 1347-52.

Nevalainen, T.J., Quinn R.J., Hooper, J.N. (2004a). Phospholipase A₂ in Porifera, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 137(3), 413–420.

Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A., Fenner, P.J., Winkel, K.D. (2004b). Phospholipase A₂ in cnidaria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139(4), 731-5.

Nogueira, T.C.A., Ferreira, F., Toyama, M.H., Spoppiglia, L.F., Maragoni, S., Boschero, A.C., Carneiro, E.M., (2005). Characterization of the insulinotropic action of a

phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. *Toxicon* 45(2), 243-248.

Oliveira, J.S., Zaharenko, A.J., de Freitas, J.C., Konno, K., de Andrade, S.A., Portaro, F.C., Richardson, M., Santanna, O.A., Tambourgi, D.V. (2006a). Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: purification and biological characterization. *Biochim Biophys Acta* 1760(3), 453-61.

Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H. (2004). A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Actinaria villosa*. *Toxicon* 43(2), 225-8.

Rodrigues, F.G., Petretskil, J.H., Kanashiro, M.M., Lemos, L., da Silva, W.D., Kipnis, T.L. (2004). The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. *Mol Immunol.*;40(16):1149-56.

Talvinen, K.A., Nevalainen, T.J. (2002). Cloning of a novel phospholipase A₂ from the cnidarian *Adamsia cariniopados*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 132(3), 571-8.

Tambourgi, D.V., de Fernandes Pedrosa, M., Van Den Berg, C.W., Gonçalves de Andrade, R.M., Ferracini, M., Paixão Cavalcante, D., Morgan, B.P., Rushimere, N.K. (2004). Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol Immunol.*;41(8), 831-40.

Toyama, M.H., Carneiro, E.M., Marangoni, S., Barbosa, R.L., Corso, G., Boschero, A.C. (2000). Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and

their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474, 56-60.

Toyama, M.H., de Oliveira, D.G., Beriam, L.O., Novello, J.C., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S. (2003). Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 41 (8), 1033-8

Toyama, M.H., Toyama, D.O., Joazeiro, P.P., Carneiro, E.M., Beriam, L.O.S., Marangoni, L.S., Boschero, A.C. (2005). Biological and structural characterization of a new PLA(2) from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein Journal* 24(2), 103 – 112.

Valentin, E., Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488, 59-70.

Wen-Hwa, L., Toyama, M.H., Soares, A.M., Giglio, J.R., Marangoni, S., Polikarpov, I (1999). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A(2) from the venom of *Bothrops pirajai*", *Acta Crystallographica; Section A-D*, **55** , 1229-1230.

Walser, M., Davidson, D.G., Orloff, J (1955) The renal clearance of alkali-stable inulin. *J. Clin. Invest.* 34, 1520-1523.

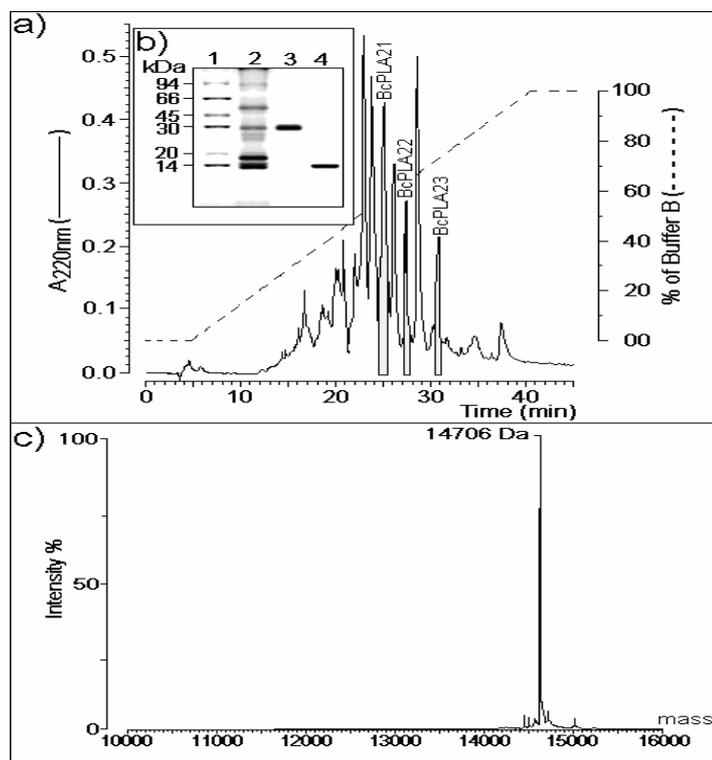


Figure 1. Purification and isolation of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum*. (a) Purification of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum* named as BcPLA₂₁, BcPLA₂₂ and BcPLA₂₃. (b) Electrophoretic profile of crude extract and BcPLA₂ in absence and in presence of DTT (2,3 and 4 respectively). (c) MALDI-TOF mass spectrometry of BcPLA₂₁.

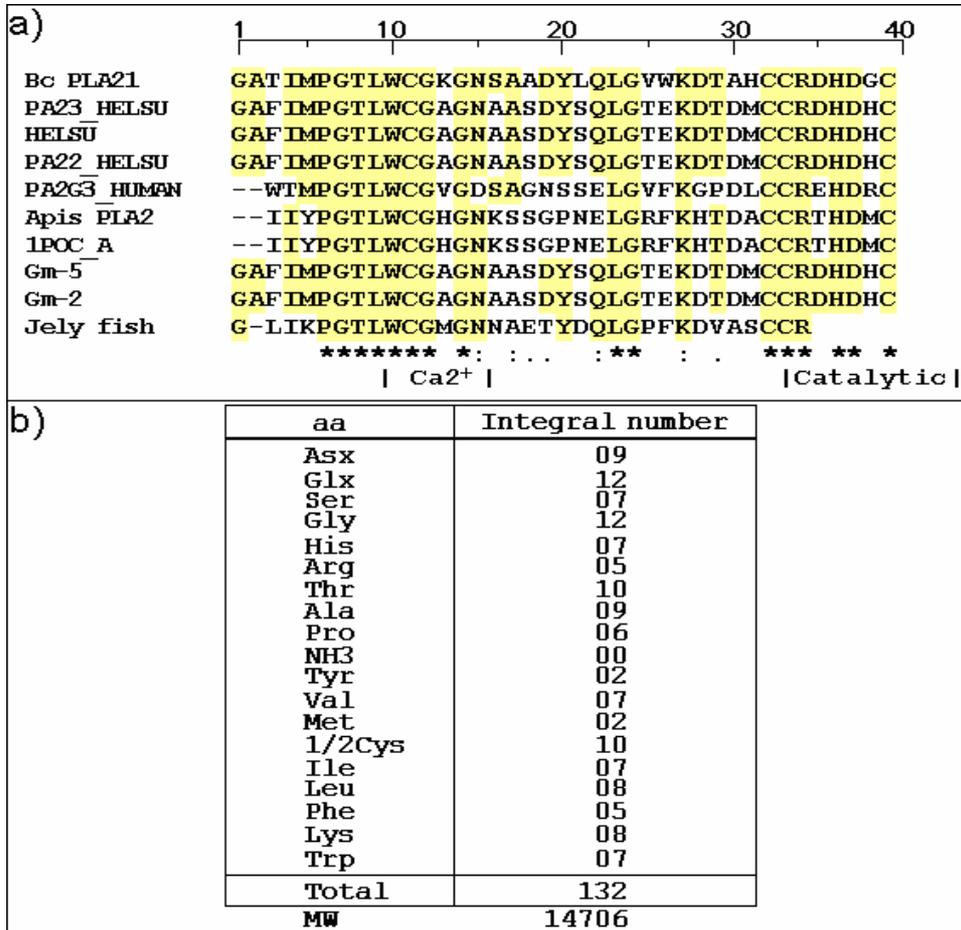


Figure 2. Amino acid composition and sequencing of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum*. (a) The amino acid sequence was carried out at 39th amino acid residue; analysis was brought about using a BLAST software package and alignment using a CLUSTAL software program. [Ca²⁺] and [Catalytic] correspond to the calcium binding region and the catalytic site, respectively. In the catalytic site, H (36) and D (37) are observed which correspond to His (48) for the pancreatic secretory PLA₂ and to Asp (49) of catalytically active group II. (b) the amino acid content was expressed as molar ratio by mol of protein and integration was done using a PICO-TAG software package. Asx = summation of Aspartic acid and Asparagine; Glx = summation of Glutamic acid and Glutamine. BcPLA₂1 = *Bunodosoma caissarum* Phospholipase A₂1.

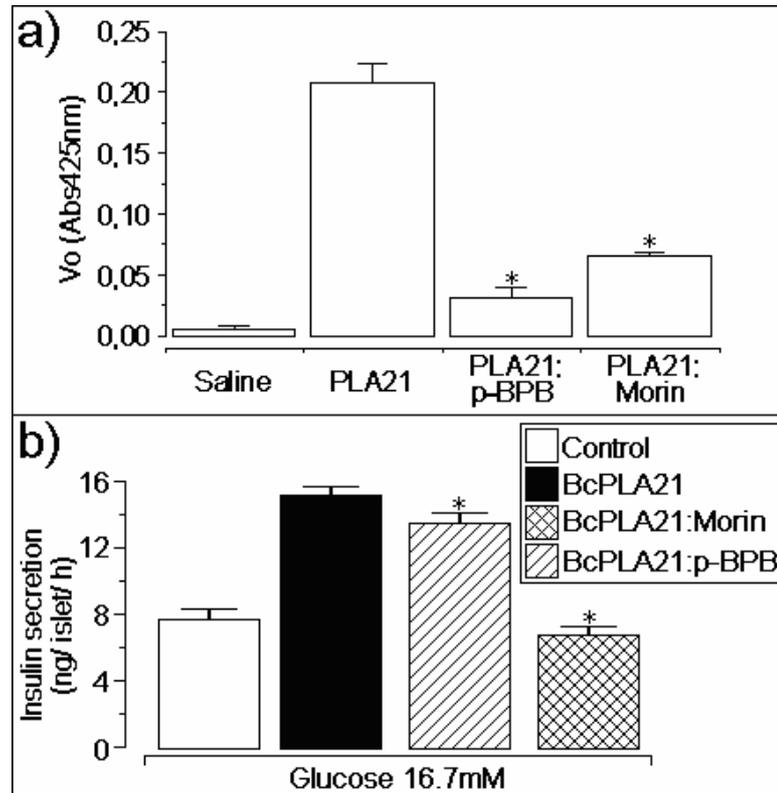


Figure 3. Enzymatic action of PLA₂ from *Bunodosoma caissarum* and insulin secretion. (a) Enzymatic activity of BcPLA₂1 and that of BcPLA₂1 chemically treated with morin and p-BPB. (b) insulinotropic effect of BcPLA₂1 and that of chemically treated BcPLA₂1. BcPLA₂1 = *Bunodosoma caissarum* PLA₂1.

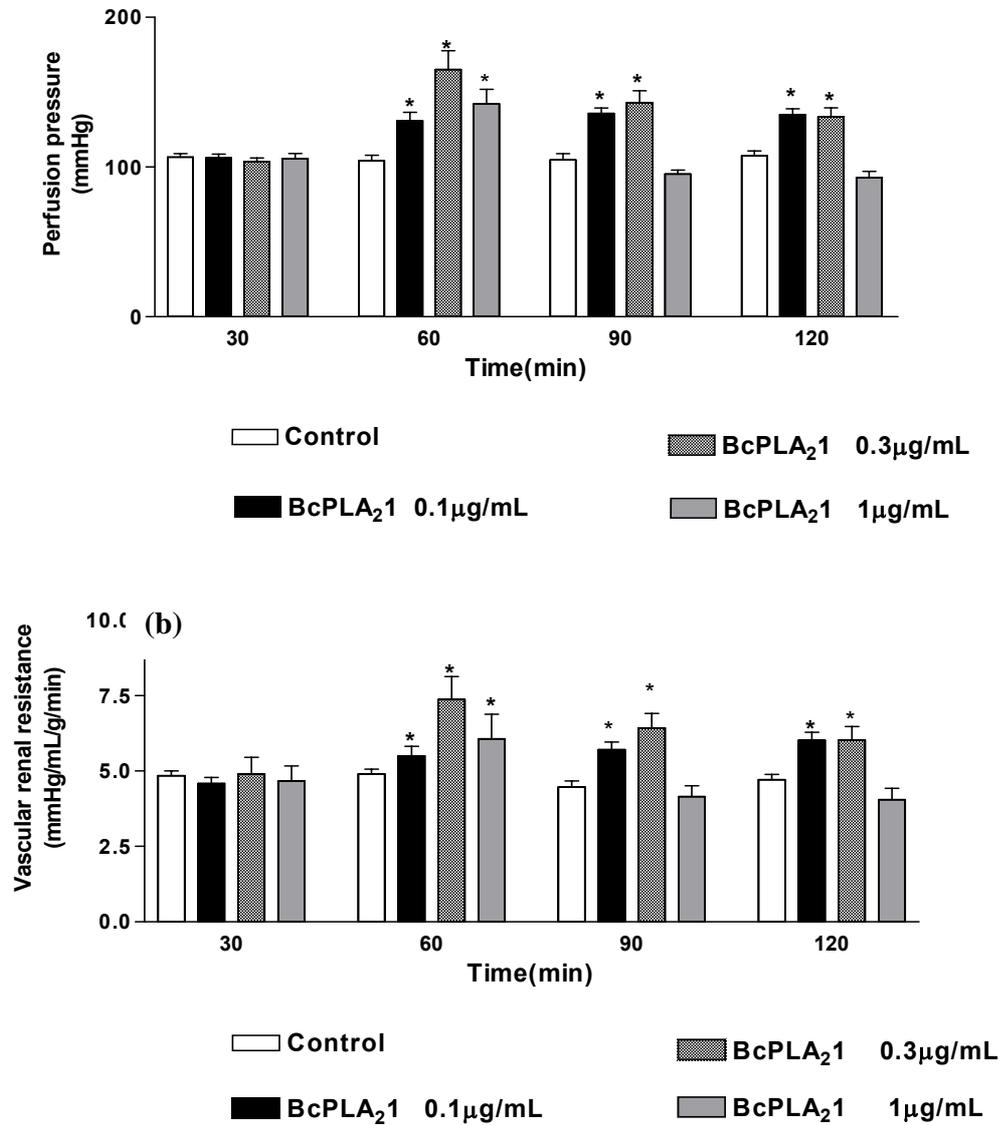


Figure 4. Effects of PLA₂ from *B. caissarum* (BcPLA₂1) on perfusion pressure (a) and renal vascular resistance (b) Data are expressed as mean ± SEM from six different animals. *p<0.05 compared to the corresponding control group for each interval. BcPLA₂1=*Bunodosoma caissarum* Phospholipase A₂1.

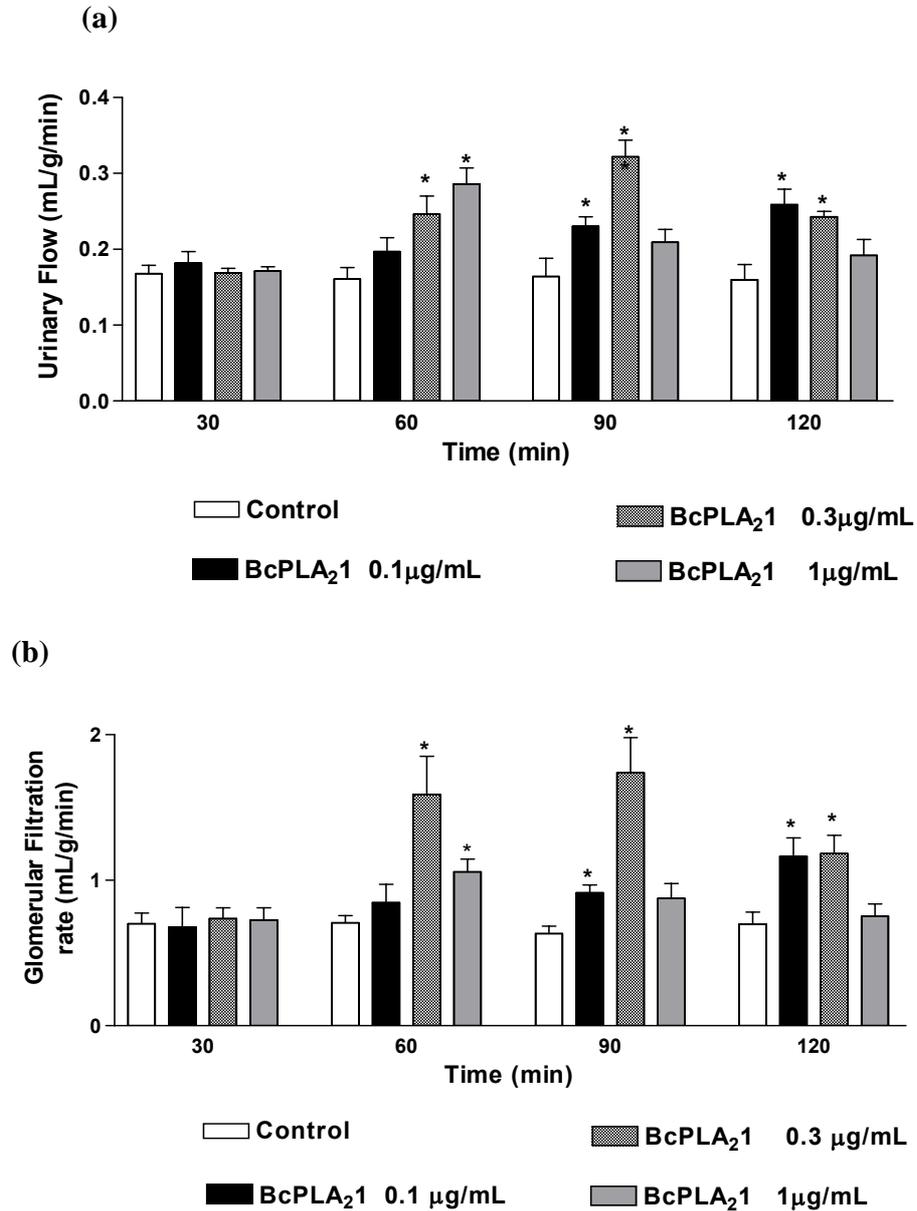


Figure 5. Effects of PLA₂ from *B. caissarum* (BcPLA₂1) on urinary flow (a) and glomerular filtration rate (b). Data are expressed as mean ± SEM from six different animals. *p<0.05 compared to the corresponding control group for each interval. BcPLA₂1=*Bunodosoma caissarum* Phospholipase A₂1.

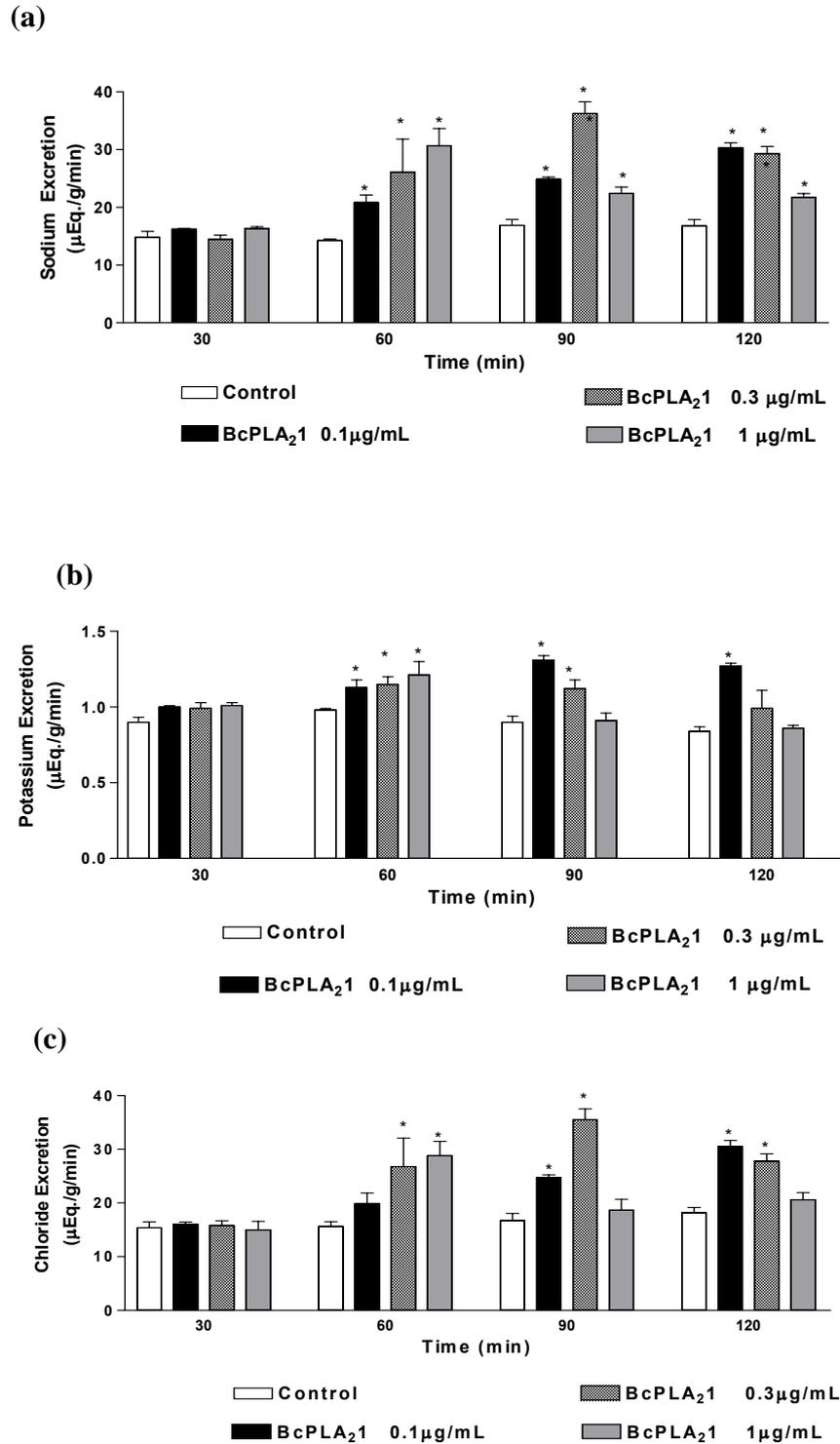


Figure 6. Effects of PLA₂ from *B. caissarum* (BcPLA₂₁) on sodium (a), potassium (b) and chloride (c) excretion. Data are expressed as mean \pm SEM from six different animals. * $p < 0.05$ compared to the corresponding control group for each interval. BcPLA₂₁ = *Bunodosoma caissarum* Phospholipase A₂1.