

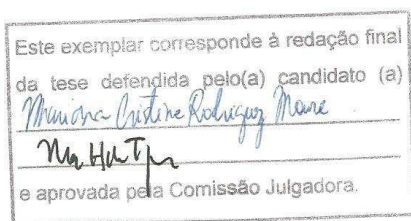
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Mariana Cristina Rodriguez Moure

**"Aumento de radicais livres induzidos pelo veneno de *Bunodosoma*
caissarum"**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
Co-Orientador: Prof. Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M865a

Moure, Mariana Cristina Rodriguez
Aumento de radicais livres induzidos pelo veneno de
Bunodosoma caissarum / Mariana Cristina Rodriguez
Moure. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Marcos Hikari Toyama, Kleber Luiz Araújo
e Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anêmonas-do-mar. 2. Toxinas marinhas. 3.
Atividade biológica. 4. Fosfolipase A2. 5. Viabilidade
celular. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Souza, Kleber Luiz
de Araújo e. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Increase of free radicals induced by the venom of *Bunodosoma caissarum*.

Palavras-chave em inglês: Sea anemones; Marine toxins; Biological activity; Phospholipase A2; Cell viability.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Hikari Toyama, Sérgio Marangoni, Luís Otávio Beriam.

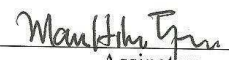
Data da defesa: 19/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 19 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Fernando José Zara


Assinatura

À Deus, que sempre me guia e me
dá forças para continuar.

Aos meus pais Denize e Miguel, pelo amor,
apoio e incentivo que me impulsionam
na busca de meus objetivos.

Ao Rafael, que com amor e paciência
me ajudou em todos os momentos.

Aos meus irmãos Emilio e Miguel pelo
carinho e amizade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, da UNESP - Campus São Vicente pela amizade, incentivo e orientação imprescindíveis.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro e Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero do Departamento de Farmacologia, pela acolhida em seu laboratório, pela amizade, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Kléber Luiz de Araújo e Souza pelas sugestões e auxílio na realização deste trabalho.

À doutoranda Simone C. Buzzo Oliveira pela amizade e ajuda incondicional sem a qual este trabalho não teria se realizado.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica e de Fisiologia, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica e Fisiologia do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo imprescindível apoio financeiro.

ÍNDICE

Índice de Figuras e Tabelas.....	vii
Abreviações.....	viii
Abreviações.....	viii
Abreviações de Aminoácidos	x
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Aspectos Gerais	2
1.2 <i>Bunodosoma caissarum</i> (Bc).	3
1.3 Toxinas do veneno de Anêmonas	4
1.3.1 Neurotoxinas.....	6
1.3.2 Phospholipases A2 (PLA2).....	7
1.3.3- Citolisinas	11
1.4. Espécies reativas de oxigênio	12
1.5- Sistemas antioxidantes.....	16
1.5. Estresse oxidativo	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Produtos e reagentes	28
4.2 Preparação do extrato proteico de <i>Bunodosoma caissarum</i>	28
4.3 Efeito do extrato de <i>Bunodosoma caissarum</i> em células produtoras de insulina RINm5F.	28
4.3.1 Transfecção de células produtoras de insulina.....	28
4.3.2 Cultura de células.....	29
4.4 Viabilidade celular pelo teste de MTS.....	29
4.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)	30
4.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes	31
4.8 Avaliação do edema em pata de rato	33
4.9 Atividade de Agregação Plaquetária.....	33
4.9.1 Preparo da suspensão de plaquetas	33
4.9.2 Medida da Agregação plaquetária	34
4.10 Eletroforese Bi-dimensional/	34
4.11 Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS	37
5.1- Atividade citotóxica do extrato proteico do veneno de <i>Bunodosoma caissarum</i> sobre células produtoras de insulina.....	37
5.2. Determinação de ROS intracelular formada após a incubação com o extrato do veneno da	40
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS.....	56
8. APÊNDICES.....	66
8.1 Resumos publicados em anais de Congressos	66
8.2 Apresentação de trabalhos	67

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1	4
Figura 2	9
Figura 3	9
Figura 4	10
Figura 5	13
Tabela 1	14
Figura 6	16
Figura 7	20
Tabela 2	20
Figura 8	22
Figura 9	39
Figura 10.	40
Figura 11.	42
Figura 12.	43
Figura 13.	44
Figura 14.	45
Figura 15.	47

Abreviações

ACD-C – acid citrate dextrose

ADP – adenosina difosfato

Bc – *Bunodosoma caissarum*

DTT- ditioneitol

DEAE – Cromatografia de troca iônica

EDTA – ácido etilenodiaminotetraácido

GPx- Glutathione Peroxidase

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IBSBF – Instituto Biológico Sessão Bacteriológico Fitopatológico

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

kDa – kilodalton

MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

N-terminal – amino-terminal

NMDA - N-methyl-D-aspartate

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PL – plaqueta lavada

PLA2 – fosfolipase A2

pI – ponto isoeletrico

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

PTC - feniltiocianato

SDS – dodecil sulfato de sódio

SOD- Superóxido desmutase

TFA – ácido trifluoroacético

TRIS – hidroximetil aminometano

UFC – unidades formadora de colônia

v/v – volume por volume

Abreviações de Aminoácidos

Aminoácidos	Abreviações (3 letras)	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

Resumo

A anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* possui mais de 40 proteínas diferentes, como mostrado através da eletroforese 2-D, o que pode levar a uma variedade de efeitos biológicos. Foram investigados também alguns parâmetros farmacológicos, onde se pode verificar a capacidade desta toxina em interagir com modelos de homeostase sanguínea, no caso em particular das agregações plaquetárias, assim como sua capacidade de indução à inflamação, através do edema de pata de rato, onde se observou um aumento de até 400% de modo proporcional a quantidade de material utilizada, sendo o máximo de 12µg/ml. Nos ensaios antibacterianos foi possível observar que o extrato de *B caissarum* apresentou diminuição de aproximadamente 97% da bactéria *Xanthomonas axonopodis*. O efeito toxicológico da *Bunodosoma caissarum* foi estudado através da utilização duas linhagens celulares pancreáticas tumorais RINm5F e RINm5F-Cat (esta última superexpressando a enzima catalase), onde após o período de exposição ao veneno (até 72 h) foi observado um aumento da morte na células RINm5F de modo dose-tempo dependente de até 60%, enquanto que as células RINm5F-Cat não apresentaram diminuição de sua viabilidade celular em nenhuma dose e tempo utilizada, mostrando que a *B caissarum* poderia causar a morte celular através do aumento do stress oxidativo. A determinação de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular foi medido através da fluorescência do DCFH-DA, formados através da incubação com o extrato de *B caissarum*, mostrando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio de mais de 100% quando comparadas com as células controle. A análise das principais enzimas antioxidantes mostrou que o extrato de *B caissarum* causou um aumento da atividade da enzima Cu/ZnSOD, tanto para as células RINm5F controle como para as com superexpressão da enzima catalase (RINm5F. Cat), enquanto que, a atividade da enzima glutathione peroxidase não sofreu nenhuma diferença nas células RINm5F controle ou nas RINm5F.Cat. e a enzima catalase não aumentou na células RINm5F e se manteve alta nas células RINm5F.Cat. Sendo assim, Bc provocou um aumento das espécies reativas de oxigênio, sendo principalmente de oxigênio superóxido. Resumindo, este trabalho visa contribuir de forma modesta ao entendimento da ação de toxinas de anêmonas do mar mostrando que a *Bunodosoma caissarum* possui características antibacteriana, citotóxica, inflamatório e trombolíticos que podem ser de grande

interesse biológico e farmacológico, e o possível mecanismo de citotoxicidade *B. caissarum* em células de mamíferos, que inclui aumento do estresse oxidativo com excessiva produção de peróxido de hidrogênio, pelo menos no caso das células produtoras de insulina.

Palavras chaves: anêmona do mar, toxina, atividade biológica, fosfolipase A2 e viabilidade celular.

Abstract

According to our studies, we could notice that the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* have more than 40 different protein, as showed through the electrophoresis 2-D, what may lead to a variety of biological effects. Also was investigated, some pharmacological parameters where we could confirm the ability of this toxin on interacting with models of blood homeostasis. In particular case of the platelet aggregation, as well as its ability to induce inflammation, through the edema in rat paw, where we could observe an increased response proportional to the amount of used material. In the antibacterial tests it was possible to observe that the Bc extracts presents a decrease in the numbers of several bacterias in a dose dependent way. The toxicological effect of the *Bunodosoma caissarum* was studied through the use of two pancreatic tumor cell lines RINm5F and RINm5F-Cat (the last one overexpressing the enzyme catalase), where after the period of exposure to the poison (till 72h), was observed an increase in RINm5F cell death, much greater than when compared with cells RINm5F-Cat, in every doses and administrated time, showing that the Bc could cause cell death through the oxidative stress increase. The DCFH-DA test measured the production of reactive oxygen species intracellularly formed by incubation with the Bc extract, showing an increase in the production of reactive oxygen species of more than 100% when compared with control cells. The analysis of the main antioxidant enzymes showed that the Bc extract caused an increase in enzyme Cu/ZnSOD activities, both cells RINm5F control and for the overexpression of catalase (RINm5F. Cat), while the glutathione peroxidase did not suffered any difference in RINm5F cell control or in the RINm5F.Cat. and the catalase enzyme did not increase in the RINm5F cells and remained high in cells RINm5F.Cat. So, we could believe that Bc caused an increase in the reactive oxygen species, being mainly the oxygen superoxide. Abstracting, this paper aims to contribute modestly to the understanding in molecular level of the sea anemone toxin action, showing that the *Bunodosoma caissarum* have antibacterial, cytotoxic, inflammatory and thrombolytic characteristics that can be of great biological and pharmacological interest, and the possible mechanism of cytotoxicity of the *Bunodosoma*

caissarum in mammals cell, certainly includes increased oxidative stress with excessive production of hydrogen peroxide, at least in the case of insulin-producing cells.

Key-words: sea anemone, toxin, biological activities, phospholipase A2 and cell viability.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

Os cnidários (do grego knide, irritante, e do latim aria [sufixo plural], como ou conectado com) constituem um filo que inclui os animais aquáticos de que fazem parte as hidras de água doce, as medusas ou águas-vivas, que são normalmente oceânicas, e os corais e anêmonas-do-mar (Solomon et al, 2002)

As anêmonas do mar pertencem à classe Anthozoa, ordem Actiniaria, perfazendo 26 famílias distintas. São conhecidas mais de 1.000 espécies em todos os mares do mundo. Observa-se que a fauna de anêmonas do mar do Estado de São Paulo, atualmente com 17 espécies, certamente deverá ter seu número bastante aumentado quando se empreender o estudo de espécies pequenas, relativamente comuns em ambientes crípticos do litoral paulista, e de profundidade maior (Brusca & Brusca, 2003).

O corpo dos cnidários é basicamente um saco formado por duas camadas de células, a epiderme, no exterior, e a gastroderme no interior, com uma massa gelatinosa entre elas, chamada mesogleia. Ao redor da abertura, chamada arquêntero, os celenterados ostentam uma coroa de tentáculos com células urticantes, os cnidócitos, capazes de ejetar um minúsculo espinho, o nematocisto que pode conter uma toxina ou material mucoso. Este mecanismo serve não só para se defenderem dos predadores, mas também para imobilizarem uma presa, como um pequeno peixe, para se alimentarem - os cnidários são tipicamente carnívoros. Algumas células da gastroderme da cavidade central (o celêntero) segregam enzimas digestivas, enquanto que outras absorvem a matéria digerida. Na mesogleia, encontram-se dispersas células nervosas e outras com função muscular que promovem o fluxo de água para dentro e fora do animal (Solomon, 2002).

As anêmonas do mar, assim como todos os cnidários, são providas de cnidoblastos com nematocistos, localizados nos tentáculos e cavidade gastrovascular. Estas células providas de potentes toxinas, são utilizadas principalmente na captura de alimentos e na defesa contra predadores (Brusca & Brusca, 2003).

Os estudos farmacológicos sobre toxinas marinhas ainda são modestos no Brasil, apesar de haver dados importantes em relação à *Bunodosoma caissarum*, uma anêmona do mar endêmica do litoral brasileiro (Hessinger & Lenhoff, 1988). Esse baixo número de estudos se deve, também, ao fato de existir poucos acidentes envolvendo esses cnidários (Haddad et al, 2003).

As toxinas de anêmonas do mar incluem vários polipeptídeos dentre os quais temos as neurotoxinas e citolisinas (Gondran et al, 2002). Além dos compostos protéicos temos uma importante contribuição dos compostos não protéicos, como as purinas, compostos de amônia quartenária e aminas biogênicas (Anderluh & Macek, 2002). A maior parte destas toxinas é produzidas pelo cnidoblasto, que são células altamente especializadas encontradas principalmente nos tentáculos (Watson, 1988).

1.2 *Bunodosoma caissarum* (Bc).

Bunodosoma caissarum, Correia, 1964, cnidário pertencente à classe Anthozoa, ordem Actiniaria, família Actinidae, é uma espécie endêmica e encontrada na costa brasileira, desde a cidade de Guarapari (ES) até a cidade de Rio Grande (RS) e nas ilhas oceânicas de Fernando de Noronha e Trindade. Habita regiões do médio-litoral e do infra-litoral, fixando-se em rochas grandes onde há cracas e mexilhões, e em áreas de costa aberta ou protegida, mas sujeita ocasionalmente a intenso movimento das ondas (Correia, 1964). A alta densidade de *Bunodosoma caissarum* em praias rochosas, rasas e de fácil acesso tem motivado e permitido a diversos autores brasileiros estudá-la sob diferentes pontos de vista. Estas anêmonas possuem coloração vermelha escura uniforme, uma base fortemente aderente e bem desenvolvida de cor creme com contorno circular ou lobulado.



Figura 1 - *Bunodosoma caissarum* (site do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo <http://www.usp.br/cbm/index.php/component/rsgallery2/item/328/asInline.html>)

1.3 Toxinas do veneno de Anêmonas

Toxicidade é um aspecto comum em acidentes com cnidários e um grande número de toxinas já foram identificadas nos nematocistos desses animais (Macek, 1992). As anêmonas do mar contêm uma gama interessante de compostos com atividades biológicas, incluindo potentes toxinas (Pennington et al, 1994; Freitas et al., 2003). Entre as primeiras proteínas isoladas estão peptídeos cardio-estimuladores e neurotoxinas de baixo peso molecular (Torres-Ramos & Aguilar, 2003). Posteriormente, foi mostrado que as anêmonas são ricas em neurotoxinas que atuam em canais de sódio, potássio e que lembram a estrutura de neurotoxinas escorpiônicas (Gasparini et al., 2004).

Compostos polipeptídicos têm sido isolados e identificados no extrato de cnidocistos, como as neurotoxinas que afetam os canais de sódio voltagem dependente e os canais de potássio (Malpezzi et al, 1990) e hemolisinas (Malpezzi et al, 1993).

Estudos demonstraram que a *Budonosoma caissarum* possui grandes quantidades de uma imunopurina denominada caissarona (Zelnik *et al.*, 1986). A primeira análise farmacológica realizada com a caissarona em ovos de ouriços do mar revelou ser esta uma substância indutora de poliespermia e de anomalias no desenvolvimento embrionário (Freitas e Sawaya, 1986). Este produto natural também estimula a atividade peristáltica em intestino de mamíferos, aumentando a frequência de descarga dos potenciais de ação dos neurônios de plexo mioentérico. Esta foi a primeira vez que encontrou-se um produto natural marinho com atividade antagonista de receptores purinérgicos com potencial terapêutico. O exame toxicológico dos nematocistos descarregados por estimulação elétrica de *B. caissarum*, revelou também a presença de diversos peptídeos neurotóxicos (Freitas e Sawayna, 1990). As neurotoxinas isoladas e sequenciadas da *Bunodosoma caissarum* (Malpezzi e Freitas, 1990) mostraram em ensaios *in vivo*, que são capazes de promover convulsões de maneira dose-depentende em ratos, e que estes efeitos decorriam da interação direta de componentes protéicos do extrato de anêmona sobre os receptores NMDA, não envolvendo o aumento de liberação de glutamato ou da presença de citolisinas.

Do extrato de *B. caissarum* foi isolado um peptídio denominado BcIII, de 48 resíduos de aminoácidos, com uma DL50=600ug/kg mostrando ser letal em siris e caranquejos. A BcIII parece interagir com o sítio 3 dos canais de sódio dependente e consequentemente atrasar a fase de inativação destes canais (Oliveira et al, 2004). Oliveira et al, (2006b) isolaram uma outra fração neurotóxica denominda BcIV cuja ação farmacológica se assemelha com a BcIII.

A atividade citolítica tem sido caracterizada pela presença de citolisinas que podem ser inibidas por lipídios de membrana como a esfingomielina, que preferencialmente inibem a ação de hemolisinas conhecidas como actinoporinas. Estes, são então compostos por proteínas de peso molecular variando de 15-20kDa (Oliveira et al 2004).

Recentemente Oliveira et al 2006b, descreveram a caissarolisina I (BcSI), uma hemolisina com atividade fosfolipásica A2 (PLA2), diferente de algumas actinoporinas conhecidas, como as StI e StII.

1.3.1 Neurotoxinas

Neurotoxinas isoladas de anêmonas do mar já descritas na literatura apresentam massa molecular em torno de 5,0 kDa e se ligam a canais iônicos voltagem dependentes (Simpson et al, 1990), sendo que a maior parte delas atua nos canais de sódio, embora no caso particular da *Bunodosoma granulifera* e da *Stichodactyla helianthus* atuem nos canais de potássio (Aneiros et al, 1993).

Estudos realizados por Romey et al (1976) mostram que toxinas isoladas de anêmona do mar (*Anemonia sulcata*) possuem uma ação farmacológica semelhante à veratridina, batracotoxina e a toxina de escorpião, que estimulam a liberação de neurotransmissores dos sinaptosomas. Esta ação é provavelmente devido à ação despolarizante da neurotoxina, que provocaria a entrada de Ca^{2+} na sinapse e consequente liberação do neurotransmissor.

Estudos realizados por Eno et al (2001) mostraram que o extrato total de *Bunodosoma cavernatus* é capaz de induzir experimentalmente mudanças na pressão sanguínea em ratos bem como efeitos recorrentes sobre o sistema cardiovascular. Em doses entre 2 a 20 microgramas o extrato protéico mostrou um efeito hipotensivo e já em doses maiores do que 20 microgramas, o extrato induziu um aumento rápido da pressão sangüínea.

Cunha et al (2005) determinaram recentemente a estrutura e função da toxina *cnagicum*, uma neurotoxina que atua em canais de sódio de que se caracteriza pela sua interação com células nervosas, produzindo alterações no sistema nervoso central. Sua atividade toxicológica gera quadros semelhantes ao da encefalite e epilepsia. Por esse motivo, a compreensão da estrutura e função desta toxina está sendo usada como uma ferramenta para a compreensão e etiologia da epilepsia. Adicionalmente, Gondran 2002, conduziu experimentos com extrato da anêmona *Bunodosoma caissarum* observaram convulsões dose-dependentes e os resultados sugerem a interação de toxinas presentes na *B. caissarum* com o sistema glutaminérgico sendo que esses efeitos não dependem da ação de citolisinas.

1.3.2 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado, baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). No entanto, as mais conhecidas e amplamente estudadas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (Verheij, et.al., 1980). Todas as PLA₂s de venenos contêm cerca de 120-135 aminoácidos, várias pontes dissulfeto e uma alta conservação da estrutura tridimensional. Além disso, a maioria dessas PLA₂s tem atividade catalítica, mas a caracterização sistemática destas tem conduzido para a identificação de diferentes variantes de PLA₂ como as PLA₂-like que são cataliticamente inativas (Gutierrez et al., 1995). Estas moléculas são enzimas que desempenham importante papel no metabolismo de lipídios com alta especificidade estereo específica para hidrólise da ligação 3sn-fosfoglicídeos na posição sn-2, sendo, portanto, denominada de PLA₂ (Dennis, 1997). O mecanismo para catálise das PLA₂ proposto por Scott e Sigler (1994) envolve uma interação altamente específica com glicofosfolipídios. Nesta catálise há participação de cálcio como cofator, o sítio ativo e molecular da água. As PLA₂ consistem-se numa superfamília de proteínas, que tem sido caracterizada como uma importante família de enzimas transdutoras de sinal, atuando como proteínas que interagem de forma específica com receptores do tipo M e N ou como efetores de atividades biológicas intracelulares (Dennis, 1997).

As PLA₂ secretórias são proteínas de baixo peso molecular, com a presença de pontes dissulfeto, com uma massa molecular de aproximadamente 13 a 15 KDa e são produzidas e secretadas por células (Gutierrez et al., 1995, Valentin e Lambeau, 2000). Estas proteínas normalmente requerem concentrações milimolares de Ca²⁺ para a atividade catalítica ótima. As PLA₂ são encontradas e distribuídas através de todo o reino animal e recentemente evidenciou-se a presença de PLA₂ em *Pinus americanus* (Valentin e Lambeau, 2000). As PLA₂ pancreáticas de mamíferos são produzidas e secretadas como zimogênios, com a presença de um heptapeptídio na região N-terminal na enzima inativa. Contudo, no caso das serpentes ou de outros animais peçonhentos, diversas isoformas de PLA₂ são constantemente sintetizadas. As isoformas geralmente apresentam graus diferenciados de atividade enzimática e

atividade farmacológica, podendo ser ou não dependentes da atividade enzimática, como evidenciados para as miotoxinas K49, que exibem várias atividades farmacológicas, desde a atividade neurotóxica, cardiotoxica, nefrotóxica, mionecrótica, anticoagulante, convulsionante, hipertensivo e edematogênico. Estas PLA2 K49 diferentemente das PLA2 D49 (cataliticamente ativas) são capazes de desencadear suas atividades biológicas independentemente da liberação do ácido araquidônico (Solomon, 2002).

Neste contexto, segundo Kini (2003), as PLA2 procedentes de veneno de serpentes compartilham uma similaridade em estrutura e função com as enzimas de mamíferos. No entanto, dentre as PLA2 de veneno de serpentes, muitas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos. Propõe-se que as PLA2 procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um “sítio específico”, devido à sua alta afinidade de se ligar a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica de PLA2 se dispõe pela presença de um sítio “farmacológico” em sua superfície, que é independente do sítio catalítico. Além destes mecanismos, nestas últimas décadas, receptores de proteínas PLA2 secretórias e de venenos tem sido identificados em mamíferos, sugerindo que as PLA2 do veneno possam exercer sua toxicidade através da interação com proteínas, que seriam, portanto, os mesmos receptores para as PLA2 secretórias produzidas pelos mamíferos, além da atividade enzimática. Até o presente momento foram caracterizados dois receptores denominados M e N. (Valentine e Lamdeau, 2000), (Figura 2).

A interação da alta afinidade da PLA2 com seu acceptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementariedade de carga, hidrofobicidade e forças de Van der Waals, que se dá entre o sítio farmacológico e o sítio alvo na superfície do receptor protéico ou acceptor. A PLA2 pode induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade enzimática. A identificação dos sítios farmacológicos tem o potencial para a exploração no desenvolvimento de novos sistemas úteis, devido ao amplo espectro de especificidade em tecidos e órgãos, para o “direcionamento” de proteínas específicas a um tecido alvo particular ou órgão (Solomon, 2002).

As pesquisas recentes buscam os novos papéis das PLA2 intracelulares, no entanto, várias enzimas secretadas têm sido registradas na maioria das células. Também têm sido encontrados vários novos papéis das PLA2 que diferem consideravelmente das PLA2 secretadas. A extensa literatura sobre

PLA2 indica a importância destas enzimas para muitas áreas de pesquisa em bioquímica, biologia molecular, biologia estrutural, toxicologia e medicina.

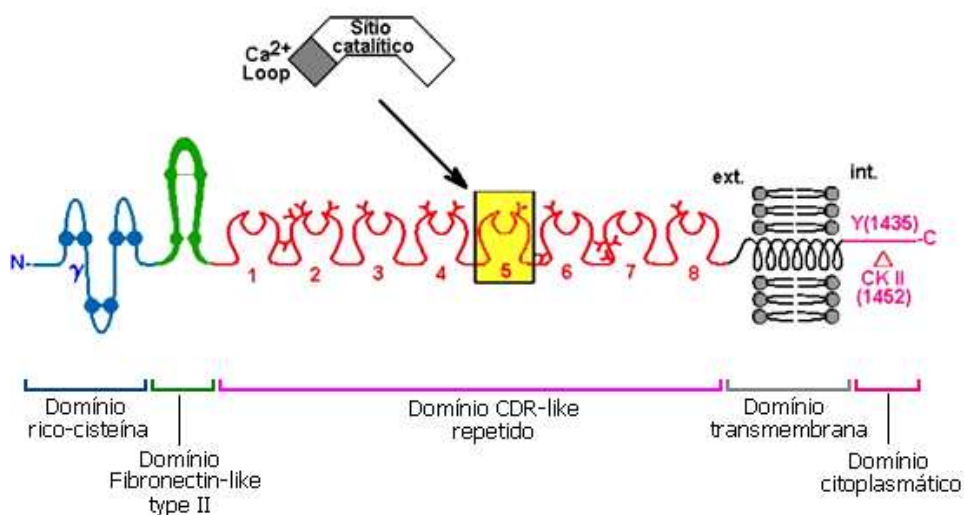


Figura 2 - Receptor tipo M para PLA2 secretórias e possível local de interação da PLA2 com o receptor.

1.3.2.1 Classificação das PLA2s

As fosfolipases são classificadas dependendo de sua estrutura, do seu mecanismo de catálise e de acordo com seu sítio de hidrólise sobre o triacilglicerol. Podendo desta forma, ser inicialmente classificadas em Fosfolipase A1, Fosfolipase A2, Fosfolipase B, Fosfolipase C, Fosfolipase D (Figura 3).

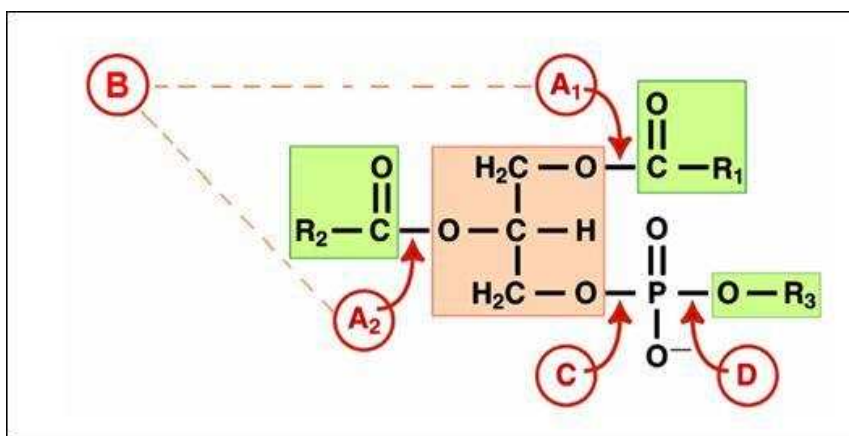


Figura 3 - Principais classes de lipases e seus respectivos sítios de atuação catalítica.

As PLA2, também podem ser classificadas segundo algumas características tais como, localização celular (secretórias ou citosólicas), de acordo com a massa molecular (de alta ou baixa massa), dependência ou não de cálcio para sua atividade enzimática, de acordo com o número de pontes dissulfeto. Desta forma as PLA2 conhecidas até o presente momento podem ser colocadas em algumas das classes de PLA2 de acordo com a Tabela 1. Nos venenos de uma forma geral, existem 3 grandes classe de PLA2 denominadas de PLA2 secretórias classe I, II e III, sendo que as PLA2 de venenos pertencentes às classes I e II são encontradas em veneno de serpentes da família Elapidae e Hydrophiliidae e pertencem a esta classe as PLA2 pancreáticas.

As PLA2 da classe II são predominantes em venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae e são estruturalmente relacionadas às PLA2 secretórias pancreáticas de mamíferos e de PLA2 secretórias presentes em fluidos sinoviais (Yang et al, 1994). Na última classe representativa de PLA2 secretórias presentes em veneno estão as PLA2 provenientes do veneno de abelhas e de lagartos, caracterizados por sua forte atuação neurotóxica (Scott e Sigler, 1994) (Figura 4).

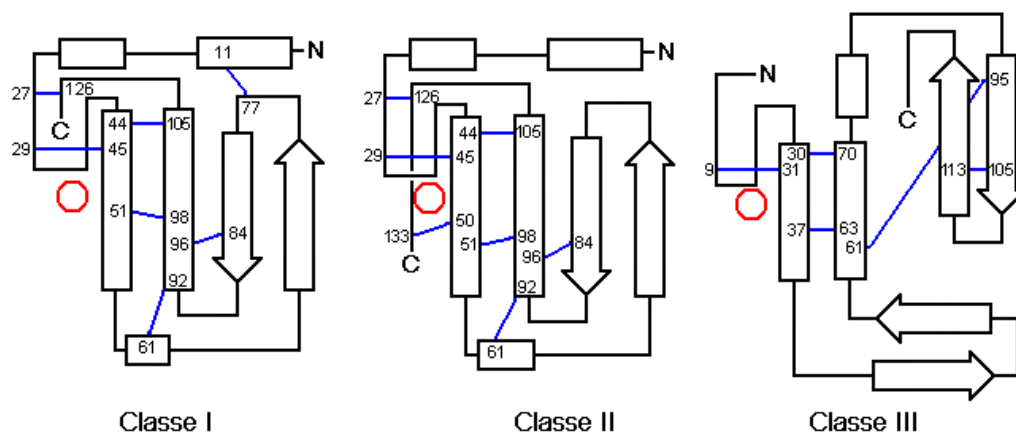


Figura 4 Esquema topográfico das PLA2 classe I, II e III. Os retângulos indicam as estruturas em α -hélice, as setas indicam as folhas β , as linhas azuis indicam as pontes de sulfeto e os círculos vermelhos indicam a presença do cálcio.

1.3.2.2 PLA2s de Anêmonas do mar

Estudos mostram que extratos totais de anêmonas do mar são capazes de secretar componentes protéicos semelhantes a PLA2, com atividade farmacológica semelhante às encontradas em venenos de abelhas, vespas, serpentes, salamandras, escorpiões e formigas. As PLA2 da anêmona do mar *Adamsia carciniopados* foram as primeiras PLA2 clonadas e sequenciadas (Talvinen e Nevalainen, 2002). A análise estrutural desta PLA2 mostra aspectos estruturais comumente encontrados em outras PLA2 como a presença de pontes dissulfeto (6 pontes dissulfeto), um sítio de atividade catalítica e um sítio de ligação ao cálcio.

Recentemente, uma nova PLA2 proveniente do anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* foi isolada e testada biologicamente (Martins et al, 2009). Entretanto, o efeito sistêmico das PLA2 de venenos de cnidários é desconhecido, e a estrutura molecular e propriedades farmacológicas/toxicológicas destes cnidários necessitam de maiores estudos.

1.3.3- Citolisinas

Existem evidências que anêmonas do mar produzem pelo menos quatro grupos de peptídeos citolíticos (citolisinas), que podem ser classificados de acordo com seu peso molecular. De todos os grupos o mais estudado são as citolisinas do segundo grupo (peptídeos formadores de poro inibidos pela esfingomielina, de massa molecular em torno de 20 kDa), que já foram clonadas e sequenciadas. As citolisinas têm sido usadas como modelo para estudar a interação de proteínas com membranas lipídicas-protéicas, com potencial aplicação no tratamento de tumores e como antimicrobiano (Alvarez et al, 2003).

Sendo assim, podemos observar que as anemônas do mar possuem potentes proteínas citolíticas que agem como toxinas, mostrando atividades diversas, como hemolítica e citolisinas com atividade específica na membrana de fosfolipídeos, particularmente a esfingomielina (Bernheimer e Avigad, 1976; Bernheimer e Rudy, 1986).

Entretanto, não está completamente compreendido o mecanismo de ação destes venenos citolíticos. Alguns afetam as membranas biológicas através da formação de poros ou canais em membranas naturais e em modelos de membranas lipídicas (Michaels, 1979; Tejuca et al, 1996; De los Rios et al, 1998).

A lise celular pode ser descrita, ao menos em parte, como um desequilíbrio iônico intracelular pela formação de canais iônicos (Zorec et al., 1990; Belmonte et al., 1993; Macêk et al., 1994; Meunier et al., 2000), entretanto não está suficientemente claro se esses efeitos são suficientes para explicar todas as ações biológicas desses venenos citolíticos.

Bartholomea annulata, uma anêmona do mar comum no mar de Caraíbas (México), mostrou um significativo efeito concentração-dependente de hemólise (avaliada como liberação de hemoglobina) e peroxidação de lipídios (como um índice de dano oxidativo de lipídios de membranas) nas células vermelhas do sangue. Além disso, a incubação dos eritrócitos na presença de qualquer um antioxidante geral, como a glutathione reduzida (GSH, 50 μ M), ou um quelante de ferro, desferrioxamina (DFA, 10 μ M), resultou em uma significativa atenuação de hemólise, em ambos os casos (Santamaria et al, 2002). Assim podemos ver que o envolvimento de radicais de oxigênio mediada por danos à membrana como um mecanismo potencial de toxicidade associada a hemólise deve ser discutida.

1.4. Espécies reativas de oxigênio

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, etc. (Harber, 2007)

Os radicais livres (ROS) podem ser definidos como espécies químicas, caracterizadas por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo (Gutteridge e Halliwell, 2000). Como os elétrons tendem ao pareamento, esta característica dos radicais livres confere maior instabilidade e aumento da sua reatividade química. Sua formação ocorre em um cenário de reações de

óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução.

ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro ou cinco elétrons, resultando na formação de H_2O , como mostrado na figura 2. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2\cdot$) e hidroxila ($OH\cdot$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ROS é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Valko et al 2007).

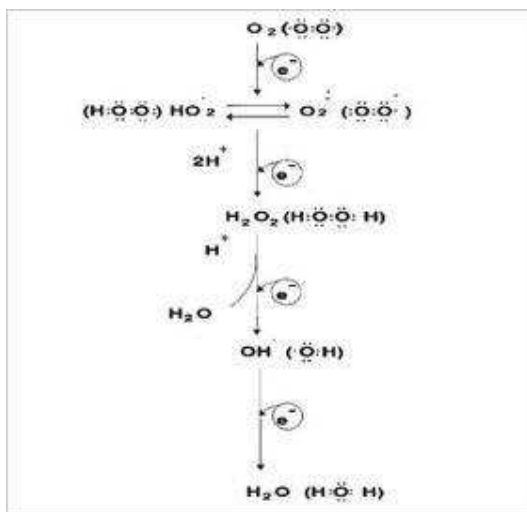
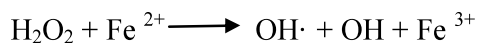


Figura 2 - Redução tetravalente do oxigênio molécula (O_2) na mitocôndria até a formação da água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. (Adaptação de Cohen MV.)

O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das ROS é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Gutteridge, 1981). Embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (Aust et al, 1990). Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formados diferentes tipos de ROS:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:

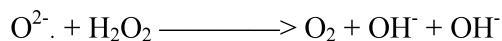


Tabela 1 - Exemplos de espécies reativas radicalares (radicais livres) e não-radicalares.

1. Radicais Livres

a. Espécies reativas de oxigênio (ROS) radicalares

O_2 -- Oxigênio molecular

$\text{OH}\cdot$ -- Hidroxil

$\text{O}_2^{\cdot-}$ -- Superóxido

$\text{HO}_2\cdot$ -- Peridroxil

b. Outros exemplos de radicais livres

$\text{RO}\cdot$ -- Alcoxil

$\text{NO}\cdot$ -- Óxido nítrico

$\text{RO}_2\cdot$ -- Peroxil

2. Espécies reativas de oxigênio (ROS) não radicalares

O_2 -- Oxigênio singlete

O_3 -- Ozônio

ONOO^- -- Peroxinitrito

H_2O_2 -- Peróxido de hidrogênio ou água oxigenada

Resumidamente, os radicais livres podem ter dois papéis importantes no organismo: quando produzidos de forma descontrolada e em condições de estresse metabólico podem gerar ROS que reagem

com moléculas de forma indiscriminada já em condições fisiológicas e de forma controlada as ROS podem desempenhar um papel relevante e crucial, como no mecanismo de defesa, sinalização celular, combate a infecções e na proliferação celular (Finkel e Holbrook, 2000).

Sendo assim, a idéia original para os radicais livres se baseia na sua capacidade de reagir de forma caótica, indiscriminada e cumulativamente com diferentes tipos de proteínas, porém, apesar das ROS terem de fato estas características, evidências experimentais mostram que podem exercer um papel sinalizador intracelular em condições fisiológicas e patológicas. Essa visão mais complexa do papel dos oxidantes é resumida na Figura 6.

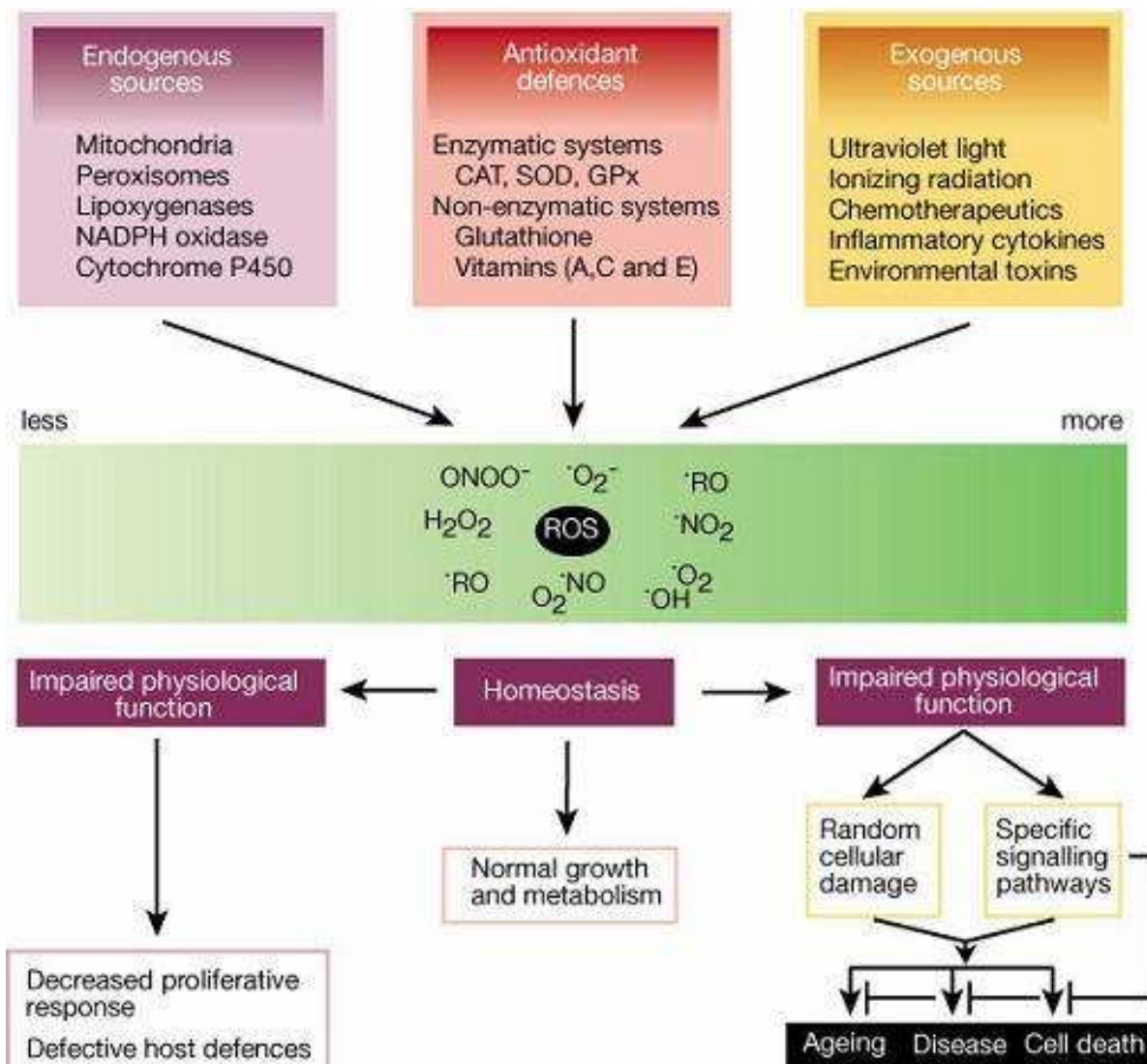


Figura 6 - Fontes e Principais atividades biológicas das ROSs. (Gutteridge e Halliwell, 2000).

1.5- Sistemas antioxidantes

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidante (como os ROS) e o sistema de defesa redutor. Como vimos, esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em como produto de origem externa, como radiação, medicamentos, dieta ou ainda hormônios, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, dentre outras (Bashan et al, 2009). Os sistemas antioxidantes são os responsáveis para que, em situações normais de produção

excessiva de radicais livres, seja capaz de atenuar ou mesmo reparar após oxidações, evitando assim, um dano oxidativo (Halliwell, 2007).

Este sistema de defesa pode atuar em duas linhas: como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, e outra linha de defesa que possui a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Turrens, 2003).

As enzimas antioxidantes possuem metais de transição ou selênio, que são cofatores, localizados em sítios catalíticos. Estes cofatores são importantes na regulação da expressão e atividade dessa enzima. Fatores endógenos e exógenos, tais como citocinas, hormônios e substratos (como por exemplo, a glicose), também exercem efeitos regulatórios sobre a atividade e expressão das enzimas antioxidantes. O TNF- α (fator de necrose tumoral), por exemplo, é uma citocina capaz de promover o aumento do mRNA da superóxido desmutase que possui dependente de manganês (MnSOD) em pulmão de rato sem afetar a expressão da superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Tsan et al, 1990).

Superóxido-dismutase (SOD)- A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Seu papel antioxidante se caracteriza pela capacidade de catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ , como na reação abaixo (Green et al, 2004):



ou ainda:



O radical O_2^- não reage com a maioria das moléculas biológicas, porém reage com outros radicais como NO, bem como resíduos de ferro presente em algumas enzimas. A SOD é biologicamente necessária porque a superóxido reage ainda mais rápido com alguns componentes como o radical de NO, que forma peroxinitrito. (Lenzen, 2008). Pelo fato de O_2^- não atravessar membranas facilmente, o radical que irá reagir com o O_2^- deve ser produzido no mesmo compartimento ou difundir até este local. Em termos quantitativos, a cadeia respiratória mitocondrial é o local de maior importância na geração de O_2^- (Green et al, 2004).

O produto final da dismutação do O_2 , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido continuamente em todas as células, apesar de difundir-se facilmente dentro das células e entre as células, ele não é muito reativo (Finkel e Holbrook, 2000), porém em concentrações micromolares pode ser citotóxico (Lenzen, 2008). O H_2O_2 é removido do meio intracelular por enzimas como a catalase e da família da peroxidases (glutathione peroxidase).

Glutathione-peroxidase (GPx) – Existem pelo menos quatro tipos de GPx nos mamíferos (GPx 1-4), todos contendo selenocisteína. A função bioquímica da glutathione peroxidase consiste em reduzir hidroperóxidos a álcoois e em reduzir peróxido de hidrogênio a água, utilizando a conversão da GSH a GSSG (doador final de elétrons que permite a regeneração da enzima) como visto na fig. 7.

As moléculas doadoras de elétrons, neste caso, são pequenas moléculas, como as glutathiones, sendo necessárias duas moléculas de glutathione para a remoção de uma molécula de H_2O_2 . Para que ocorra esta reação é necessária a participação de outras moléculas como o NADPH, o qual é responsável pela regeneração da glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (Margis et al, 2008).

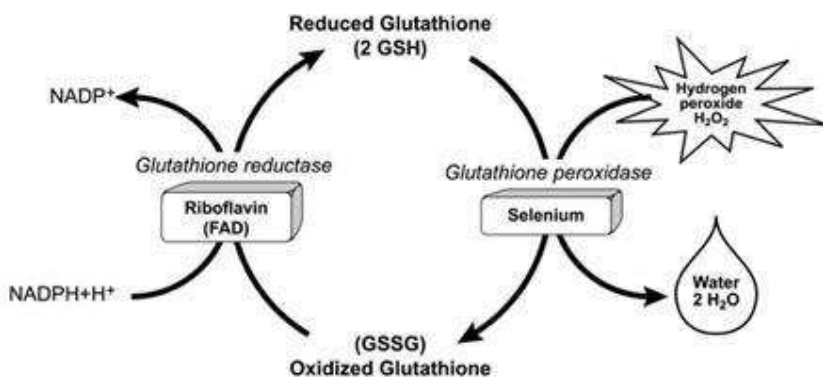
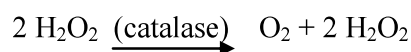


Figura 7- Figura mostrando a atividade da enzima glutathiona-peroxidase em que uma molécula de peróxido de hidrogénio é reduzida a duas moléculas de água, enquanto duas moléculas de glutathiona (GSH) são oxidadas numa reacção catalizada pela glutathiona peroxidase.

Catalase (Cat)- A catalase é uma hemoproteína citoplasmática localizada principalmente nos peroxissomos que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada no sangue, mucosas, rim e fígado, sendo sua atividade dependente de NAPH.



A catalase tem o mais alto número de turnover ($k_{\text{cat}} = 4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 1:40 000 000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, tornando-a numa enzima importante para a desintoxicação desta substância (Nelson et al, 2005).

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada. Os principais podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, beta-caroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), e os oligoelementos (Zinco, cobre, selênio, magnésio etc.), os bioflavonóides (derivados de plantas), etc.

Tabela 2 – Tabela mostrando as ROS relacionadas aos seus respectivos antioxidantes..

ROS	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Vitaminas, zinco, cobre, manganês, picnogenol, EDTA
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Catalase Fe^{2+}	
Peróxido lipídico ($COOH^{\bullet}$)	Glutathione peroxidase, selênio, cisteína	Vitamina E, selênio
Radical hidroxila ($HO^{\bullet}$)	Vitamina C, picnogenol, dimetil sulfóxido, EDTA, ácido dimercapto succínico e manitol	
Oxigênio singlet (1O_2)	Betacaroteno	

A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. A vitamina C ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ROS; porém, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação (Finkel e Holbrook, 2000).

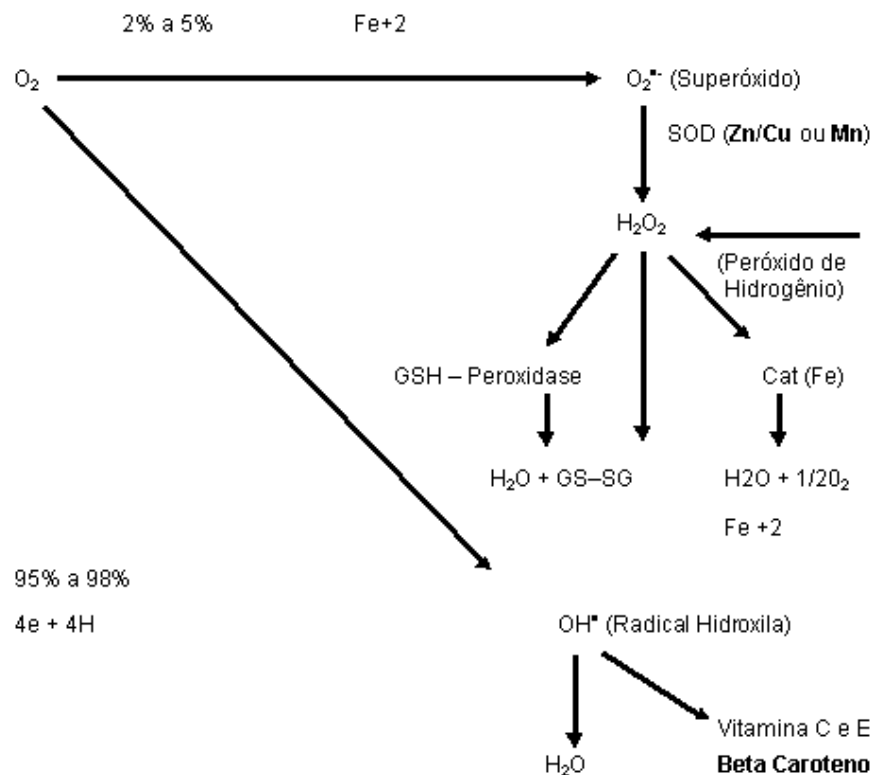


Figura 8 - Formação das ROS

SOD – Superóxido dismutase, Cat – Catalase, $O_2^{\bullet-}$ – Superóxido, O_2 – Oxigênio, GSSH – Glutathiona Oxidada, GPx – Glutathiona Peroxidase, H_2O – Água, $OH^\bullet$ – Radical Hidroxila, GSH – Glutathiona, H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio.

1.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados. O balanço entre a produção de ROS e o sistema antioxidante determina o grau de estresse oxidativo. Contudo, todos os órgãos e proteínas podem potencialmente sofrer danos causados pelo estresse oxidativo, sendo alguns mais sensíveis e susceptíveis que outros (Gutteridge e Halliwell, 2000; Reid e Durham, 2002).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que muitos parâmetros são negativamente afetados pelo aumento do estresse oxidativo, tal como as mudanças na permeabilidade iônica da

membrana citoplasmática de eritrócitos (Maridonneau et al, 1983), aumento na peroxidação lipídica (Rohn et al, 1998; Tavazzi et al, 2000), oxidação de grupos de proteínas sulfidríla (Snyder et al, 1988), e ativação de proteólise (Davies e Goldberg, 1987).

Dentre os danos causados pelas ROS têm sido relacionados a condições de inflamação, formação de tumores, envelhecimento, diabetes mellitus entre outras doenças (Newsholme et al, 2007).

Como visto, os estudos farmacológicos sobre toxinas marinhas ainda são modestos no Brasil, apesar de haver dados importantes em relação a *Bunodosoma caissarum*, uma anêmona do mar endêmica do litoral brasileiro (Hessinger e Lenhoff, 1988). Esse baixo número de estudos se deve, também, ao fato de existir poucos acidentes envolvendo esses cnidários (Haddad et al, 2003). A alta densidade de *Bunodosoma caissarum* em praias rochosas do litoral de São Paulo tem motivado e permitido a diversos autores estudá-la sob diferentes pontos de vista. Porém, informações sobre as suas atividades biológicas e farmacológicas, características bioquímicas e seu modo de ação são pouco conhecidas.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As anêmonas dos mar possuem uma característica principal: a presença dos cnidocitos, que ejetam substâncias com ações neurotóxicas, cardiotoxícas e de citolisinas (Oliveira et al, 2006), no entanto, os acidentes com anêmonas não constituem um grave problema de saúde pública. Por outro lado, desde a década de 60, alguns estudos mostraram a presença de prostaglandinas em corais do Caribe, deixando evidente o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico, despertando então o interesse da comunidade científica (Weinheimer e Spraggins, 1969; Correia et al, 2002).

A anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* é muito presente no litoral brasileiro, principalmente no litoral do estado de São Paulo. 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), citolítico (Uechi et al, 2005) e caracterização de um componente PLA₂ (Anderluh e Macek, 2002; Oliveira et al, 2006; Martins et al, 2009). No entanto, o estudos de seu extrato ainda são escassos, revelando a necessidade de estudos mais profundos de sua atividade biológica e de seus componentes.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos biológicos e citológicos do extrato total do veneno da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o modo de ação do extrato protéico do veneno, com ênfase ao excesso na produção de radicais livres sobre células de mamíferos (RINm5F, células produtoras de insulina) com ou sem superexpressão da enzima catalase, e sua indução a morte celular;
- Avaliar a importância das enzimas antioxidantes na citotoxicidade induzida pelo extrato protéico;
- Caracterização físico-química do extrato protéico através de eletroforese bi-dimensional;
- Caracterização biológica do extrato protéico através dos testes de:
 - atividade na agregação plaquetária;
 - ação antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
 - edema em pata de camundongo.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produtos e reagentes

Neste trabalho todos os reagentes químicos que foram utilizados para a condução dos experimentos, foram comprados da SIGMA-Aldrich, Bio-Rad, GE Health Care (Pharmacia), Supelco e Waters.

4.2 Preparação do extrato proteico de *Bunodosoma caissarum*

As anêmonas marinhas *Bunodosoma caissarum* foram coletadas na Ilha Porchat, São Vicente, durante os períodos de maré baixa, no período entre Julho e Setembro de 2007. As anêmonas foram transportadas vivas e mantidas em aquário durante 72 horas para eliminação do conteúdo gástrico. Os tentáculos foram removidos utilizando-se fórceps e imediatamente imersos em banho de gelo e, submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento para liberação das toxinas. Esta suspensão foi centrifugada a 20.000 g por 60 minutos a 4 °C, e o sobrenadante filtrado usando filtro de 45 micras seguida de uma segunda filtração em um novo filtro de 22 micras. As proteínas foram precipitadas do extrato total usando TFA 10% a 4 °C. O pellet de proteínas foi dissolvido em água e liofilizado.

4.3 Efeito do extrato de *Bunodosoma caissarum* em células produtoras de insulina RINm5F.

4.3.1 Transfecção de células produtoras de insulina.

A transfecção da isoforma 3 da peroxirredoxina, presente na mitocôndria, foi feita em células produtoras de insulina RINm5F, de acordo com Souza 2004. Para isso, foram utilizados plasmídeos específicos para células de mamífero (pcDNA3 Expression Vector e pcDNA3.1V5-His-TOPO, InVitrogen, Alemanha). Os cDNAs para PRDX 3 foram amplificados utilizando-se primers com sequências contendo sítios de restrição para Bam HI (sense) e *Eco* RI e purificados em resinas de sílica (PureLink™ PCR Purification Kit, InVitrogen, USA). O vetor foi subclonado em bactérias para propagação, que foram selecionadas utilizando-se ampicilina. Os vetores foram purificados usando

colunas para minipreps (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit and PureLink™ HiPure Plasmid Kit, InVitrogen, USA). Finalmente as células RINm5F foram transfectadas usando lipofectamina e os vetores. A seleção foi feita utilizando-se G418.

4.3.2 Cultura de células

Células produtoras de insulina RINm5F foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co.(St. Louis, MO, USA), suplementado com 10 mM de glicose, 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FCS), penicilina, estreptomicina e fungizona em uma atmosfera humidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. As células foram plaqueadas e cultivadas até confluência para utilização posterior. A exposição aos compostos foi feita em meio RPMI 1640, quando adequado sem adição de soro fetal. Posteriormente, as células foram coletadas para estudos. Células controle foram mantidas em meio RPMI sem adição dos compostos citotóxicos.

4.4 Viabilidade celular pelo teste de MTS

Para todos os experimentos de viabilidade celular utilizamos o método espectrofotométrico da redução para formazana, conhecido com MTS (CellTiter 96™ AQueous 5- Assay, Promega, USA), de acordo com as instruções contidas no manual. O ensaio fundamenta-se no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund & Puerner (1984) para a triagem de agentes citotóxicos em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio (MTS) e um agente acoplador de elétrons PMS. O MTS é biorreduzido pelas células a um produto que é solúvel no meio de cultura e, então, efetuada uma análise espectrofotométrica do corante incorporado, de acordo com Barltrop et al (1991). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

Células de mamíferos produtoras de insulina (RINm5F) controle ou com a superexpressão da enzima catalase. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^5 células/poço (para experimentos de 24 h), 5×10^4 células/poço (para 48 h), ou 2.5×10^4 células/poço (para 72 h) em 100 μ l de meio de cultura e incubadas por um período de 12h a 37°C antes de serem expostas ao extrato do veneno de *B. caissarum* (25 e 75 μ g/ml). As células foram expostas à toxina de anêmona do mar (*B. caissarum*) e incubadas por períodos de 24, 48 e 72 h a 37°C. A mistura PMS/MTS foi preparada segundo as indicações do fabricante e diluída para 15% em tampão Krebs. A viabilidade foi expressa como percentual da absorção de MTS na ausência dos compostos citotóxicos para cada um dos grupos.

4.5 Determinação de espécies reativas de oxigênio intracelular através do DCFH-DA.

A produção de ROS foi estimada por fluorimetria utilizando-se sonda fluorescente sensível à oxidação 5,6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) (DCFH-DA / *Molecular Probes*, Eugene, OR) (mantida a -20°C, protegida da luz). No momento do uso, a solução estoque (25mM diluída em etanol) foi diluída em PBS de forma que o volume final desta solução fosse o suficiente para realizar o experimento, segundo as recomendações de Silva, 2003 e Massoco-Salles Gomes 2003. O DCFH-DA é um corante permeável a membranas celulares que, uma vez dentro da células, é quebrado por esterases liberando o DCFH, que é impermeável a membranas. Esta forma intracelular pode ser então oxidada por H_2O_2 ou OH^- para sua forma fluorescente DCF. O ensaio foi realizado em duas concentrações de glicose, de maneira a minimizar efeitos do metabolismo glicolítico.

As células RINm5F controle ou com a superexpressão da enzima catalase, foram plaqueadas em placas de 10cm em uma concentração de 1×10^5 células/placa em 7ml de meio de cultura e incubadas por um período de 12h a 37°C antes de serem expostas ao extrato do veneno de *B. caissarum* (75 μ g/ml). As células foram expostas à toxina de anêmona do mar (*B. caissarum*) por período de 72 h a 37°C. Após este período, as células foram tripisinizadas e lavadas com tampão Krebs. As células foram plaqueadas em uma placa escura em uma concentração de 1×10^5 células/poço e incubada com tampão Krebs

contendo 25mmol/l de glicose e 10 µmol/l de DCFH-DA por 30 min a 37°C. A fluorescência foi medida a 460/530 nm de emissão usando um analisador (Fusion, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram expressos em AFU/µg de proteína.

4.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Atividade da superóxido desmutase:

O método da oxidação da xantina/xantina oxidase foi utilizado de acordo com as instruções contidas no manual (Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). A atividade da MnSOD foi mensurada através da inibição do Cu/ZnSOD com NaCN, como previamente descrito por Tiedge (1998). As células RINm5F e as células RINm5F.Cat foram mantidas com 75µg/ml de *B. caissarum* por um período de 72h. Para a medição foram utilizadas quarenta microgramas do total de proteínas das células controle e das tratadas.

Atividade da catalase:

As células RINm5F e as células RINm5F Cat. foram incubadas com 75µg/ml de *B. caissarum* por um período de 72h. As células foram coletadas com um “scrapel” e homogeneizadas por sonicação a 6 pulsos de 5 s com 5 s de intervalo entre os pulsos em tampão Hanks e os extratos obtidos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C por 20 min para remoção do material insolúvel. Após dosagem de proteína, alíquotas contendo 100 µg/ml de proteína foram transferidas e acrescentado 4 mM de H₂O₂. A seguir, amostras de 10 µl foram retiradas nos tempos 0-10 min e submetidas a ensaio colorimétrico (Glucose GOD PAP-Laborlab, Brazil), contra curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio e posteriormente lidas em aparelho espectrofotômetro (495 nm). A atividade da catalase foi obtida pela equação $[H_2O_2]_t = [H_2O_2]_{t=0} \times e^{-kt}$.

A atividade da enzima foi normalizado através do conteúdo de proteínas, que foi determinado através do método de Bradford.

Atividade da glutathione peroxidase:

A atividade da glutathione peroxidase foi mensurada através do método do desaparecimento do NADPH. Inicialmente as células RINm5F e as células RINm5F Cat. foram incubadas com 75µg/ml de B. caissarum por um período de 72h, após esse período as células tratadas e as células controle foram lavadas com tampão Krebs, tripsinizadas e sonificadas em 50mmol/l de tampão fosfato potássio (pH 7.0). Após centrifugação por 5min. a 13.000g, 20µg das proteínas do sobrenadante foram incubadas em placas contendo tampão fosfato, 1U por glutathione redutase, 10mmol/l de glutathione reduzida, 0,8mmol/l de NADPH, e 12 mmol/l de tert-butil-hidroperóxido até o volume total de 300µl. As reações foram mantidas a 25°C. A utilização do NADPH foi monitorado em 365nm a cada 1min por 10 min em placa no espectrofotômetro. Todas as atividades enzimáticas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas através do método de Bradford.

4.7 Ensaio Antibacteriano

Foram empregadas a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap) (IBSBF-1445) e a bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (IBSBF-979). Ambas as bactérias sobrevivem em aerobiose, meio nutriente (extrato de carne 3%, peptona 5%, NaCl 5%) em estufa a 28°C.

As bactérias (3×10^3 UFCs) foram incubadas com o extrato de *Bunodosoma caissarum* nas concentrações de 3, 9 e 12 µg/mL à temperatura ambiente e então pipetadas 200µl em suspensão, meio de cultura nutriente ágar, em placa de ELISA de fundo chato. As placas foram incubadas em estufa a 28°C e então monitoradas em espectrofotômetro a 630nm nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

O mesmo foi realizado com as bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

4.8 Avaliação do edema em pata de rato

De acordo com Antunes et al (1990), ratos Wistar machos (120-150g) foram anestesiados com halotano (inalação). O edema de pata foi induzido por uma única injeção subplantar do extrato de *Bunodosoma caissarum* (3-12 µg/pata do animal). O grupo controle recebeu solução salina. O volume da pata foi medido imediatamente após a injeção da amostra e selecionado os intervalos de tempo de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, usando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). Todas as amostras foram dissolvidas em solução salina estéril 0,9%. Os resultados foram expressos em volume da pata (mL) calculado pela subtração do volume basal pelo volume final. A área sobre a curva (AUC) foi também calculada e os resultados expressos como volume total do edema (ml/ pata).

4.9 Atividade de Agregação Plaquetária

4.9.1 Preparo da suspensão de plaquetas

Para este ensaio foi coletado sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos nos últimos 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), e centrifugado a 200 x g por 15 minutos a 20°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado a 800 x g por 12 minutos a 20°C na presença de iloprost 8 µM (1 µL de solução para cada 1 mL de plasma), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de plaquetas foi ressuspensionado em solução Krebs livre de Ca^{2+} e centrifugado a 800 x g por 12 minutos a 20°C. O processo foi repetido por mais duas vezes (Radomski e Moncada, 1983). Após a lavagem, as plaquetas (50µl) foram incubadas em tubos “Eppendorf”, com 950 µl de oxalato de amônia 1% por 10 min e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Neubauer espelhada, ajustada para 2×10^8 plaquetas/mL. Cloreto de cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das plaquetas lavadas (PL) possuía ACD-C (124 mmol/L $\text{Na}_3\text{-citrato}$, 130 mmol/L ácido cítrico e 110 mmol/L glicose) (1:10, v/v).

4.9.2 Medida da Agregação plaquetária

A medida de agregação foi realizada usando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc, Buffalo, NY). O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base para o aparelho que foi calibrado contra PL, que apresenta 100% de agregação, determinando-se um pico máximo. Com isso foi possível determinar uma amplitude para o registro de agregação deste plasma. A calibração foi realizada contra solução de Krebs (NaCl 118mM, NaHCO₃ 25mM, D-glicose anidra 5,6mM e KCl 74g/L). A suspensão de PL ou PRP (400 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas a 37°C. Os experimentos de agregação foram realizados em triplicatas, utilizando-se concentrações crescentes de 3, 9, 12 e 21 µg do extrato proteico do veneno da anêmona *Budonosoma caissarum* em suspensão de PL ou PRP. Como controle positivo foi utilizada a trombina.

4.10 Eletroforese Bi-dimensional

Foi realizada primariamente por eletroforese bi-dimensional. Para a primeira eletroforese em (focalização isoeletrica), amostras de proteínas liofilizadas foram solubilizadas em uma solução contendo 8M de uréia, 2M de tiouréia, 2% CHAPS, 28mM de DTT, 1,3% farmalytes (pH 3-10) e azul de bromofenol. “Dry stips” de 18cm, com uma faixa de pH não linear de 4-7 foram reidratados em 400µl desta solução por 30 horas em parafilme oleoso de baixa viscosidade. Estas tiras contendo 50µg de proteínas foram colocadas durante o processo de reidratação das tiras de isofocalização em um sistema Multiphor II a 20°C (Sanchez et al, 1997). A corrida eletroforética foi realizada em um gradiente linear de voltagem de 0V a 500V para 1000V hora, 500V para 2000V hora, um aumento linear de 500 a 3500V para 10000V hora seguindo por um passo final de 3500V para 35000V hora para uma voltagem final de 48000V hora. Após a primeira dimensão, as tiras individuais foram consecutivamente incubadas em uma solução de equilíbrio A (50mM Tris-HCl, pH 6,8; 6M de uréia; 30% glicerol; 4% de SDS e completado com 3,5mg de DTT) e B (45mg/ ml de iodoacetamida em lugar de DTT), por 15 minutos cada. Após o equilíbrio, proteínas foram separadas em gel de segunda dimensão de 10 – 12,5% de PAGE-SDS usando um sistema Rubi (Pharmacia) a 12W/gel. Após o equilíbrio as tiras foram seladas no topo de gel de

eletroforese usando uma solução seladora com 1% de agarose; 0,4% de SDS; 0,5M Tris-HCl). Os tampões utilizados para esta corrida eletroforética seguiram os mesmos descritos por Laemmli para gel de SDS (Laemmli, 1970). A corrida foi interrompida pela marca azul de bromofenol. Os géis de PAGE-SDS foram coradas “overnigh” com uma solução de Coomassie R350. A análise dos géis foi realizada em um sistema Melanie II (Bio Rad). Cerca de quatro géis foram analisados a fim de minimizar possíveis variações técnicas do procedimento eletroforético.

Após a digitalização das imagens, os géis de referência foram processados, retirando-se amostras de proteínas dos géis que foram fragmentados em pedaços menores, colocando-os em tubos eppendorf, secos e digeridas com tripsina grau massa. Os peptídeos foram então recuperados e separados por HPLC de fase reversa capilar e injetadas no Q-Toff (LNLS-Campinas). Os fragmentos gerados foram seqüenciados por espectrometria de massa em Q-Toff.

4.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM de n experimentos. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Student T ou por ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1- Atividade citotóxica do extrato proteico do veneno de *Bunodosoma caissarum* sobre células produtoras de insulina

Um *screening* para toxicidade celular da toxina de *Bunodosoma caissarum* sobre células RINm5F foi determinado utilizando-se o ensaio de viabilidade por MTS. Duas linhagens celulares de RINm5F, controle e superexpressando a enzima catalase (Cat) foram usadas. As células expostas ao extrato do veneno de *B. caissarum* tanto por 48 horas (Figura 9a) quanto 72 horas (Figura 9b) mostraram uma grande diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, células RINm5F superexpressando a enzima catalase, não foram afetadas pelo composto em nenhum dos tempos estudados. Este resultado está de acordo com a medida cinética (*time-course*) da viabilidade celular (Figuras 10a e 10b). Em qualquer tempo medido as células expostas ao veneno por 48 horas mostraram menor viabilidade que as células cultivadas na ausência do composto e o oposto pode ser observado com as células RINm5F superexpressando catalase, as quais não tiveram alteração na viabilidade em qualquer período medido a despeito da presença do veneno de *B. caissarum*. O possível mecanismo responsável pela citotoxicidade do veneno de *B. caissarum* inclui a produção excessiva de H₂O₂, pelo menos no caso exposto de células produtoras de insulina.

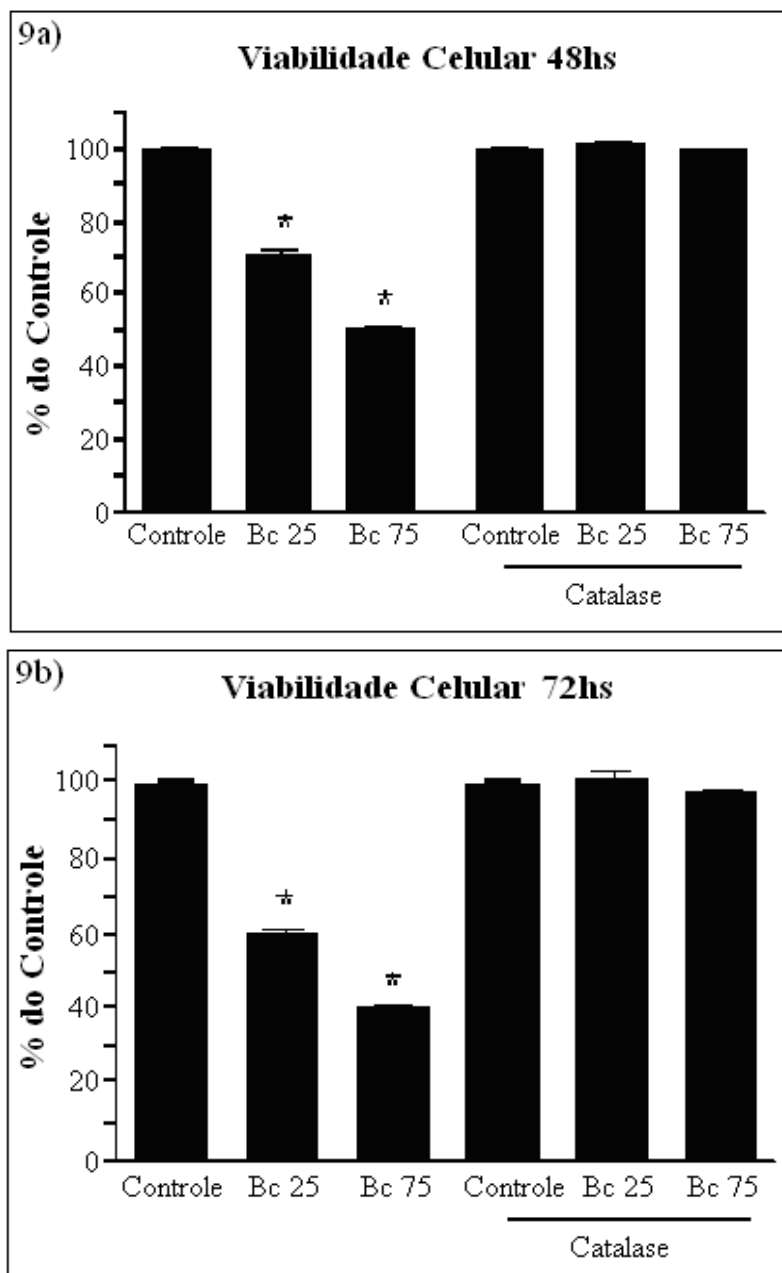


Figura 9. Efeito do extrato de *Bunodosoma caissarum* (Bc) na viabilidade da células RINm5F. As células foram plaqueadas 12 horas antes do experimento. As células produtoras de insulina RINm5F foram expostas ao extrato de Bc nas concentrações indicadas por 48 **(a)** e 72h **(b)**. Medições foram realizadas por 90 minutos utilizando o método do MTS. Não foram encontradas diferenças significativas para o tempo de exposição de 24h (não mostrada).

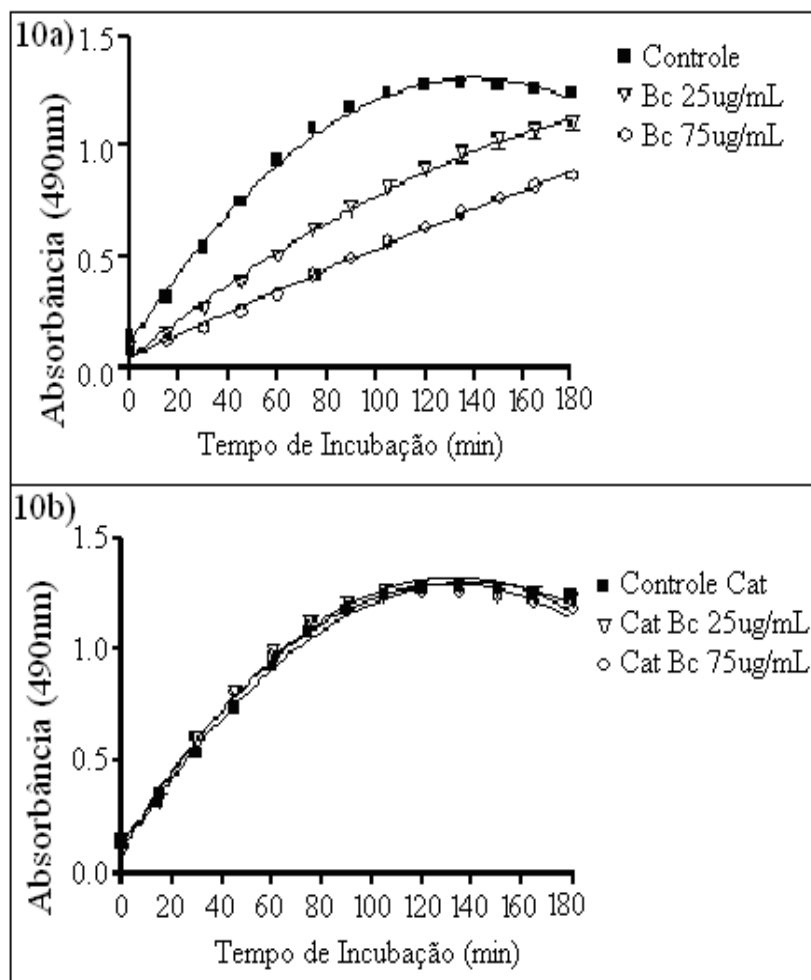


Figura 10.(a)- Efeito do extrato de *Bunodosoma caissarum* (Bc) na viabilidade da células RINm5F. As células foram plaqueadas 12 horas antes do experimento. Time-course para a viabilidade das células: as células RINm5F foram expostas ao composto na concentração indicada por 48h e medida através do MTS para diferentes periodos de incubação. N = 6. * P < 0.001 vs. controle; ANOVA seguido pelo teste de Tukey. As células foram expostas a uma concentração de 25 µg/ml e 75 µg/ml do veneno de Bc. **(b)-** As células com superprodução de catalase em células produtoras de insulina também foram expostas a uma concentração de 25 µg/ml e 75 µg/ml do veneno de Bc.

5.2. Determinação de ROS intracelular formada após a incubação com o extrato do veneno da *Bunodosoma Caissarum* (Bc) através da fluorescência do DCFH-DA.

O veneno de *B. caissarum*, aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio nas células RINm5F, o mesmo não foi observado nas células RINm5F.Cat incubadas com a *B. caissarum*, como mostradas através do método do DCFH-DA. A figura 11, mostra que a produção de ROS nas células RINm5F.Cat incubadas com a *B. caissarum* manteve-se igual ao observado nas células RINm5F e RINm5F.Cat controles, demonstrando que a superexpressão da enzima catalase obteve sucesso em prevenir a indução da *B. caissarum* na formação de ROS. Isso se deve ao fato das células RINm5F.Cat superexpressarem a enzima catalase, que é capaz de degradar o H_2O_2 produzido em H_2O , enquanto que as células RINm5F possuem uma produção muito baixa desta enzima, ocasionando danos celulares.

As células RINm5F e a RINm5F com superexpressão da enzima catalase (RINm5F.Cat) foram expostas ao veneno da Bc em uma concentração de 75ug/ml por 72 horas, e medido na presença de 2,8 ou 25mmol/l de glicose. As células RINm5F expostas a Bc apresentaram um aumento na produção de ROS de mais de 100% quando comparadas com as células RINm5F controle como mostrado na figura 11 (barras brancas a-RINm5F controle e b-RINm5F expostas a *B. caissarum*). Enquanto que, nas células com superexpressão da catalase, a produção de espécies reativas de oxigênio foi suprimido, mostrando-se igual as células RINm5F controle (Figura 11, barras em preto). A normalização da fluorescência foi realizado pela número total de células e teve essencialmente o mesmo número para todos os grupos (figura não mostrada).

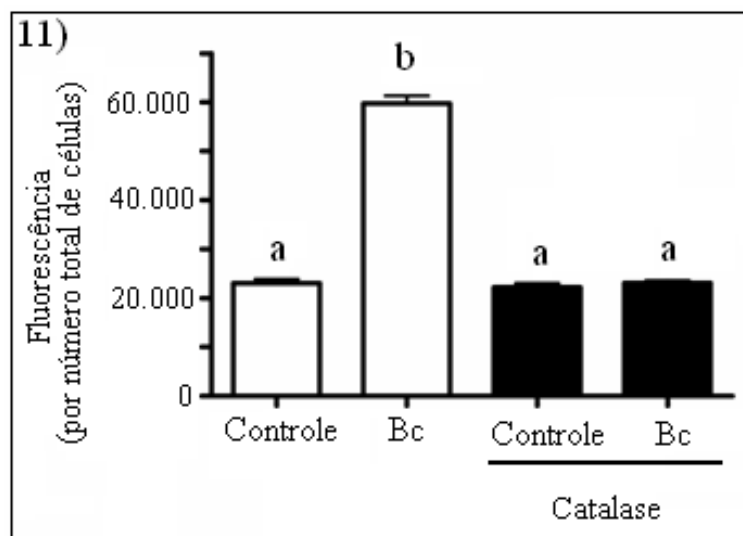


Figura 11. Figura mostra a formação de ROS intracelular medida através do DCFH-DA. As letras acima das barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparando entre: (a) RINm5F controle; (b) RINm5F Bc; (a) RINm5F.Cat controle; (a) RINm5F.Cat Bc. N=8.

5.3. Efeito do veneno da *Bunodossoma caissarum* na atividade das enzimas antioxidantes:

A atividade da CuZnSOD foi determinada através da diferença entre a atividade da SOD total e da MnSOD, e de acordo como mostrado na figura 12a. A enzima Cu/ZnSOD mostrou um aumento de sua atividade, nas células RINm5F que foram incubadas com 75µg de *B. caissarum*. Como pode-se observar nas barras brancas, há um aumento de aproximadamente 100% na atividade da enzima CuZnSOD, enquanto que, nas células RINm5F.Cat e RINm5F.Cat Bc não houve diferença significativa, porém mostrou-se aproximadamente 150% maior do que as células RINm5F controle.

Como mostrado na **figura 12b** a atividade da GPx não mostrou variação quando comparada entre as células RINm5F controle, RINm5F Bc, RINm5F. Cat controle e RINm5F. Cat Bc.

A atividade da enzima catalase foi mensurada através do método da decomposição da H_2O_2 a 230 nm 30°C. De acordo com a **figura 12c**, as células RINm5F controle e as células RINm5F Bc não mostraram diferenças significativas do mesmo modo as células RINm5F.Cat e as RINm5F.Cat Bc. Porém entre as

células RINm5F e as RINm5F.Cat foi visto um grande aumento da atividade da enzima catalase o que confirma a superexpressão da enzima nesta célula.

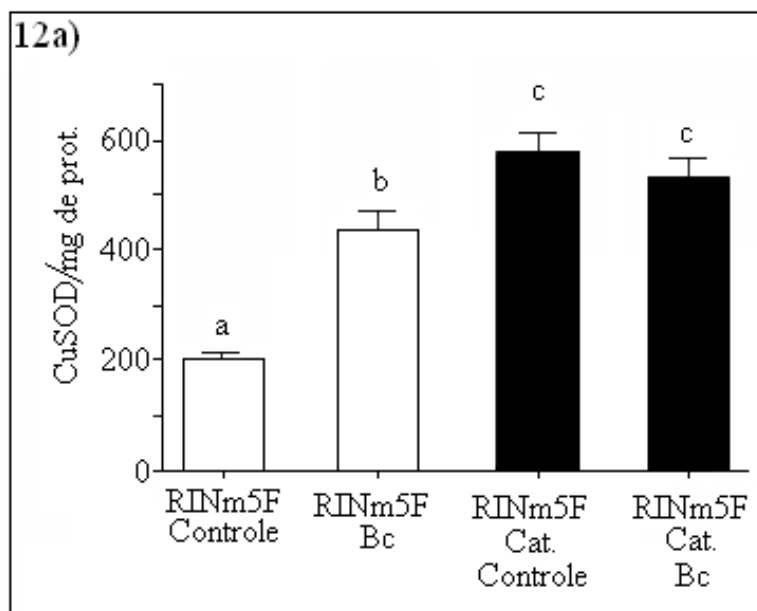


Figura 12 a) A atividade enzimática mostrou-se aproximadamente 100% maior nas células RINm5F controle comparadas com as RINm5F tratadas com *B. caissarum* (barras brancas). Enquanto que, as células RINm5F. Cat e as RINm5F.Cat Bc não houve diferença estatística. (barras negras) N=7. As letras acima das barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

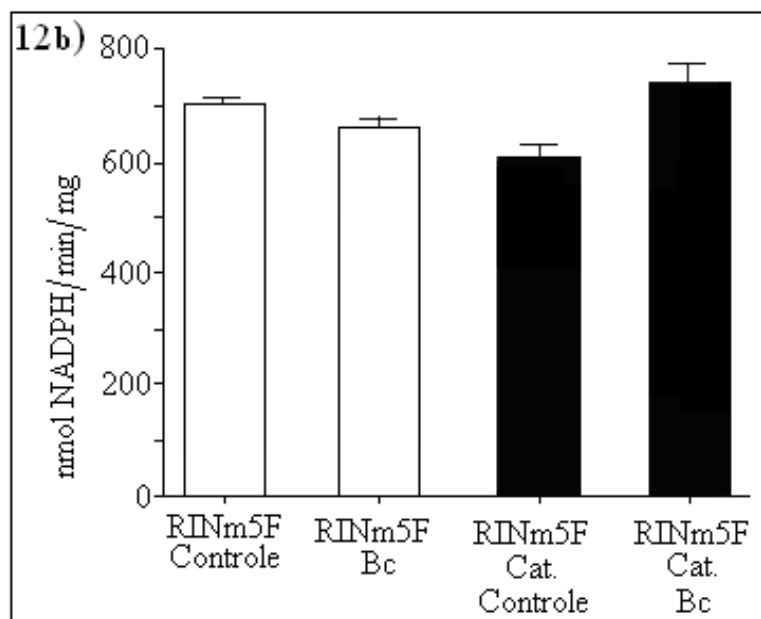


Figura 12 b) A atividade da GPx não mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as células RINm5F controle, RINm5F Bc, RINm5F.Cat e RINm5F.Cat Bc. N=8.

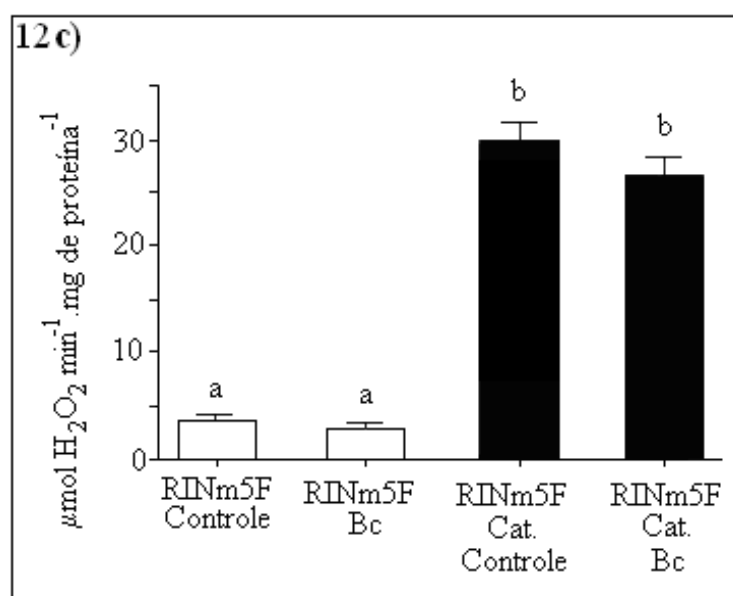


Figura 12 c) A figura mostra a atividade da enzima catalase, demonstrando que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as células RINm5F controle e as RINm5F Bc (barras em branco), e também não há diferença entre as células RINm5F.Cat controle e as RINm5F.Cat Bc (Barras em preto), porém há uma grande diferença quando comparamos as células RINm5F e as RINm5F.Cat, mostrando um aumento de mais de 500% na produção da enzima catalase nas células RINm5F.Cat. N=5.

5.4. Atividade antibacteriana do extrato total da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* (Bc).

A atividade antibacteriana foi realizada através de uma placa de 96 poços com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* psv. *passiflorae* (Xap), e a bactéria mais o extrato total de Bc em diferentes concentrações variando de 3 a 21 µg/ml (**Fig. 13a**). A concentração de 21 µg/ml, não obteve nenhuma diferença estatística quando comparada com a concentração de 12 µg/ml (não mostrado). De acordo com os resultados, é estimado que a concentração que inibe 50% do crescimento bacteriano (Ec50) está em torno de $3,74\mu\text{g} \pm 0.32$. Nós avaliamos também a atividade antibacteriana utilizando 3 µg/ml do extrato total de Bc em bactérias como: *Clavibacter michiganensis michiganensis* e obtivemos 97% de inibição do crescimento; *Streptococcus mutans* (com aproximadamente 82% de inibição), *Staphylococcus aureus* (aproximadamente 67% de inibição), e *Escherichia coli* (aproximadamente 45% de inibição). Estes resultados sugerem que bactérias Gram negativas possuem menor sensibilidade que as bactérias Gram positivas.

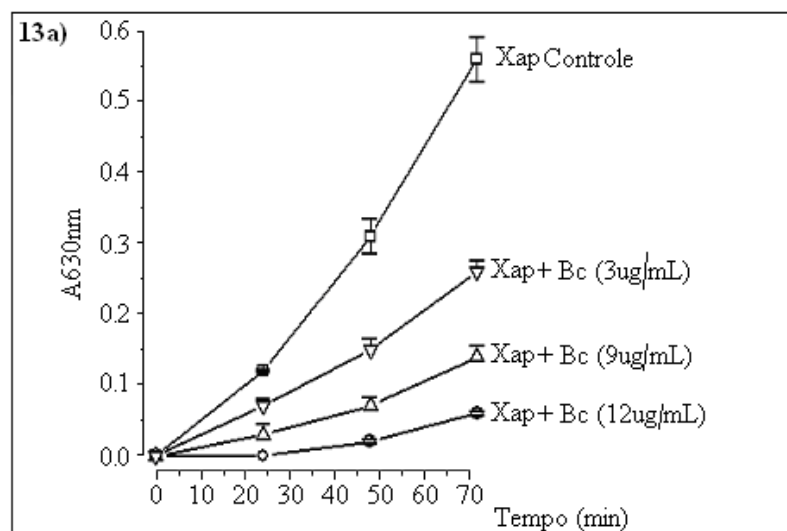


Figura 13. (a) Atividade antibacteriana do extrato de *Bunodosoma caissarum* (Bc) mostrando uma diminuição do crescimento bacteriano da bactéria Xap de maneira dose-dependente. A atividade antibacteriana foi monitorada utilizando placa de Elisa a 630nm. **(b)** Ultraestrutura da bactéria

Xanthomonas axonopodis psv. *passiflorae*. (c) Destruição celular da bactéria incubada com extrato de *B.caissarum*.

5.5. Ação farmacológica do extrato total do veneno de *B. caissarum*.

O extrato total do veneno de *Bunodosoma caissarum* produziu edema e aumento da permeabilidade vascular nas patas dos ratos como mostrado na **figura 14**. O edema máximo foi observado aos 30 minutos após a injeção subplantar de Bc 3-12 μg /animal de maneira dose-depentende (**fig. 14a**). Após esse tempo, o edema foi significicamente reduzido até o tempo de 3 horas após a injeção. A concentração mínima para a indução do edema foi em torno de $1.75\mu\text{g} \pm 0,12$ por pata. Durante os experimentos não foi observado nenhuma atividade hemorrágica.

A agregação plaquetária induzida pelo extrato total do veneno da *Bunodosoma caissarum* mostrou-se efetiva e de maneira dose-dependente nos dois modos de preparação, sendo que o plasma rico em plaqueta não mostrou um resultado tão uniforme quanto a preparação com plaquetas lavadas (**Fig. 14b e 14c**).

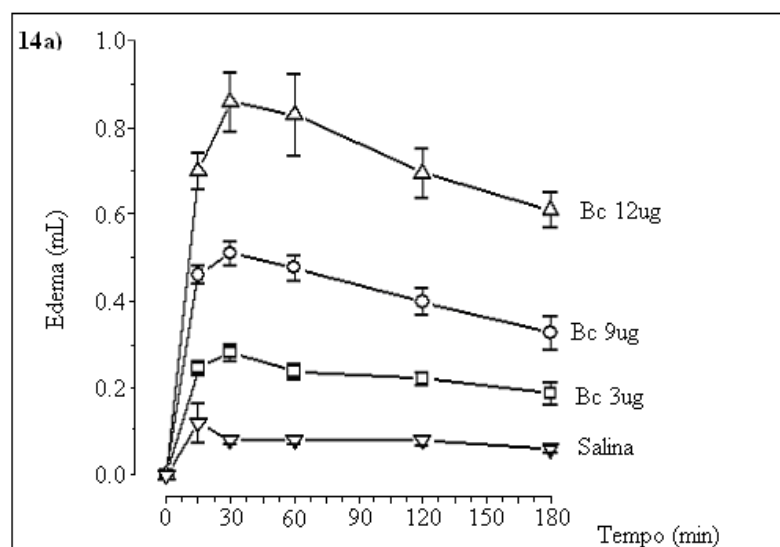


Figura 14. (a) Edema em pata de rato induzido pelo extrato de *Bunodosoma caissarum* (Bc) mostrou um efeito dose-depentente, na concentração de 3, 9 e 12ug. As medições foram realizadas nos

intervalos de 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Os resultados foram expressos em aumento do volume da pata (mL) calculado subtraindo-se o volume basal.

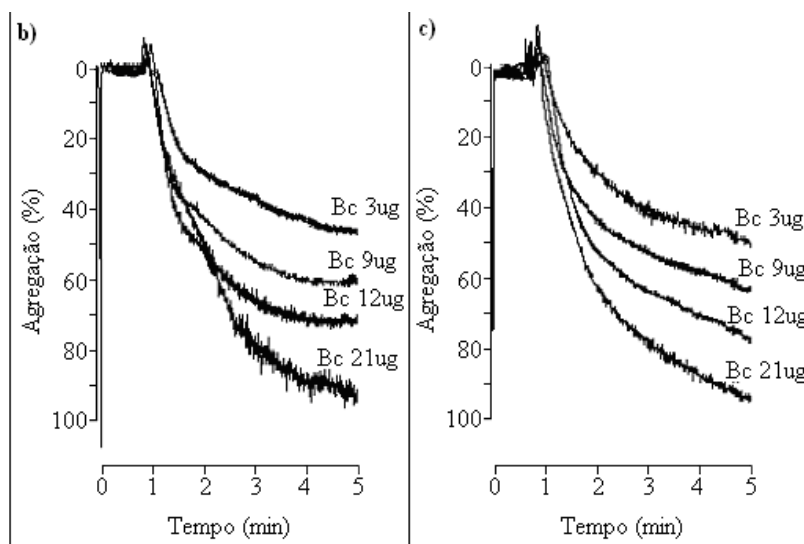


Figura 14 (b) Agregação plaquetária usando plasma rico em plaquetas e (c) uma preparação de plaquetas lavadas. Nos dois casos Bc induziu uma resposta de maneira dose-dependente. N= 10.

5.6. Eletroforese de 2-D

A eletroforese de duas dimensões revelou a presença de dois principais grupos de proteínas ácidas e básicas, proteínas neutras não foram observadas como mostrado na **figura 15**. O extrato protéico da Bc mostrou uma quantidade elevada de três principais proteínas, com peso molecular de aproximadamente 37 kDa, 34k Da, and 30 kDa. Particularmente o último grupo apresentou um alto número de isoformas com uma ampla gama de valores de pI de aproximadamente 4.1 a 4.7 (**Fig. 15**). Foi observado também uma porção ácida de proteínas de baixo peso molecular. O veneno de Bc exibiu algumas proteínas de peso molecular de aproximadamente 45kDa; 27kDa e alguns spots com massa molecular em torno de 15kDa.

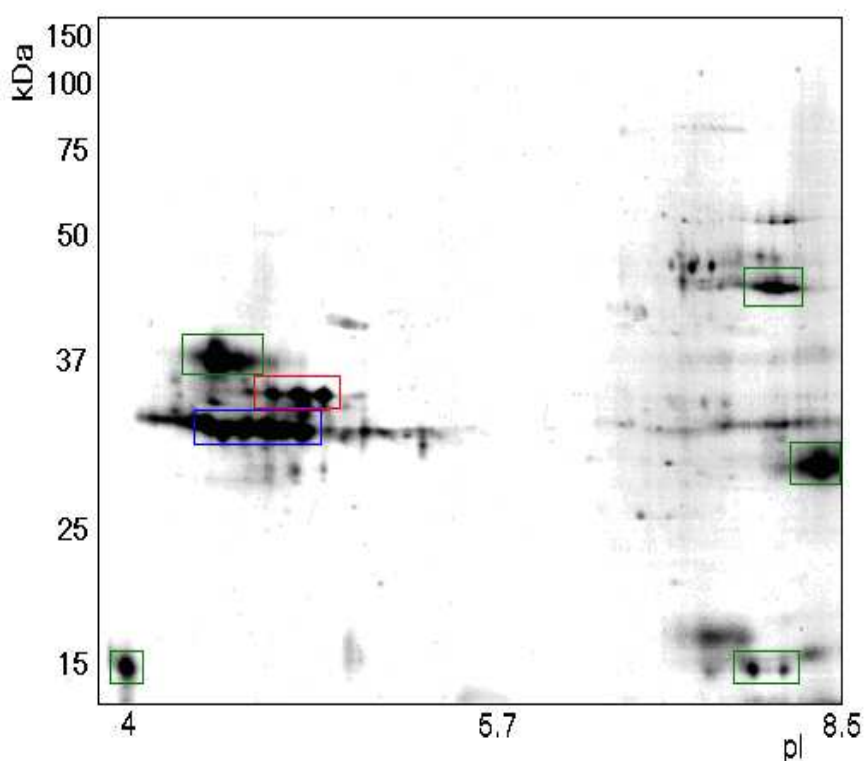


Figura 15. Eletroforese 2 dimensões do extrato de *Bunodosoma caissarum*, mostrando dois principais grupos de proteínas ácidas e básicas, sendo as principais com pesos moleculares de 37kDa, 34kDa e 30kDa.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A *Bunodosoma caissarum* é uma espécie bastante presente no litoral brasileiro e assim como outros cnidários, são providas de nematocistos, localizados nos tentáculos e cavidade gastrovascular. Estas células providas de potentes toxinas, são utilizadas principalmente na captura de alimentos e na defesa contra predadores (Brusca e Brusca, 2003).

O esclarecimento do mecanismo de ação destas numerosas toxinas vem permitindo o seu emprego no estudo de fenômenos fisiológicos, visto que é uma anêmona muito presente nas praias rochosas do litoral brasileiro e possui diversas frações sendo atualmente isolada e caracterizada sobre diferentes aspectos.

De acordo com este estudo, pode-se observar que a anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* possui uma variedade de proteínas diferentes, como mostrado através da eletroforese 2-D, em que foi utilizado o extrato bruto dos tentáculos da anêmona do mar, que foram removidos, centrifugados e liofilizados.

Esta eletroforese mostrou também, que existem dois principais grupos de proteínas que compõem a fase protéica do extrato de *Bunodosoma caissarum*, sendo elas ácidas ou básicas. Proteínas neutras não foram observadas. O extrato protéico da Bc mostrou uma quantidade elevada de três principais proteínas, com peso molecular de aproximadamente 37 kDa, 34k Da, and 30 kDa. Particularmente o último grupo apresentou um alto número de isoformas, com uma ampla gama de valores de pI de aproximadamente 4.1 a 4.7. Foi observado também uma porção ácida de proteínas de baixo peso molecular. O veneno de Bc exibiu algumas proteínas de peso molecular de aproximadamente 45kDa; 27kDa e alguns spots com massa molecular em torno de 15kDa. Isso mostra a diversidade de compostos presentes na anêmona Bc, que pode levar a uma variedade de efeitos biológicos. Porém o mecanismo pelos quais a anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* produz sua toxicidade ainda não está bem esclarecido.

Nos ensaios antibacterianos foi possível observar que o extrato de Bc apresentou diminuição no número de bactérias de forma dose dependente, esse resultado sugere que essa atividade antibacteriana

pode ser consequência do conjunto de proteínas presentes no extrato, ou a ação isolada de algumas proteínas bioativas.

Recentemente, três isoformas de PLA₂ foram isoladas do extrato de Bc, sendo que uma delas, chamada BcPLA₂-1, possui atividade catalítica forte (Martins et al, 2009). É possível que a presença dessa enzima tenha grande influência nesse resultado antibacteriano.

Outros resultados que provavelmente foram influenciados pela presença dessas PLA₂s, foram os experimentos de agregação plaquetária e de edema em pata de rato. Nos dois casos, podemos observar um aumento da resposta, inflamatória ou de agregação, proporcional a quantidade de extrato usado. A hidrólise do ácido araquidônico (AA) pela enzima PLA₂ é o passo inicial para a biossíntese de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) e para o Fator Ativador de Plaquetas (PAF). Por causa disso, inicialmente foi pensado que a principal atividade das PLA₂s era prover substratos para a biossíntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios, consequentemente, foi proposto que o mecanismo principal da ação pró-inflamatória das PLA₂s estava relacionado com sua atividade catalítica. Entretanto, estudos nas últimas décadas identificaram mecanismos alternativos de ação das PLA₂s ligadas a sua capacidade de ativar células inflamatórias e induzir a produção de outros mediadores pró-inflamatórios que não os eucosanóides (Triggiani et al, 2005). Esses efeitos não estão relacionados com a atividade enzimática da PLA₂, mas com sua interação com receptores e/ou moléculas da superfície da célula alvo (Valentin e Lambeau, 2000). Portanto, a presença da PLA₂ no extrato bruto de Bc, como já foi mostrado por Martins et al (2009), provavelmente afetou os resultados biológicos testados, não só pela sua atividade enzimática, mas também pelo seu efeito farmacológico.

Entre outros efeitos biológicos estudados neste trabalho, está seu efeito toxicológico. Para isso, foi utilizado células produtoras de insulina RINm5F e uma linhagem de células produtoras de insulina estável, que superexpressa a enzima catalase, a fim de analisar se esta enzima pode fornecer proteção contra o extrato total da anêmona *Bunodosoma caissarum* e se esta toxicidade é mediada pelo estresse oxidativo.

Primeiramente foi realizado o teste de viabilidade celular, MTS, que é um método espectrofotométrico de redução da formazan. As células foram incubadas com concentrações do extrato

bruto de *B. caissarum* (25 e 75 µg/ml) por um período de 12, 24 e 72 horas. Os resultados de viabilidade mostraram que as células que superexpressam a enzima catalase não sofreram nenhuma diminuição em sua viabilidade enquanto que as células de mamíferos produtoras de insulina sofreram uma diminuição dose e tempo dependente de até 60%.

Este resultado demonstra que o extrato total obtido através dos tentáculos da *B. caissarum* possui um efeito citotóxico nas células de mamíferos produtoras de insulina que se mostra de maneira dose e tempo dependente, e um possível mecanismo de ação para esta citotoxicidade poderia ser um aumento das espécies reativas de oxigênio, causando um stress oxidativo, já que, as células de mamíferos produtoras de insulina que superexpressam a enzima catalase não sofreram nenhum dano, em nenhuma das concentrações e tempos utilizados.

Visto que a Bc poderia causar a morte celular através do aumento do stress oxidativo através do teste do DCFH-DA, mediu a produção de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular formados pela incubação com o extrato de Bc. Para isso, as células produtoras de insulina com e sem a superexpressão da enzima catalase foram plaqueadas e incubadas com o e extrato da anêmona do mar Bc por 72h em uma concentração de 75 µg/ml, de acordo com o protocolo já descrito. Nossos resultados demonstraram que o extrato de Bc causou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio de mais de 100% quando comparadas com as células controle, enquanto que as células que superproduzem a enzima catalase foram capazes de conter essa produção de espécies reativas de oxigênio, mostrando-se em níveis semelhantes as das células RINm5F controle.

Estes resultados mostram que o extrato da anêmona do mar *B. caissarum* poderia levar a aumentos de espécies reativas de oxigênio e consequentemente a morte celular devido ao stress oxidativo relativo. Um outro aspecto analisado foi a ação das enzimas antioxidantes. Para isso, utilizamos as células com e sem superexpressão da enzima catalase e incubamos com 75 µg/ml por um período de 72h, conforme já descrito.

Os resultados dessas enzimas demonstram que o extrato de Bc causou um aumento da atividade da enzima Cu/ZnSOD, tanto para as células RINm5F controle como para as com superexpressão da enzima

catalase (RINm5F. Cat). A atividade da Cu/ZnSOD foi determinada através da diferença entre a atividade da SOD total e da MnSOD.

A atividade da enzima glutathione peroxidase não sofreu nenhuma diferença nas células RINm5F controles ou nas RINm5F.Cat. e a enzima catalase não aumentou na células RINm5F e se manteve alta nas células RINm5F.Cat, o que era esperado visto que esta célula superproduz a enzima catalase. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. Sendo assim, a *B. caissarum* provocou um aumento das espécies reativas de oxigênio, sendo principalmente de oxigênio superóxido.

Um aumento na atividade da SOD poderia mostrar um aumento na produção do substrato, principalmente do radical superóxido, através da incubação com o veneno de *B. Caissarum*.

As enzimas GPx e Cat, são as enzimas envolvidas na eliminação da H_2O_2 , formada a partir da diminuição, espontânea ou catalisada pela SOD, dos ânions $O_2^{\bullet-}$, os resultados mostram que o extrato bruto de *B. caissarum* causa um aumento na produção de radicais livres no meio intracelular, principalmente de radicais superóxido que através da enzima SOD levaria a um aumento também do peróxido de hidrogênio. Pois, a enzima SOD mostra sua atividade aumentada mostrando ser capaz de reduzir os ânions superóxidos formados, acumulando-se assim o peróxido de hidrogênio, e a enzima GPx não mostrou mudança em sua atividade, podendo então o excesso de peróxido de hidrogênio formado ser o responsável pela diminuição da viabilidade celular apresentada.

Os resultados reforçam a hipótese de que os radicais livres, dentre eles o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio são essenciais para prover, pelo menos em parte, os efeitos observados quando da exposição ao veneno de Bc. Já foi demonstrado que a H_2O_2 ativa a PLA (Sapirstein, 1996; Shit, 2004), mas nossos resultados constituem a primeira evidência em células produtoras de insulina de que o veneno de Bc poderia agir desta forma. Adicionalmente, exposições prolongadas ao H_2O_2 podem levar a morte por apoptose, um processo acelerado por isoformas de PLA2 (Perez, 2004). Dessa maneira, estudos de ativação de vias de morte celular programada seriam de grande interesse para melhor precisar os mecanismos intracelulares de compostos pro-oxidativos com o veneno de Bc.

Podemos concluir então, que o extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* é uma mistura muito complexa de proteínas e peptídeos com significativos efeitos biológicos. Esses efeitos não se limitam aos glóbulos vermelhos eritrócitos, mas também pode ser observado em outros tipos de células de mamíferos, como células produtoras de insulina. Efeitos antibacteriano, citotóxica, inflamatório e trombolíticos são características do extrato de *B. caissarum*. Estes efeitos provavelmente resultam de uma combinação sinérgica de várias proteínas e peptídeos que incluem serina proteases, de baixo peso molecular, citolisinas e PLA₂s. O possível mecanismo de citotoxicidade *B. caissarum* em células de mamíferos, certamente inclui aumento do estresse oxidativo com excessiva produção de peróxido de hidrogênio, pelo menos no caso das células produtoras de insulina.

Mais estudos são necessários para determinarmos se a PLA₂ tem função preponderante nesse mecanismo. Medidas de atividade de caspases em células expostas a toxina e utilização de um inibidor de PLA₂ poderão fornecer dados interessantes nesse sentido.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Alvarez, C., Casallanovo, F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Menestrina, G., Lissi, E., Schreier, S. (2003) Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces--modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem Phys Lipids*. 122(1-2):97-105.
- Anderluh, G. e Macek, P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 40(2):111-124.
- Aneiros, A., Garcia, I., Martinez, J.R., Harvey, A.L., Anderson, A.J., Marshall, D.L., Engstrom, A., Hellman, U., Karlsson, E. A. (1993) potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*: Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1157(1):86-92.
- Antunes, E., Mariano, M., Cirino, G., Levi, S., de Nucci, G. (1990) Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. *Br J Pharmacol*. 101(4):986-90
- Aust, S.D., Miller, D.M., Samokyszyn, V.M. (1990) Iron redox reactions and lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186:457-463.
- Barltrop, et al., (1991) “5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 1, n. 11, pp.611-614.
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A. (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*. 89(1):27-71.
- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P., Menestrina, G. (1993) Pore formation by the sea anemone cytolytic Equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membrane Biol*. 131, 11–22.
- Bernheimer, A.W. e Avigad, L.S. (1976) Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 73, 467–471.

- Bernheimer, A.W. e Rudy, B. (1986) Interactions between membranes and cytotoxic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 864,123–141.
- Borefreund, P. (1984) “A Simple Quantitative Procedure using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assay (HTD/NR-90)”, *Journal of Tissue Culture Methods*, v. 9, pp. 7-9.
- BRUSCA, R. C., BRUSCA, J. G. 2003. Invertebrates. 2ª ed. Sunderland: Sinauer Associates, 936p., il;
- Chiu, D., Lubin, B., Shohet, S.B., (1982) Peroxidative reactions in red cell biology. In: Pryor, W.A. (Ed.) *Free Radicals in Biology*, vol. V. Academic Press, New York.
- Correia, D.D. (1964)- Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste tropical. São Paulo, Universidade de São Paulo, 139pp. Tese (Professor Catedrático). Departamento de Zoologia, Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras, Universidade de São Paulo.
- Correia, C.R.D., Costa, P.R.R., Ferreira, V.F. (2002) Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. *Quim Nova* 25: 82-89, 2002.
- Cunha, R.B., Santana, A.N., Amaral, P.C., Carvalho, M.D., Cavalheiro, E.A., Maigret, B., Ricart, C.A., Cardi, B.A., Souza, M.V., Cavalho, K.M. (2005)- Primary structure, behaviral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon*. 45(2):207-217.
- Davies, K.J.A., Goldberg, A.L. (1987) Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 8220–8226.
- De los Rios, V., Mancheno, J.M., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, G. (1998) Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the haemolytic protein Sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur J Biochem.* 252(2):284-9.
- Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends. Biochem. Sci.* 22(1):1-2.
- Eno, A.E., Konya, R.S., Ibu, J.O. (2001) Changes in blood pressure in the rat induced by the venom extract from a sea anemone *Bunodosoma cavernata*. *Afr J Med Med Sci.* 30(1-2):75-79.
- Finkel, T. e Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

- Freitas, J. C. e Sawaya, M.I. (1986) Anomalies in sea urchin egg development induced by a novel purine isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon*, 24: 751-755.
- Freitas, J. C. e Sawaya, M.I. (1990) Increase of mammalian intestinal motility by the marine natural product caissarone. *Toxicon*, 28: 1029-1037.
- Freitas, J.C., Rangel, M., Oliveira, J.S., Zaharenko, A.J., Rozas, E. (2003) An Outline of Marine Toxinology Studies in the Brazilian coast. *Comments on Toxicology* 9(2), 137-159.
- Galetti, P. and Norton, R.S. (1990) 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.
- Gasparini, S., Gilquin, B., Menez, A. (2004). Comparison of sea anemone and scorpion toxins binding to Kv1 channels: an example of convergent evolution. *Toxicon*. 43(8), 901-908.
- Gondran, M., Eckeli, A.L., Miguez, P.V., Gabilan, N.H., Rodrigues, A.L. (2002) The crude extract from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* elicits convulsions in mice: possible involvement of the glutamatergic system. *Toxicon*. 40(12):1667-1674.
- Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53(1):110-8.
- Grotendorst, G.R. e Hessinger, D.A. (2000). Enzymatic characterization of the major Phospholipase A2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38(7):931-943.
- Gutiérrez, J.M., Romero, M., Díaz, C., Borkow, G., Ovadia, M. (1995) Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 33(1):19-29.
- Gutteridge, J.M. e Shute, D.J. (1981) Iron-dioxygen-dependent changes to the biological activities of bleomycin. *J Inorg Biochem*. 15(4):349-57.
- Gutteridge, J.M.C. e Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899:136-147.
- Haddad, V.Jr., Martins, I.A., Makyama, H.M. (2003) Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean

- (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*. 42(1):79-83.
- Halliwell, B. (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 401(1):1-1.
- Hessinger, D. A. e Lenhoff, H.M. (1988) Preface. Páginas. xi-xii in D. A. Hessinger and H. M. Lenhoff (eds.) *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego and other cities.
- Kini, R.M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzyme. *Toxicon*. 42(8): 827-840.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
- Lenzen S. (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell *Biochem Soc Trans.* 36(3):343-7.
- Macek, P. (1992) Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (*Actiniaria*). *FEMS Microbiol. Immunol.* 5 (1-3), 121 – 129.
- Macek, P., Belmonte, G., Pederzoli, C., Menestrina, G. (1994) Mechanism of action of Equinatoxin-II, a cytolytic from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology* 87, 205–227.
- Malpezzi, E.L.A. e 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):811-814.
- 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, pp. 1245–1249.
- Malpezzi, E.L.A., Freitas, J.C., Muramoto, K., Kamiva, H. (1993) Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31:853–864.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M. (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview *FEBS J.* 275(15):3959-3970.
- Maridonneau, I., Braquet, P., Garay, R.P. (1983) Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. *J. Biol. Chem.* 258, 3107– 3113.
- Martins, R.D., Alves, R. S., Martins, A.M.C., Barbosa, P.S.F., Evangelista, J.S.A.M., Evangelista, J. J.F., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J.F., Orts, D.J.B., Marangoni, S.,

- Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A. (2009) Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A2 from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* 54 (2009) 413–420.
- Massoco-Salles Gomes, C. O.(2003) Receptores benzodiazepínicos periféricos e a resposta imune inata de eqüinos: efeito do midazolam. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- Meunier, F.A., Frangez, R., Benoit, E., Ouanounou, G., Rouzaire-Dubois, B., Suput, D., Molgo, J. (2000) Ca^{2+} and Na^{+} contribute to the swelling of differentiated neuroblastoma cells induced by Equinatoxin-II. *Toxicon* 38, 1547–1560.
- Michaels, D.W. (1979) Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. I. Formation of transmembrane channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 555, 67–78.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger (2005) Principles of Biochemistry, 4ª edição, W. H. Freeman, ISBN 978-0716743392.
- Newsholme, P., Haber, E.P., Hirabara, S.M., Rebelato, E.L., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R., Curi, R. (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* 583(1):9-24.
- Norton, R.S. (1991). Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29(9), 1051-1084.
- Oliveira, J.S., Redaelli, E., Zaharenko, A.J., Cassulini, R.R., Konno, K., Pimenta, D.C., Freitas, J.C., Clare, J.J., Wanke, E. (2004). 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.* 279(32).
- Oliveira, J.S., Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A. Jr, Konno, K., Shida, C.S., Richardson, M., Lúcio, A.D., Beirão, P.S., de Freitas, J.C.. (2006b). 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):1592-1600.
- 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.
- Pennington, M.W., Zadenberg, I., Byrnes, M.E., Norton, R.S., Kem, W.R. (1994) Synthesis of the cardiac inotropic polypeptide anthopleurin-A. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43(5), 463 – 470.
- Perez, R., et al., (2004) Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 279(39): p. 40385-91.
- Radomski M, Moncada S. An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. *Thromb Res.* 1983 May 15;30(4):383–389.
- Rohn, T.T., Nelson, L.K., Waeg, G., Quinn, M.T. (1998) U-101033E (2,4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal-protein adducts. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1371–1379.
- Romey, G., Abita, J.P., Schweitz, H., Wunderer, G., Lazdunski.(1976). Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanisms of nerve conduction and excitation-secretion coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(11), 4055-4059.
- Reid, M. B. e Durham W. J. (2002) Generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Contracting Skeletal Muscle *Annals of the New York Academy of Sciences* 959:108-116.
- Sanchez, J.C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F. (1997) Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 18(3-4):324-7.

- Santamaria, A., Sanchez-Rodriguez, J., Zugasti, A., Martinez, A., Galvan-Arzate, S., Segura-Puertas L. (2002) A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology* 173 (2002) 221–228.
- Santana, A.N., Trindade-Filho, E.M., Cunha, R.B., Souza, M.W., Cavaleiro, E.A., Carvalho, K.M. (2001) Behavioral and electroencephalographic analysis of seizures induced by intrahippocampal injection of granulitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. *Braz J Med Biol Res.* 34(6), 797-801.
- Sapirstein, A., et al.,(1996) Cytosolic phospholipase A2 (PLA2), but not secretory PLA2, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in kidney epithelial cells. *J Biol Chem.* 271(35): p. 21505-13.
- Shit, S. and S.K. Atreja (2004) Phospholipase A2 activation by hydrogen peroxide during in vitro capacitation of buffalo spermatozoa. *Indian J Exp Biol.* 42(5): p. 486-90.
- Scott, E.L. e Sigler, P.B. (1994). Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipase A2. *Adv.Prot.Chem.* 45, 53-88.
- Silva, F. R.(2003) Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo. 179 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- Simpson, R.J., Reid, G.E., Moritz, R.L., Morton, C., Norton, R.S. (1990). Complete amino acid sequence of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Eur. J. Biochem.* 190(2), 319-328.
- Snyder, L.M., Fortier, N.L., Leb, L., McKenney, J., Trainor, J., Sheerin, H., Mohandas, N. (1988) The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated membrane damage in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 937, 229–240.
- Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W. (2002) *Biology*. Sixth Edition. Brooks/Cole Thomson Learning, Australia, Canada, Mexico, Singapore, Spain, United Kingdom, and United States.
- Souza, K.L., Elsner, M., Mathias, P.C., Lenzen, S., Tiedge, M. (2004) Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia.* 47(7):1292-302.

- Talvinen, K.A. e Nevalainen, T.J. (2002). Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 132(3), 571-578.
- Tavazzi, B., Di Pierro, D., Amorini, A.M., Fazzina, G., Tuttobene, M., Giardina, B., Lazzarino, G. (2000) Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 684–689.
- Tejuca, M., Dalla-Serra, M., Ferreras, M., Lanio, M.E., Menestrina, G. (1996) Mechanism of membrane permeabilization by Sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35, 14947–14957.
- Tiedge, M., Lortz, S., Munday, R., Lenzen, S. (1998) Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 47:1578-1585.
- Torres-Ramos, M. e Aguilar, M.B. (2003) Recent Advances in Cnidarian Neurotoxin Research. *Comments on Toxicology* 9(2), 161-174.
- Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G., Marone, G. (2005) Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116(5):1000-1006.
- Tsan, M. F., White J. E., Santana T. A., Lee C. Y. (1990) Tracheal insufflation of tumor necrosis factor protects rats against oxygen toxicity. *Journal of Applied Physiology.* 68(3).
- Turrens JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552(2):335-44.
- Uechi, G.I., Toma, H., Arakawa, T., Sato, Y. (2005) Biochemical and physiological analyses of a hemolytic toxin isolated from a sea anemone *ActinERIA villosa*, *Toxicon* 45:761–766.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

- Valentin, E. e Lambeau, G. (2000). What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2? *Biochimie*. 82(9-10): 815-831.
- Verheij, H.M., Boffa, M.C., Rothen, C., Bryckaert, M.C., Verger, R., de Haas, G.H. (1980) Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2. *Eur J Biochem*. 112(1):25-32.
- Watson, G. M. (1988) Ultrastructure and cytochemistry of developing nematocysts. Pp. 143-164 in D. A. Hessinger and H. M. Lenhoff (eds.) *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego and other cities.
- Weinheimer, A. e Spraggins R. (1969) The occurrence of two new prostaglandin derivates (15- pi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Chemistry of Coelenterates*, XV. *Tetrahedron Lett*. 59: 5185-5188.
- Yang, C.C. (1994). Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. *J.Toxicol*. 13(2):125-177.
- Zelnik, R., Haraguchi, M., Lavie, D., Frolow, F., Weis, A.L. (1986) X-ray molecular structure of caissarum, a novel purine derivative from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1: 2051-2053.
- Zorec, R., Tester, M., Macek, P., Mason, W.T. (1990) Cytotoxicity of Equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity. *J. Membr. Biol*. 118, 243– 249.

APÊNDICES

8. APÊNDICES

8.1 Resumos publicados em anais de Congressos

XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Águas de Lindóia – SP, 20 a 23 de agosto de 2008

Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by carbohydrates.

Oliveira, Simone CB ; Moure, M. C. R. ; Fonseca, F.V ; Antunes, E. ; Calgarotto, A. K. ; Toyama, M.H. .

XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

Águas de Lindóia – SP, 17 a 20 de maio de 2008.

Modulation of the pharmacological effects of PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* by glycation..

Oliveira, Simone CB ; Moure, M. C. R. ; Fonseca, Fabiana V ; Antunes, E. ; Calgarotto, A. K. ; Toyama, Marcos H.

XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology

Salvador – BA, 21 a 25 de maio de 2007.

Effects of crotamine, crotoxin and 1-amino-oxidase on viability of insulin-producing RINm5F cells.

Moure, M.C.R.; Souza, K.L.A; Boschero, A.C.; Toyama, M.H.

XXI Reunião Annual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.

Águas de Lindóia – SP, 23 a 26 de agosto de 2006.

Biological properties of the protein extract from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*.

Moure, M.C.R.; Souza, K.L.A.; Boschero, A.C.; Buzzo, S.C.; Fonseca, F.V.; Souza, A.J.F.; Belato, D.J.O.; Toyama, M.H.

8.2 Apresentação de trabalhos

XXI Reunião Annual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.

Águas de Lindóia – SP, 23 a 26 de agosto de 2006.

Biological properties of the protein extract from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*.

Moure, M.C.R.; Souza, K.L.A.; Boschero, A.C.; Buzzo, S.C.; Fonseca, F.V.; Souza, A.J.F.; Belato, D.J.O.; Toyama, M.H.