

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia

**EFEITO DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DE RAÍZES
DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A FUNÇÃO
RENAL**

LÚCIO RICARDO LEITE DINIZ

BELO HORIZONTE

2006

LÚCIO RICARDO LEITE DINIZ

**EFEITO DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS ISOLADAS DE RAÍZES
DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A FUNÇÃO
RENAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Belo Horizonte

2006

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Renal “Professor Fernando Alzamora”, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa Maria Aparecida Ribeiro Vieira, na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico este trabalho aos meus pais Nádja e Ernesto.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Aparecida Ribeiro Vieira, pela confiança, apoio e por compartilhar seus conhecimentos científicos.

À Profa. Maria das Graças Lins Brandão e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, UFMG), em especial, à Kênia Klausing, pela disponibilização do material fitoquímico utilizado nesse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, Depto. de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG, pela acolhida durante os anos de Mestrado.

À Adelaide, pelo esforço para disponibilizar quantidades suficientes de ratos (sempre em grande número) utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Celso Caruso Neves e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Bioquímica Renal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ), pela prontidão em colaborar na determinação de atividades ATPásicas e pela recepção na UFRJ. Agradecimento muito especial para a Aloa que, inclusive, veio ao nosso Laboratório para auxiliar na coleta e tratamento das amostras.

À Profa. Adelina Martha dos Reis e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Depto. de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG), em especial, ao André, pela presteza ao colaborar na dosagem de peptídeos natriuréticos.

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Patologia Comparada, Depto. de Patologia Geral, ICB, UFMG), pela

disposição constante em colaborar na avaliação morfológica realizada nesse trabalho.

Aos Profs. Robson Augusto Sousa dos Santos (Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG) e Anderson José Ferreira (Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG), pela colaboração na dosagem de HAD.

A todos os Profs. do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG, pelos ensinamentos adquiridos.

À Luiza e Ana Rosa, peças fundamentais na minha vinda para a UFMG. Minha eterna gratidão.

À Roseli, pelos auxílios fundamentais prestados neste trabalho e, principalmente, pela amizade e apoio constante.

Aos amigos do Laboratório, Ana Paula Araújo, Kátia, Kênia, Lílian, Viviane, Thiago, Anna Paula e Magno pela amizade, carinho e cooperação. Isto proporcionou um ambiente agradável, facilitando a execução desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório Eletrocel, em especial, ao Éder, Priscila, Ricardo, Anita e Flaviana.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela agradável convivência.

Aos Técnicos e Secretárias do Departamento de Fisiologia e Biofísica, em especial, à Celinha, Jânua, Vanessa, Zezé e Darcy, pelos auxílios prestados.

Aos meus irmãos Tatiana e Alexandre, pelo imenso carinho.

À Paula, que muito me ajudou nessa etapa de minha vida, com carinho, incentivo e companheirismo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AaD – *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke

AMPc – 3' 5' monofosfato cíclico de adenosina

AQP – Aquaporina

ATP – Trifosfato de adenosina

C_{osm} – Clearance osmolar

C_{H₂O} – Clearance de água livre

CTL – Controle , “control”

EBAaD, CEaD – Extrato bruto das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke;
“crude extract”

Fig – Figura

FU, UF – Fluxo urinário, “Urinary flow

HAD – Hormônio Antidiurético.

GMPc – 3'5' monofosfato cíclico de guanosina

IP3 – 1, 4, 5- trifosfato inositol

NPr-A – Receptor para peptídeo natriurético tipo A

NPr-C – Receptor para peptídeo natriurético tipo C

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PNA – Peptídeo natriurético atrial

PNB – Peptídeo natriurético tipo -B

PNC – Peptídeo natriurético tipo – C

RFG – Ritmo de filtração glomerular

RIE – Radioimunoensaio

SAP_{AaD} – Saponinas triterpênicas isoladas das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke

VS – Versus

WHO - World Health Organization

RESUMO

Objetivo: Nesse trabalho, foram investigados os efeitos do extrato bruto das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}), bem como das saponinas dele isoladas (SAP_{AaD}), sobre a função renal em ratos e os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos.

Materiais e métodos: A volemia de ratos Wistar (250-350g) foi expandida com NaCl 0,9% (4% do peso corporal) na ausência ou presença de doses variáveis de EB_{AaD} ou SAP_{AaD} administradas por gavagem. Os ratos foram individualmente colocados em gaiolas metabólicas e o fluxo urinário (FU) foi medido a cada 30 min, durante 3 h. O efeito das SAP_{AaD} (50 mg/kg), 90 ou 60 min após a gavagem, também foi investigado sobre os seguintes parâmetros: RFG (“clearance” de creatinina), Na^+ e K^+ (fotometria de chama), osmolalidade (osmometria de congelamento), conteúdos plasmático e atrial de PNA e de urodilatina urinária (RIE). Além disso, após tratamento com SAP_{AaD} , os rins foram removidos para posterior análise morfológica e determinação de atividades de ATPases (Na^+ ATPase e $(Na^+ + K^+)$ -ATPase).

Resultados: Ao contrário do E_{AaD} , que aumentou a diurese, as SAP_{AaD} reduziram o FU de forma dose-dependente. As SAP_{AaD} (50 mg/kg) reduziram, o FU, de 371,3 (CTL) para 155,6 ml.min (área sob a curva) ($p < 0,05$). As SAP_{AaD} ainda tornaram o C_{H_2O} mais negativo ($-5,56 \pm 0,45$ vs $-3,21 \pm 0,73$ ml/min, no CTL) ($p=0,025$), aumentaram as frações de excreção de Na^+ ($2,17 \pm 0,43$ vs $1,01 \pm 0,27\%$, no CTL) ($p=0,048$) e de K^+ ($131,5 \pm 17,5$ vs $60,1 \pm 20,0\%$, no CTL) ($p=0,028$), aumentaram a atividade da Na^+ ATPase ($25,0 \pm 5,9$, CTL, vs $52,7 \pm 8,9$ nmolPi x mg^{-1} x min^{-1} , $p=0,049$) e diminuíram a urodilatina na urina (792 ± 132 , CTL, vs 299 ± 88 μ g/mL, $p=0,01$).

Conclusão: As SAP_{AaD} reduzem o fluxo urinário, provavelmente por aumentar a reabsorção de água nos túbulos renais. Esse efeito antidiurético das SAP_{AaD} pode ser devido a um aumento na atividade renal das ATPases renais e/ou a uma diminuição na síntese de urodilatina renal.

ABSTRACT

Objective: In this study, we have investigated the effect of crude extract of roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (CE_{AaD}) and of saponins isolated from CE_{AaD} (SAP_{AaD}), on renal function in rats as well as possible mechanisms SAP_{AaD} effects occur.

Materials and Methods: Wistar rats (250-350g) were volume expanded with 0.9% NaCl (4% of body weight) in the absence and presence of CE_{AaD} or SAP_{AaD} given by gavage. Rats were individually housed in metabolic cages and urine flow (UF) was measured every 30 min throughout the experiment (3 h). SAP_{AaD} (50 mg/kg) effect, 90 or 60 min after gavage, also was investigated on the following parameters: GFR (creatinin clearance), Na⁺ e K⁺ (flame photometer), osmolality (freezer point osmometry), plasma and atrial content of ANP and urinary urodilatin (RIA). In addition, after SAP_{AaD} treatment, kidneys were removed for further morphological analysis and determination of ATPases (Na⁺ ATPase e (Na⁺+ K⁺)-ATPase) activities.

Results: Contrarily to CE_{AaD}, which increased diuresis, SAP_{AaD} reduced UF in a dose-dependent manner. SAP_{AaD} (50 mg/kg) reduced UF from 371.3 (CTL) to 155.6 ml.min (area under curve) (p< 0.05). SAP_{AaD} also became C_{H₂O} more negative (-5.56 ± 0.45 vs -3.21 ± 0.73 ml/min, CTL) (p = 0.025), increased fractional excretion of Na⁺ (2.17± 0.43 vs 1.01 ± 0.27%, CTL) (p=0.048) and of K⁺ (131.5 ± 17.5 vs 60.1 ± 20.0%, CTL) (p=0.028), increased Na⁺ ATPase activity (25.0 ± 5.9, CTL, vs 52.7 ± 8.9 nmolPi x mg⁻¹x min⁻¹, p=0.049) and decreased urinary urodilatin (792 ± 132, CTL, vs 299 ± 88 µg/ml, p=0.01).

Conclusion: SAP_{AaD} may reduce UF by increasing water reabsorption in renal tubules. Antidiuretic effect of SAP_{AaD} may be due to an increase in renal activities of ATPases and/or a decrease in renal urodilatin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Formação de urina I: Transporte de Na ⁺ e K ⁺	2
1.2 Formação de urina II: Peptídeo Natriurético Atrial, urodilatina e vasopressina	5
1.3 Breve histórico sobre o uso de plantas medicinais	8
1.4 Função renal e plantas medicinais	12
1.5 <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke	14
1.5.1 Saponinas esteroidais	16
1.5.2 Saponinas triterpênicas	16
1.5.3 Propriedades biológicas e farmacológicas das saponinas	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS	25
4 MÉTODOS	29
4.1 Preparação do EB _{AaD} e das SAP _{AaD}	30
4.2 Protocolos Experimentais	30
4.2.1 Protocolo I	30
4.2.2 Protocolo II	31
4.2.3 Protocolo III	32
4.2.4 Protocolo IV	32
4.2.5 Protocolo V	33
4.2.6 Protocolo VI	34
4.3 Dosagens bioquímicas	35
4.3.1 Clearance de creatinina	35
4.3.2 Dosagem de sódio e potássio	37
4.3.3 Determinação da osmolalidade plasmática e urinária	37
4.3.4 Dosagem de PNA e Urodilatina	38

a) Extração dos peptídeos	38
b) Iodação do PNA	39
c) Radioimunoensaio para PNA e urodilatina	39
4.3.5 Dosagem de HAD	40
4.3.6 Atividade da Na ⁺ ATPase e da (Na ⁺ + K ⁺) – ATPase	41
4.3.7 Avaliação morfológica	42
4.4 Atividade hemolítica das SAP _{AaD}	42
4.5 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Atividade hemolítica das SAP _{AaD}	46
5.2 Efeito das SAP _{AaD} sobre a morfologia renal	49
5.3 Considerações sobre os protocolos experimentais	52
5.4 Efeito do EB _{AaD} e das SAP _{AaD} sobre a diurese	53
5.5 Efeito das SAP _{AaD} sobre a diurese induzida por expansão hiposmótica de volume	58
5.6 Efeito das SAP _{AaD} sobre a reabsorção e excreção de água e eletrólitos	60
5.7 Mecanismo de ação antidiurética das SAP _{AaD}	64
5.7.1 SAP _{AaD} e peptídeos natriuréticos	64
5.7.2 SAP _{AaD} e atividade ATPásica do córtex renal	66
5.7.3 SAP _{AaD} e diurese induzida por furosemida	68
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FORMAÇÃO DE URINA I: TRANSPORTE DE Na⁺ E K⁺

O processo de formação de urina inicia-se com a filtração glomerular de cerca de 25% do plasma que atinge o rim. Esse processo, que promove a passagem de um ultrafiltrado dos capilares glomerulares para o interior dos túbulos renais, é dependente de propriedades glomerulares como coeficiente de permeabilidade, área filtrante, diferença de pressão hidrostática entre capilar glomerular e cápsula de Bowman e da pressão oncótica intracapilar. Assim, qualquer fator que afete alguma dessas propriedades irá interferir na filtração glomerular e, conseqüentemente, na produção de urina (Eaton and Pooler, 2004).. Entre esses fatores incluem-se alteração na perfusão renal, alteração morfológica do glomérulo, redução da massa renal, isquemia renal, feedback justaglomerular, agentes diuréticos, hormônios, hiperfiltração após administração de substâncias osmoticamente ativa, entre outros (FLECK, 1999). O processo de formação de urina ainda envolve a reabsorção do ultrafiltrado da luz tubular para o espaço peritubular e a secreção de substâncias do espaço peritubular para luz tubular. Esses dois processos são fundamentais na determinação da composição e volume finais da urina.

A reabsorção e secreção ao longo dos diferentes segmentos do néfron podem ser feitas através de transporte passivo ou ativo. No transporte passivo não há gasto de energia e o movimento das substâncias, através das células epiteliais do néfron, obedece a forças físicas como gradiente eletroquímico, pressão hidrostática e diferença de potencial elétrico.

O transporte ativo de uma substância se faz contra um gradiente elétrico, químico ou ainda eletroquímico e, assim, requer gasto de energia. Nas células epiteliais dos túbulos renais, essa energia é suprida por enzimas ou bombas, denominadas ATPases, que utilizam diretamente a energia liberada pela hidrólise do ATP para promover o transporte (transporte ativo primário). Além disso, a energia liberada pelas ATPases, para o transporte de um íon, pode induzir um gradiente eletroquímico que facilita o movimento desse íon a favor do gradiente gerado (transporte ativo secundário). Assim, essas bombas são fundamentais para o

transporte de íons e moléculas através do túbulo e, qualquer alteração na atividade ou expressão dessas bombas influenciam diretamente o transporte dessas substâncias. Isto resulta em alteração da composição e do volume de urina. Essas ATPases estão localizadas principalmente na membrana basolateral do túbulo renal, que está em contato direto com o espaço intercelular e os capilares peritubulares (VALTIN & SCHAFFER, 1995; SEGURO *et al.*, 2003). As principais ATPases localizadas na membrana basolateral são a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase e a Na^+ ATPase.

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase é uma enzima pertencente à classe das ATPases do Tipo – P, que utilizam da energia gerada pela hidrólise de uma molécula de ATP para transportar, contra um potencial eletroquímico, três íons Na^+ para fora da célula e dois íons K^+ para o interior celular, estabelecendo e mantendo um meio intracelular com altas concentrações de K^+ e baixa de Na^+ . A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase é um heterodímero composto por subunidades α e β . A subunidade α é uma proteína transmembrana que contém, aproximadamente, 1000 resíduos de aminoácidos e é responsável pelas propriedades catalíticas e transportadoras da enzima. Nessa subunidade estão localizados os sítios de ligação dos cátions, ATP e ouabaína (LINGREL & KUNTZWELLER, 1994; MERCER, 1993). A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase é, especificamente, inibida por glicosídeos cardiotônicos sendo, a ouabaína, o glicosídeo mais utilizado. No rim, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase está localizada na membrana basolateral das células dos túbulos renais e tem um papel importante na reabsorção de Na^+ e água (BLANCO & MERCER, 1998).

A subunidade β é um polipeptídeo glicosilado, que possui cerca de 310 resíduos de aminoácidos e atravessa a membrana plasmática apenas uma vez. Acredita-se que essa subunidade seja importante para a afinidade da enzima pelo K^+ e Na^+ e pela ouabaína, além de servir como molécula de adesão em células nervosas (EAKLE *et al.*, 1994; EAKLE *et al.*, 1995).

Há ainda uma terceira subunidade, denominada γ , que é um polipeptídeo de pequeno peso molecular (8000 – 14000 Da). Estudos demonstraram que essa subunidade pode estar envolvida na estabilização da conformação E1 da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase (THERIEN *et al.*, 1997).

Assim como outras proteínas, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase é expressa em diferentes células e tecidos de diferentes organismos, sob a forma de diferentes isoenzimas

(proteínas que catalisam a mesma reação). A expressão de isoenzimas da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase está estritamente ligada às diferentes condições fisiológicas e/ou patológicas do organismo. Por exemplo, durante o desenvolvimento, há uma mudança relativa nas quantidades de isoformas nos tecidos. Hormônios podem modular a expressão de uma determinada isoforma ou afetarem diretamente a atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase (EWART & KLIP, 1995).

A regulação da atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase pode ser feita pela variação na quantidade de enzima na membrana celular, pela mudança no ritmo de sua síntese ou degradação assim como pela mobilização de vesículas, contendo as enzimas, para a superfície celular. A regulação ainda pode ser feita por alteração direta da bomba, quando esta já está presente na membrana celular, através de fatores como concentração intracelular de Na^+ , ouabaína ou fatores que levem a um aumento na atividade de proteínas quinases (PKA, PKC ou PKG) (BLANCO *et al.*, 1998).

A Na^+ ATPase, outra bomba presente na membrana basolateral das células tubulares renais, transporta íons Na^+ acoplados a íons Cl^- e água do interior das células renais para o meio intersticial, contra um gradiente químico. Para isso, utiliza a energia liberada pela hidrólise do ATP (WHITTHEMBURY & PROVÉRPIO, 1970). A Na^+ ATPase é cerca de 10 vezes menos ativa que a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase, o que sugere que a mesma possa estar envolvida no controle fino do transporte de Na^+ nos túbulos renais (CARUSO-NEVES *et al.*, 2002). Essa bomba foi, inicialmente, descrita nas frações microssomais da córtex renal de cobaias (PROVÉRPIO *et al.*, 1975) e no rim de ratos (OSORE, 1979). Atualmente, a sua presença já foi relatada em diferentes tecidos de diversas espécies como rato, porco, galinha, pato, iguana, camarão, peixe e anfíbios (MORETI *et al.*, 1991).

As principais diferenças entre a Na^+ ATPase e a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase que as tornam independentes são:

a) A Na^+ ATPase é estimulada somente pelo Na^+ e Li^+ não sendo estimulada por nenhum outro cátion, inclusive o K^+ , (PROVÉRPIO & DEL CASTILLO, 1981; DEL CASTILO *et al.*, 1982);

b) A Na^+ ATPase é insensível à ouabaína mesmo em concentrações superiores a 10 mM, diferentemente da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase (PROVÉRPIO *et al.*, 1986);

- c) A atividade da Na^+ ATPase é especificamente inibida pela furosemida, triflocina, ácido etacrínico e iodeto de sódio, o que não ocorre com a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase (DEL CASTILO *et al.*, 1982; PROVÉRPIO *et al.*, 1986);
- d) Diferentemente da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase, a Na^+ ATPase não é digerida pela tripsina (PROVÉRPIO *et al.*, 1986);
- e) Possuem diferentes parâmetros cinéticos quando submetidas às mesmas condições de pH, temperatura e concentração de substratos (DEL CASTILO *et al.*, 1982);
- f) A Na^+ ATPase possui menor atividade ATPásica do que a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase, possuindo cerca de 10 % da atividade ATPásica total (CARUSO-NEVES *et al.*, 2002.)

1.2 FORMAÇÃO DE URINA II: PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL, URODILATINA E VASOPRESSINA

Uma série de agentes produzidos no organismo interfere no processo de formação de urina por atuarem, tanto na regulação da filtração glomerular, como no transporte de eletrólitos e água ao longo dos túbulos renais.

O hormônio antidiurético (HAD), também conhecido como vasopressina, é um hormônio fundamental na manutenção da osmolalidade plasmática e homeostase dos líquidos corporais. Um aumento na osmolaridade plasmática ou redução do volume circulatório efetivo estimula a secreção de HAD, pela hipófise posterior, levando a um aumento na reabsorção de água e concentração da urina pelos rins retornando, a osmolalidade plasmática e o volume extracelular, a níveis normais (BANKIR, 2001; VERBALIS, 2003).

O ductor coletor é o principal alvo de ação desse hormônio no rim, onde o HAD se liga a receptores V2, presentes na membrana basolateral das células principais do ducto coletor, para produzir seu efeito antidiurético (INOUE *et al.*, 2001).

O receptor V2 é um receptor acoplado à proteína Gs localizada sobre a face citoplasmática da membrana das células principais dos ductos coletores. A ligação do HAD ao receptor V2 causa a ativação, pela proteína Gs, da enzima adenilato ciclase que converte o ATP intracelular em AMPc. O AMPc formado ativa a proteína

quinase A (PKA) intracelular que fosforila os aminoácidos serina e treonina do domínio hidrofílico dos canais de água denominados aquaporinas 2 (AQP2). Isso induz a translocação reversível das AQP2, de vesícula-estoque intracelular, para a membrana apical das células principais aumentando, assim, a permeabilidade dos ductos coletores à água (NIELSEN *et al.*, 1995).

Além da AQP2, que é diretamente regulado pela vasopressina, outras três aquaporinas, AQP1, AQP3 e AQP4 estão presentes em outros locais do néfron. A AQP1 é constitutivamente expressa nas membranas lateral e basolateral das células do ramo descendente da alça de henle enquanto a AQP3 e AQP4 são constitutivamente expressas na membrana basolateral das células principais dos ductos coletores (INOUE *et al.*, 2001).

Além do aumento da reabsorção de água promovido pela HAD através do aumento do número de AQP2 na membrana apical das células tubulares, estudos indicam que o HAD estimula canais de sódio sensíveis a amilorida, presentes na membrana apical das células principais dos ductos coletores (SCHAFER & TROUTMAN, 1990).

No rim, a ação do HAD é afetada por vários fatores como endotelina, PNA, glucagon, oxitocina e adrenomedulina (INOUE *et al.*, 2001).

O peptídeo natriurético atrial (PNA) pertence à família dos peptídeos natriuréticos que ainda inclui o peptídeo natriurético tipo B (PNB), peptídeo natriurético tipo C (PNC) e urodilatina (LEVIN *et al.*, 1998). O PNA se caracteriza por uma potente ação natriurética e diurética (de BOLD, 1981). Esses peptídeos ligam-se a receptores específicos presentes na membrana plasmática das células denominados receptor do tipo A, receptor do tipo B e receptor do tipo C. O RPN-A e o RPN-B são isoformas de receptores ligados à enzima guanilato ciclase, que após a ligação do peptídeo ao receptor, catalisa a conversão do GTP em guanosina 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) (ANAND-SRIVASTAWA *et TRACHTE*, 1993). O RPN-C não possui o domínio para a enzima guanilato ciclase e é caracterizado como um receptor ligado ao “clearance” dos peptídeos natriuréticos (NUSSENZVEIG *et al.*, 1990; FORSSMANN *et al.*, 2001).

Entre os peptídeos natriuréticos, o peptídeo natriurético atrial (PNA₉₉₋₁₂₆) é o mais caracterizado. Esse peptídeo é uma molécula formada por uma cadeia de 28 aminoácidos, originada da clivagem enzimática da porção carboxi-terminal do seu

precursor, o pró-PNA, pelas enzimas carboxipeptidase ou encefalina-convertase (RUSKOAHO *et al.*, 1986). O precursor pró-PNA é uma molécula de 126 aminoácidos (FLYNN *et al.*, 1983), sintetizada e armazenada nos miócitos atriais (SAKAMOTO *et al.*, 1985) e que na sua porção carboxi –terminal encontra-se a forma ativa do PNA₉₉₋₁₂₆ (BELTOWSKI & WÓJCICKA., 2002).

O principal local de ação do PNA₉₉₋₁₂₆, no rim, são as células principais localizadas no segmento intramedular do ducto coletor. Estudos demonstram que o efeito do PNA nesse segmento é mediado por receptores RPN-A levando a um aumento nos níveis intracelulares de GMPc (KISHIMOTO *et al.*, 1996; FORSSMANN *et al.*, 1998). O GMPc é o principal segundo mensageiro envolvido na inibição, pelo PNA, do transporte de Na⁺ e água (BELTOWSKI & WÓJCICKA, 2002). Então, a propriedade natriurética e diurética do PNA é resultado da sua ação sobre diferentes componentes envolvidos na formação da urina, tais como aumento do ritmo de filtração glomerular (RFG) (COGAN, 1986), diminuição da reabsorção de Na⁺ através da inibição de diferentes canais e bombas enzimáticas presentes, principalmente, na membrana luminal e basolateral do segmento medular do ducto coletor (BELTOWSKI & WÓJCICKA, 2002, CARUSO-NEVES *et al.*, 2004) e inibição da reabsorção de Na⁺ e água promovida pela vasopressina (NONOGUCHI *et al.*, 1989) e angiotensina II (HARRIS *et al.*, 1987), entre outras ações. Como resultado final, ocorre aumento na diurese e natriurese, funções pelas quais o PNA participa da manutenção do volume extracelular e da pressão arterial.

A urodilatina é um peptídeo composto por 32 aminoácidos, primeiramente, isolado de urina humana (SCHULZ KNAPPE, 1988). Sua molécula possui uma seqüência de aminoácidos idêntica à do PNA (PNA₉₉₋₁₂₆), porém, com quatro aminoácidos adicionais na porção amino-terminal da sua molécula. Isto sugere que ambos os peptídeos são derivados do mesmo gene e do mesmo peptídeo precursor, PNA₁₋₁₂₆, no entanto, na síntese de urodilatina o precursor é processado de forma diferente que na síntese de PNA (FORSSMANN *et al.*, 2001). Estudos têm mostrado que a urodilatina exógena exerce efeitos similares ao PNA nos rins, ou seja, reduz a reabsorção tubular de sódio e água aumentando, assim, a excreção renal dos mesmos (GOETZ, 1991). Doses equimolares de urodilatina e PNA produzem inibição equivalente do transporte de Na⁺ nos ductos coletores medulares (SCHULZ KNAPPE *et al.*, 1990). No entanto, trabalhos realizados em humanos e cães

mostram que, também em doses equimolares, a urodilatina produz efeitos natriurético e diurético maiores que o PNA (BESTLE & BIE., 1993; HIDELBRANDT *et al.*, 1992). Provavelmente, esse efeito mais acentuado decorre de uma maior exposição dos receptores RPN-A à urodilatina uma vez que, ao contrário do PNA, a urodilatina não é metabolizada pelas endopeptidases presentes no rim (GEGELMANN *et al.*, 1988). Em resumo, a urodilatina é um peptídeo sintetizado no próprio rim, nos segmentos distais do néfron. Em seguida, ela é secretada no lúmen tubular e atua, de forma parácrina, sobre receptores RPN-A localizados na membrana de células do segmento intramedular do ducto coletor inibindo a reabsorção de sódio, provavelmente, através dos mesmos mecanismos utilizados pelo PNA (BELTOWSKI & WÓJCICKA, 2002)

1.3 BREVE HISTÓRICO SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Estudos no campo da antropologia, paleontologia e arqueologia mostram que o Homem, desde a época paleolítica, já fazia uso de plantas ou preparações à base de vegetais com fins de preservação da vida e tratamento de enfermidades (CASTRO, 1981).

Na antiguidade, quando o Homem deixa de temer a natureza e passa a buscar igualdade entre si e a mesma, a imortalidade passa a ser o sonho almejado. Dessa forma, o homem fez nascer a alquimia. Segundo GOLDFARB (1988), a essência vital encontrada nesta era extraída das plantas e dos animais.

Os chineses, hindus, hebreus e egípcios foram os povos que mais se destacaram nas práticas alquímicas durante a antiguidade. O Pentsao, obra chinesa sobre plantas medicinais, data-se de três mil anos antes do cristianismo. O documento mais antigo teria sido escrito pelo imperador Chen-Ming e continha 365 espécies vegetais, uma para cada dia do ano. O Papiro de Ebers, um documento onde se encontram relatos sobre várias enfermidades e métodos de tratamento, escrito pelos egípcios, datada de 155 a.C., possui mais de 20 metros de comprimento incluindo referências a mais de 7000 substâncias medicinais incluídas em mais de 800 fórmulas, Dentre as substâncias mencionadas nesse documento,

encontram-se casca de romã, óleo de oliva, maconha, ópio, canela, entre outras (AIBORNOZ, 1980).

Podem ser citados ilustres personagens dessa época histórica que contribuíram para impulsionar a Fitoterapia. Por exemplo: Hipócrates (460? a 370? a. C.), ilustre médico grego, que aconselhava medicamentos vegetais; o filósofo grego Teofrasto (372 a 287 a.C.) que com a sua “História das plantas”, deixou descrições botânicas muito precisas de cerca de 455 plantas, acompanhadas de indicações sobre efeitos tóxicos e propriedades curativas; e Galeno, pai da farmácia, que no século II, publicou uma muito pormenorizada colectânea de fitopreparações medicamentosas, chamadas ainda hoje preparações "galénicas". Do ponto de vista farmacêutico, a grande linha de força do galenismo foi a transformação da patologia humoral numa teoria racional e sistemática pela qual a medicina greco-romana passou para o Ocidente cristão, dominando a medicina e a farmácia até ao Século XVII e mantendo ainda uma grande influência mesmo no século XVIII (ARBER, 1988; JONES, 1997). Destaca –se ainda no campo das plantas medicinais um grego chamado Dioscórides, que escreveu o tratado “*De Materia Medica*” que representa um marco histórico no conhecimento de numerosos fármacos, muitos dos quais ainda hoje são usados. Nele, se descrevem cerca de 600 produtos de origem vegetal, animal e mineral, com indicações sobre o seu uso médico (ARBER, 1988). Foi tal a projecção da obra de Dioscórides que, tendo sido escrita no ano 78 da nossa era, passa a ser usada, como guia de ensino, no mundo romano e no árabe, continuando em vigor até finais da Idade Média, pois ainda no século XV, são feitas cópias em latim dessa obra (RIDDLE, 1985).

Na idade média, com a necessidade terapêutica de se curar a peste, foram publicados os primeiros *Herbaria*, que eram compilações sobre plantas medicinais que tinham por objetivo instruir monges sobre a importância da utilização de vegetais (ORLANDI & VERLOET, 1983). Nesse período destaca-se a figura de médico Phillipus Aureolus Theoperastus Bombastus von Hohenheim, conhecido como Paracelso. Nascido na aldeia de Einsiedeln, Suíça, em 17 de dezembro de 1493, Paracelso contestava o sistema polifarmacêutico galénico e possuía uma visão sobre a doença que ia muito além da visão tradicional vigente na época que, baseada no pensamento do filósofo Hipócrates, acreditava que as doenças eram causadas por mau funcionamento dos fluídos do corpo humano: sangue, catarro,

bílis preta e bílis amarela, enquanto que o médico suíço definia a saúde como equilíbrio e doença com o desequilíbrio de todas as energias presentes no ser humano, tanto no corpo físico como espiritual. E que para essas doenças do corpo existiam certos remédios que pudessem curá-las. Ou seja, procurava a cura das doenças na aplicação de substâncias químicas. Assim, Paracelso lançou uma das bases da Química Moderna e, portanto, da farmacologia e do progresso da ciência médica. Utilizava-se da alquimia, para preparo dos medicamentos, além da filosofia, astronomia e virtus como base para a cura das enfermidades. Paracelso associava as características exteriores de uma planta a sua função e atributos medicinais. Assim, por exemplo, folhas em forma de coração foram recomendadas para doenças cardíacas. Além disso, Paracelso reconhecia que a fé fortalecia a imaginação e auxiliava na cura, fato atualmente conhecido como efeito placebo, no qual uma substância sem qualquer efeito farmacológico, prescrita para levar o doente a experimentar alívio dos sintomas pelo simples fato de acreditar nas propriedades terapêuticas do produto. Paracelso faleceu em 24 de setembro de 1541 com apenas 47 anos, deixando um legado de obras escritas e ensinamentos que compõem o que atualmente é chamado de medicina experimental (RIDDLE, 1985; PARACELSO, 2005).

Na idade moderna, o uso das plantas, como fonte terapêutica, pode ser dividido em três períodos distintos, conforme sugerido por YUNES & CECHINEL FILHO (2001).

a) Primeiro Período (1800 a 1900): Nesse período, alguns países europeus como Inglaterra, França e Alemanha passam por uma revolução científico-tecnológico-industrial denominada “Revolução Industrial”. Essa época se caracteriza por uma estreita relação entre a química orgânica moderna e a medicina, na qual os químicos, que estudavam plantas medicinais, se dedicavam a isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas consagradas pela medicina popular. Durante esse período, ocorreu o isolamento de princípios ativos de várias plantas e muito deles ainda são usados na terapêutica atual. Entre esses, encontram-se a morfina, extraída da *Papaver somniferum* por Seturner (1803), a efedrina, extraída da *Ephedra sinical* por Nagai (1887) e a atropina, extraída da *Atropa belladona* por Geiger e Hess (1833) (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Cabe ressaltar que na

América Latina, a quinina foi isolada da *Cinchona calisaya* por Pelletier e Canentau (1877), uma planta usada no tratamento da malária no Peru (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Assim, o surgimento e expansão de sociedades industriais promoveram um avanço na utilização de moléculas ativas contidas nas plantas.

b) Segundo Período (1901 a 1970/80): É um período de decadência do uso de plantas com finalidades terapêuticas decorrente de um avanço no desenvolvimento de fármacos de origem sintética. Diversos fármacos sintéticos foram desenvolvidos nessa época, principalmente, após a Segunda Guerra Mundial sendo que, muito deles, se encontram no mercado e ainda são de grande importância para a Humanidade. Exemplo desses são os anti-histamínicos (antergan), antipsicóticos (clorprozamina), antidepressivos (iproniacida), ansiolíticos pertencentes à classe das benzodiazepinas, antipiréticos e antiinflamatórios (indometacina). Nesse período, o uso de produtos naturais, de importância terapêutica, limitava-se a antibióticos obtidos de fungos. As plantas medicinais eram consideradas sem valor científico sendo usadas, apenas, na medicina popular.

c) Terceiro Período (1970/80 até o presente): O processo de síntese orgânica apresentou alguns problemas, tais como alto custo na obtenção de novos fármacos, dificuldade na descoberta de novos fármacos e incapacidade de produzir fármacos com complexidade estrutural semelhante às moléculas produzidas pelas plantas. Assim, há um retorno ao interesse pelas plantas como fonte de novas substâncias biologicamente ativas e de matérias primas (moléculas puras) que, mesmo não tendo atividade farmacológica ativa intrínseca, podem ser transformadas, por síntese parcial, em derivados farmacologicamente ativos.

Uma resolução (WHO 3133) da Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para a importância das plantas medicinais nos sistemas de saúde dos países em desenvolvimento (AKERELE, 1985). O programa de Medicina Tradicional da OMS ressalta a importância do estudo das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de verificar, tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de substâncias tóxicas que podem existir nestas plantas. Estes fatos enfatizam a necessidade de metodologia científica adequada para caracterizar os

efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos das plantas medicinais. Soma-se a isto, a necessidade de isolamento e purificação dos eventuais compostos que apresentem as atividades biológicas atribuídas a tais plantas, o que poderia levar ao desenvolvimento de compostos mais seguros e potentes no tratamento de diversas alterações fisiopatológicas.

O Brasil, com mais de 120.000 variedades de plantas, possui uma enorme diversidade biológica sendo considerado, portanto, um dos últimos celeiros da flora e fauna do Planeta. Nos últimos anos, numerosas pesquisas com plantas medicinais usadas como remédio ou veneno, na medicina popular, têm sido desenvolvidas no Brasil.

1.4 FUNÇÃO RENAL E PLANTAS MEDICINAIS

Muitas plantas medicinais são utilizadas na medicina popular brasileira com o intuito de melhorar algum distúrbio renal ou mesmo por apresentarem apenas efeito diurético (CRUZ, 1965; PINHEIRO SOBRINHO, 1977). Entre estas, podemos citar: *Cordia Salicifolia* (chá de bugre), *Jacarandá caroba* DC (caroba), *Imperata exaltata* Brogniard (sapé), *Leonotis nepetaefolia* R. Brown (cordão de frade) e *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (cerveja de índio). No entanto, existem poucos estudos, utilizando metodologia científica adequada, que validem a utilização das mesmas e, muito menos, a respeito dos seus mecanismos de ação. Por exemplo, em um levantamento bibliográfico (Scirus) recente foram encontrados os seguintes resultados de acordo com o cruzamento das palavras-chaves: Medicinal plants *versus* renal function – 129 trabalhos; Medicinal plants *versus* nephrotoxicity – 19 trabalhos e Medicinal plantas *versus* renal apoptosis – 13 trabalhos. Este número de trabalhos é surpreendentemente pequeno considerando o tamanho da comunidade científica mundial. Além do mais, chama a atenção o fato da maioria destes trabalhos não terem sido desenvolvidos nos países que detêm tecnologia científica avançada. Daí o nosso interesse em investigar plantas medicinais, popularmente usadas no Brasil, às quais são atribuídas algum efeito renal.

Estudo preliminar, realizado em nosso laboratório, mostrou que o extrato etanólico das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke aumenta, de forma dose-dependente, o fluxo urinário sem, no entanto, afetar o volume de água ingerido

em ratos mantidos em gaiolas metabólicas (MEYER *et al.*, 2002). Esta observação sugere que esta planta possui substâncias com atividade diurética. Observação semelhante foi relatada por HALOUI *et al.* (2000) ao verificarem que ratos Wistar normotensos tratados, por sete dias, com o extrato aquoso da *Rosamarinus officinalis* e da *Centaurium erythraea* aumentou significativamente a diurese, a excreção de Na^+ , Cl^- e K^+ com concomitante diminuição do ritmo de filtração glomerular. Já KREYDIYYEH *et al.* (2002) mostraram que extratos aquosos de *Petroselinum hortense* e de *Petroselinum sativum* também aumentam o volume urinário, em ratos, e que esse efeito diurético é mediado por inibição da bomba (Na^+ + K^+) ATPase, presente no córtex e medula renais. Também o efeito diurético e natriurético do extrato metanólico de sementes de *Strychnos potatorum*, administrado por via oral em ratos, foi comparável ao efeito da furosemida (BISWAS *et al.*, 2004). Em um estudo comparativo, HERRERA-ARELLANO *et al.* (2004) mostraram que o tratamento oral com o infuso de caule da *Hibiscus sabdariffa* foi capaz de reduzir as pressões sanguíneas sistólica e diastólica de pacientes hipertensos (30 - 80 anos), submetidos ao tratamento por quatro semanas. Esse efeito hipotensivo foi similar ao efeito antihipertensivo obtido com o captopril. Os autores sugeriram que o efeito antihipertensivo da *H. sabdariffa* era devido à atividade diurética e natriurética observada nos pacientes tratados com o extrato vegetal.

Outras espécies como a *Ananas cosmosus* e a *Carica papaya* também afetam a função renal já que o tratamento de ratos, por via oral, com o extrato aquoso das raízes das mesmas aumentaram a diurese em 79 e 74%, respectivamente (SRIPANIDKULCHAI *et al.*, 2001). Esse efeito diurético foi o mesmo obtido utilizando uma dose equivalente de hidroclorotiazida. Também, o tratamento com os extratos das duas espécies, resultou numa excreção de eletrólitos semelhante à observada nos ratos tratados com o diurético tiazídico. Paralelamente a estas observações, estudos mostram que algumas plantas exibem efeito antidiurético. Por exemplo, ratos tratados com o extrato aquoso de raízes de *Imperata cilíndrica* sofreram queda no fluxo de urina (SRIPANIDKULCHAI *et al.*, 2001). De forma semelhante, ratos tratados com óleo essencial extraído de sementes de *Pimpinella anisum* também apresentaram antidiurese. Esse efeito antidiurético parece estar associado a um aumento na atividade da (Na^+ + K^+) ATPase renal (KREYDIYYEH *et al.*, 2003).

1.5 *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE

A *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (AaD) é uma planta nativa da região Amazônica pertencente à família das Rhamnaceas, sendo a única espécie do gênero *Ampelozizyphus*. É popularmente conhecida como “Cerveja de Índio” (PAULINO-FILHO *et al.*, 1979).

O infuso de suas raízes é usado popularmente no tratamento contra picada de cobra e na prevenção da malária (BRANDÃO, 1991). KRETTLI *et al.* (2001) mostraram que o extrato bruto das raízes da AaD é ativo contra os esporozoítas (forma infectante do agente etiológico da malária que são protozoários do gênero *Plasmodium* encontrados nas glândulas salivares do mosquito vetor) do *Plasmodium gallinaceum* e/ou contra os protozoários que se encontram nos estágios iniciais do ciclo de vida parasitário, desenvolvido nas células do parênquima hepático (esquizogonia tecidual). A AaD reduziu o parasitismo tecidual em galinhas inoculadas com o protozoário. Estas observações justificam o uso popular das raízes dessa planta na profilaxia da malária. Além disso, a AaD é popularmente usada para induzir diurese. Nesse sentido, em um estudo preliminar realizado no Laboratório de Fisiologia Renal, ICB, UFMG, foi observado que o tratamento crônico (5 dias) com o extrato etanólico das raízes de AaD aumenta o fluxo urinário em ratos mantidos em gaiolas metabólicas (MEYER, 2002), indicando que esta planta possui substâncias com atividade diurética.

Das raízes da AaD, já foram isoladas saponinas triterpênicas bem como outros compostos triterpênicos como Lupeol, ácido betulínico, betulina, ácido melaleico e ácido dihidroxilup-20(29)-em-28 β – oico. Esses últimos 5 compostos também são encontrados em outras plantas.

Saponinas, compostos sintetizados por enorme variedade de plantas, possuem uma estrutura anfipática formada por resíduos hidrofílicos de açúcares ligados a uma aglicona hidrofóbica. Essa aglicona é composta de átomos de carbono organizados em forma de anéis e é denominada sapogenina (CHANDEL & RASGOTI, 1980; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 1996). A parte polar das saponinas é formada por açúcares como a glicose, galactose, arabinose, ramnose, xilose e ácido glicurônico, entre outros. Em geral, os açúcares estão na forma de oligossacarídeos distribuídos em cadeias lineares ou ramificadas, embora os monossacarídeos

também possam ocorrer. O número de moléculas de açúcares mais freqüente, nesses compostos, varia de 3 a 5. Os mono e oligossacarídeos podem se ligar às agliconas através, tanto de ligação do tipo éter, como do tipo éster (MAHATO *et al*, 1988).

Quanto ao número de cadeias de açúcares, presente na molécula, as saponinas podem ser classificadas em monodesmosídicas e bidesmosídicas. As monodesmosídicas são saponinas que apresentam apenas uma cadeia de açúcar ligada à aglicona. Essa ligação, geralmente, do tipo éter, envolve processo de redução dos oligossacarídeos e da hidroxila secundária presente, normalmente, no carbono 3. Em raros casos, esta ligação pode ser do tipo éster. As saponinas bidesmosídicas são saponinas que apresentam, além de uma cadeia de açúcar ligada, por ligação éter, à aglicona no carbono 3, uma segunda cadeia de açúcares ligada ao carbono 28, por meio de uma ligação do tipo éster, das agliconas triterpênicas. Também existem saponinas nas quais as duas cadeias de açúcares estão ligadas às agliconas somente por meio de ligação do tipo éster (MAHATO *et al*, 1988).

A diferença na polaridade dos elementos que compõem a molécula das saponinas é responsável pela capacidade das mesmas de reduzir a tensão superficial da água levando à formação de espuma, quando em solução aquosa. A capacidade das saponinas de interagir com esteróis, presentes na membrana plasmática de eritrócitos, aumenta a permeabilidade dessa membrana, o que permite a entrada de íons e água para o interior das células resultando na ruptura das mesmas e liberação de hemoglobina (KARABALIEV & KOCHEV, 2003). Apesar das propriedades tensoativa e hemolítica serem características marcantes das saponinas, elas não são comuns a todas às saponinas e, portanto, não podem ser usadas para definir esse grupo de compostos. Uma definição estrutural da aglicona desses compostos é a melhor maneira para defini-los (BRUNETON, 1999).

De acordo com a estrutura de suas agliconas, as saponinas podem ser classificadas em esteroidais e triterpênicas.

1.5.1 Saponinas Esteroidais

São compostos que possuem 27 átomos de carbono em seu esqueleto, geralmente distribuídos em seis anéis, e que apresentam grande semelhança estrutural com as saponinas triterpênicas. A diferença entre as mesmas é que a conformação do epoxi esqualeno, para a biossíntese das agliconas esteroidais, é de cadeira-barco-cadeira e não de cadeira-cadeira-cadeira como ocorre na biossíntese das agliconas triterpênicas (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 1996)

1.5.2 Saponinas Triterpênicas

As saponinas triterpênicas fazem parte da família dos terpenos que é a maior família de compostos naturais sendo constituída por mais de 40000 moléculas diferentes (MAHATO *et al.*, 1988)

As vias de biossíntese das saponinas triterpênicas (BRUNETON., 1999) estão mostradas na Figura 1. Em geral, os compostos terpênicos têm como precursor o ácido mevalônico que é formado a partir da Acetil-Coenzima A (CoA). A Acetil-CoA é formada pela ativação da molécula de ácido acético, através de esterificação, pelo grupo tiol da molécula de CoA. O ácido mevalônico é ativado por fosforilação seguida por eliminação descarboxilativa, para gerar o pirofosfato de 3-isopentila (IPP). A isomerização deste último a pirofosfato de 2-isopentila (DMAPP) resulta numa molécula que pode ionizar-se facilmente e adicionar-se a cinco sucessivas unidades de IPP, gerando uma molécula triterpênica de 2,3 epoxi-esqualeno. (AHARONI *et al.*, 2005).

Esse processo de biossíntese do 2,3 epoxi-esqualeno é comum aos animais, fungos, algas e plantas superiores. No entanto, após sua formação, as rotas biossintéticas entre os organismos citados divergem bastante. Os vegetais são capazes de ciclizar o 2,3-epoxi-esqualeno (Fig. 2), que se encontra em uma conformação cadeira-cadeira-cadeira, gerando especificamente as agliconas de saponinas tetracíclicas do tipo damarano (BRUNETON., 1999).

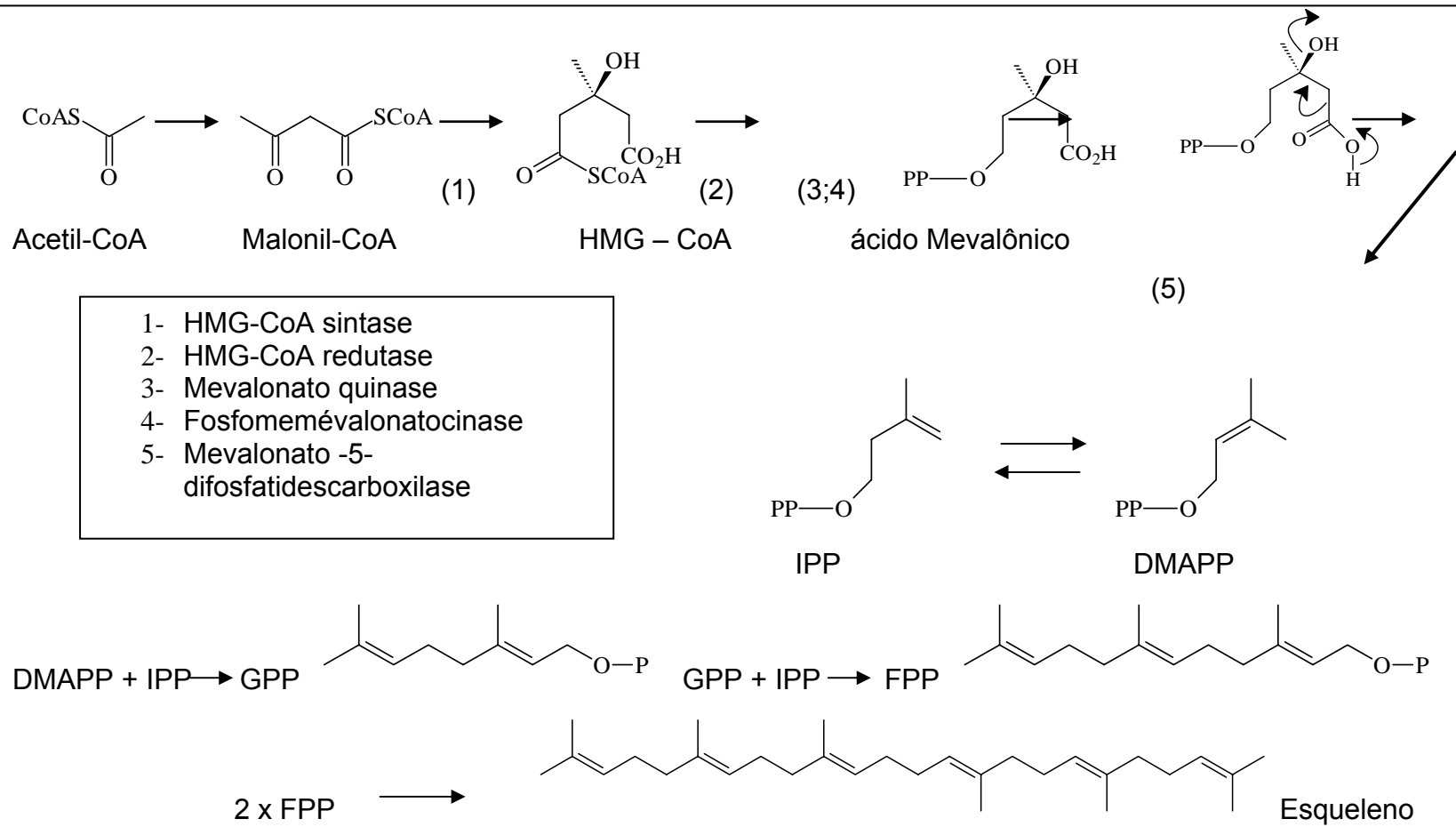


Figura 1. Rota biossintética dos terpenos. CoA, coenzima A, HMG, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA, DMAPP, pirofosfato de 2-isopentila, IPP, pirofosfato de 3-isopentila, GPP, geranilpirofosfato, FPP, farnesilpirofosfato.

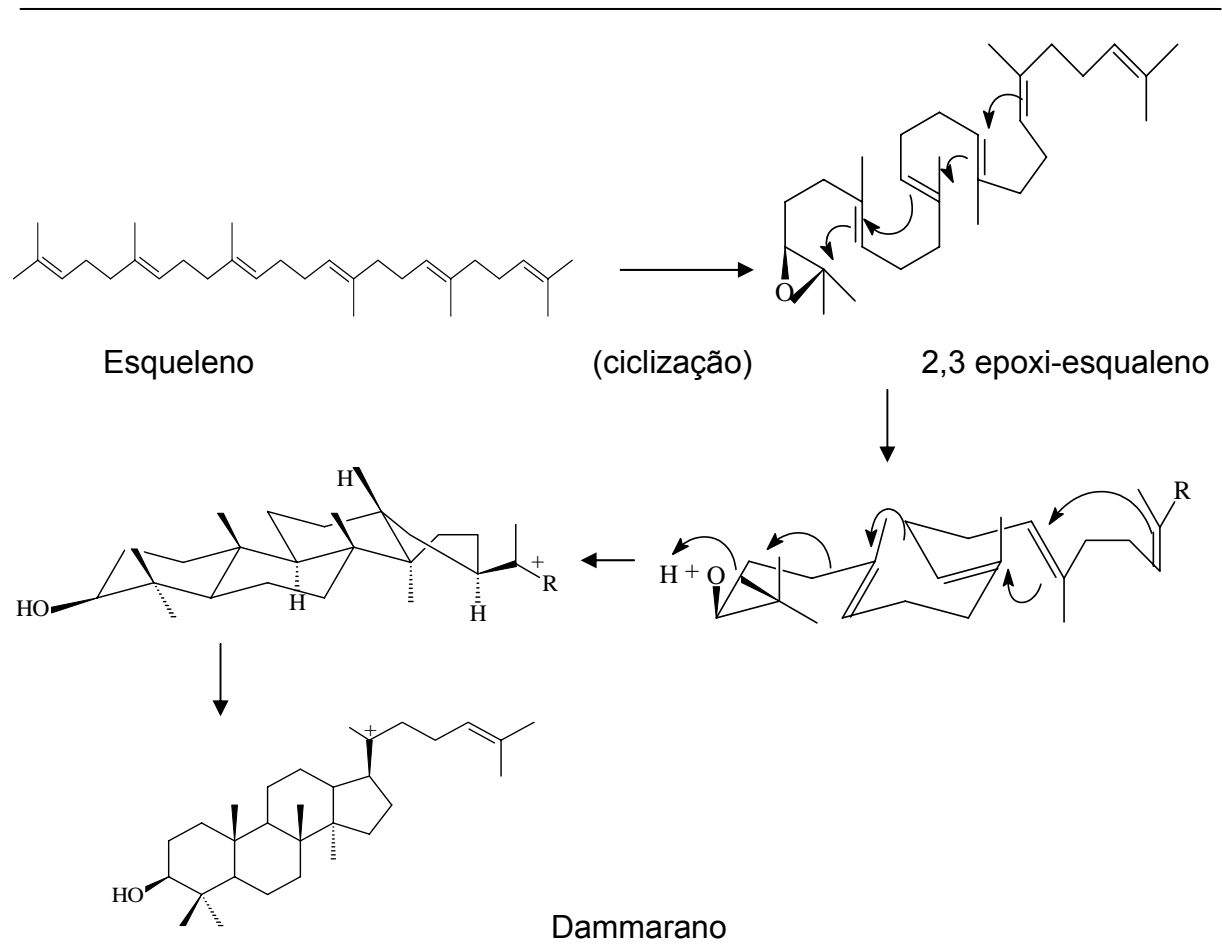


Figura 2. Ciclização do esqualeno durante a biossíntese de agliconas tetracíclicas do tipo dammarano conforme ocorre nos vegetais.

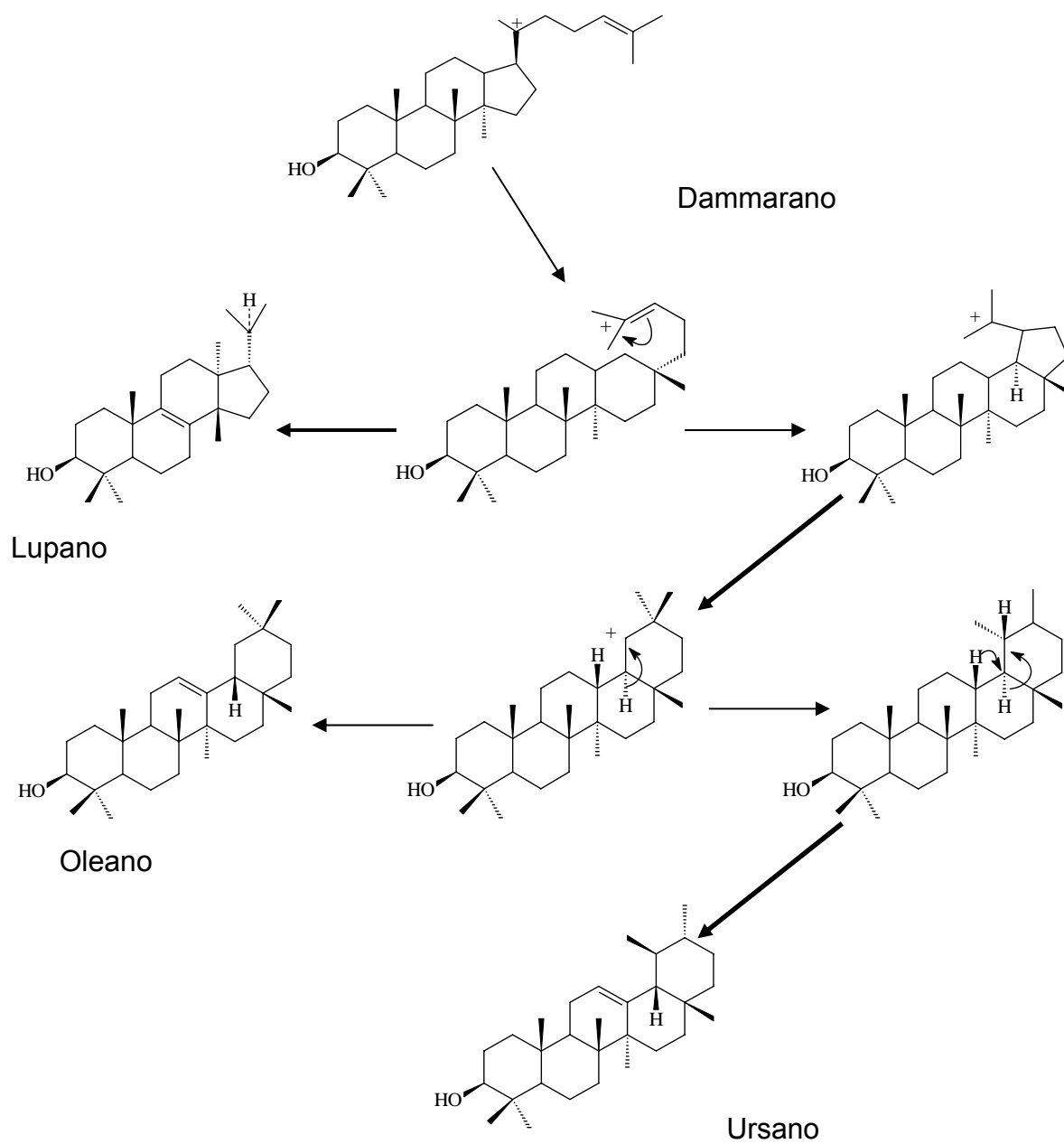


Figura 3. Progressão do dammarano para formação de agliconas de saponinas pentacíclicas nos vegetais.

Assim, as saponinas triterpênicas podem ser definidas como glicosídeos que possuem uma aglicona triterpênica formada pela ciclização do (3S) – 2,3 epoxi- 2,3 – dihidroesqualeno ou, em raros casos, do próprio esqualeno.

A estrutura das principais saponinas triterpênicas isoladas das raízes da AaD encontra-se ilustrada na Figura 4.

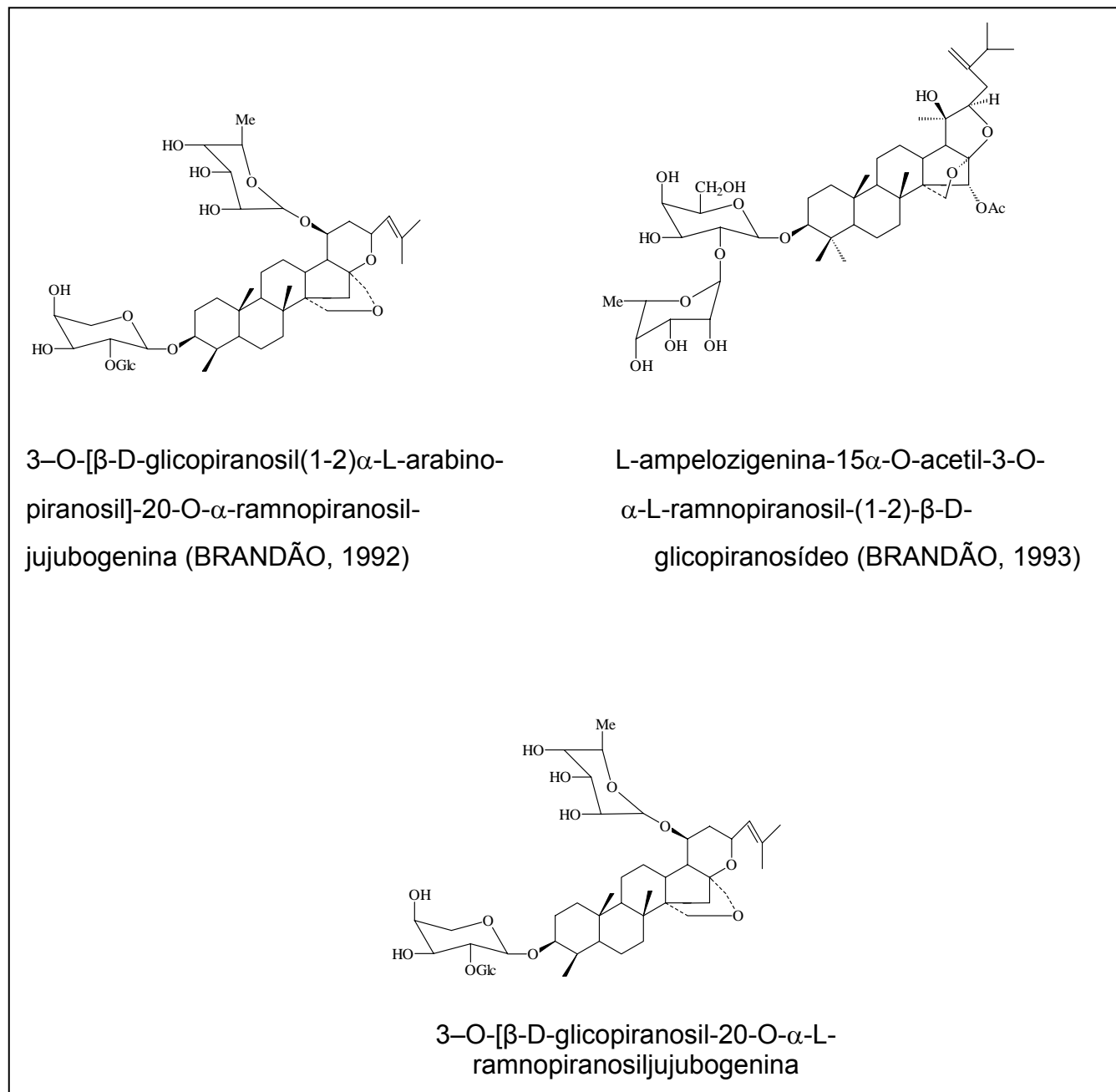


Figura 4. Estrutura de três saponinas triterpênicas isoladas das raízes da AaD.

Propriedades Biológicas e Farmacológicas das Saponinas

As saponinas triterpênicas é um grupo de compostos naturais que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. A sua atividade mais comum é a capacidade de produzir hemólise. Essa propriedade é resultado da interação das suas moléculas com colesteróis presentes na membrana de eritrócitos resultando na mudança conformacional da membrana levando a uma penetração de íons e água para dentro da célula com conseqüente rompimento celular e liberação de hemoglobina (GLAUBERT *et al.*, 1962; HARUNA *et al.*, 1995). Essa atividade hemolítica das saponinas, que faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias) (BRUNETON, 1999), está ligada a muitas das atividades antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas (LACAILLE-DUBOIS & WAGNER, 1996).

Além das atividades antibacteriana e antifúngica, as saponinas triterpênicas apresentam atividades contra outros microorganismos como vírus (CHAKRABORTY *et al.*, 2002) e protozoários como *Leishmania infantum* (GERMONPREZ *et al.*, 2005).

Estudos utilizando saponinas triterpênicas como imunomoduladores celulares e humorais em cães, camundongos, porcos e outros primatas não humanos, têm se intensificados. Além disso, esses compostos têm sido testados como adjuvantes em vacinas contra o HIV-1, citomegalovírus e *toxoplasma gondii* (YANG *et al.*, 2005).

As atividades antiinflamatórias e analgésicas que têm sido atribuídas às saponinas parecem se dar por mecanismos variados como inibição da degradação de corticóides, atividade corticomimética, o que interfere no metabolismo de mediadores inflamatórios (LACAILLE-DUBOIS & WAGNER, 1996), atuando no sistema complemento (KIM *et al.*, 1997), etc. Outras propriedades farmacológicas como antiulcerogênica e sedativa são atribuídas a esses compostos (CABALLERO-GEORGE *et al.*, 2004).

No que diz respeito à função renal, alguns estudos mostram que as saponinas isoladas de plantas podem afetar a função renal. Assim, foi verificado que o extrato bruto das raízes da *Bredemeyera floribunda* induz aumento significativo no ritmo de filtração glomerular, fluxo urinário e fração de excreção do Na⁺ e K⁺, em ratos. Esse efeito diurético está associado à presença de saponinas triterpênicas na *B.*

floribunda (BEVEVINO *et al.*, 1994). Similarmente, as saponinas presentes nas partes aéreas da *Herniaria glabra* parece também ser as responsáveis pelo efeito antihipertensivo e diurético observado em ratos espontaneamente hipertensos (RHIOUANI *et al.*, 1999). Similarmente, estudos utilizando ratos geneticamente hipertensos tipo DahlI sensíveis a sal (DSS), mostraram que o ácido oleanólico e seu isômero, o ácido ursólico, que são compostos triterpênicos encontrados nas plantas, apresentam efeitos hipoglicêmico, antioxidante e anti-hipertensivo. Este último foi atribuído a um potente efeito diurético e natriurético desses compostos (SOMOVA *et al.*, 2003). Esse efeito diurético e natriurético confirma os resultados obtidos em outros estudos com saponinas triterpênicas. (RHIOUANI *et al.*, 1999; BEVEVINO *et al.*, 1994).

Assim, no contexto atual de: i) retomada do estudo de substância bioativas oriundas de plantas utilizadas na medicina popular e ii) tendência da Ciência Moderna, chamada interdisciplinaridade, na qual podem-se unir ciências correlatas como química de produtos naturais, fisiologia e farmacologia, é que o presente trabalho foi desenvolvido. Nele, os efeitos renais de saponinas triterpênicas isoladas das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Cerveja de Índio) foram avaliados.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar, experimentalmente, o possível efeito diurético da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Investigar experimentalmente o possível efeito do extrato bruto das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke bem como das saponinas isoladas do mesmo sobre parâmetros renais como filtração glomerular, eliminação e reabsorção de H₂O e eletrólitos (Na⁺ e K⁺).

2.2.2 Estudar o(s) possível(is) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) a *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke afeta a diurese, explorando a participação de:

- a) transportadores: (Na⁺ + K⁺)ATPase e Na⁺ ATPase
- b) Vasopressina, peptídeo natriurético atrial e urodilatina.

3 MATERIAIS

3 MATERIAIS

3.1 Animais

Ratos Wistar, machos, saudáveis, com peso entre 250 - 350g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG), foram utilizados em todos os experimentos.

3.2 Preparação do extrato bruto das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e isolamento de suas Saponinas

A planta *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Cerveja de Índio) foi coletada no município de Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas, Brasil.

*3.2.1 Substâncias usadas no preparo do extrato bruto de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}) e no isolamento de suas saponinas (SAP_{AaD}):* etanol, n-butanol e água destilada, diclorometano, metanol, reagente de Komarowsky (H_2SO_4 : 4-OH-Benzaldeído), sílica gel 60.

3.2.2 Equipamentos: Evaporador a vácuo

3.3 Substâncias usadas nos protocolos Experimentais

3.3.1 Drogas e reagentes comuns: NaCl a 0,9%, heparina, tiopental sódico, furosemida.

3.3.2 Equipamentos: Balança para pesagem dos ratos, gaiolas metabólicas (Nalgene), provetas, seringas de vidro e agulhas (18g), tubos Falcon de 15 mL, microcentrífuga (Eppendorf , modelo 5415D).

3.3.3 Substâncias usadas nas dosagens de:

- a) Creatinina: Kit próprio (Bioclin) para dosagem de creatinina fornecido pelo Quibasa.

- b) Sódio e potássio: Padrões de Na^+ de 140 mEq/l de K^+ de 5 mEq/l e fotômetro de chama (CELM FC-180) obtidos da CELM.

- c) Osmolalidade: Padrões de 100, 290 e 1000mOsm/Kg e osmômetro ($\mu\text{OSMETTE}$, Precision systems).

- d) ANP e urodilatina: ANP e urodilatina (Península Laboratories Inc.), inibidores de proteases EDTA, pepstatina, e PMSF (Sigma Chemical Co.), colunas Sep-Pak C_{18} (Waters Associates). Acetato de amônio, fosfato de sódio, cloreto de sódio, ácido acético, azida sódica, polietilenoglicol e acetronitrila foram obtidos de diversos fornecedores e apresentavam grau de pureza adequada ao ensaio. Triton X-100 e albumina sérica bovina e (Sigma Chemical Co.), ^{125}I -sódico (New England Nuclear Co.), anticorpo anti-ANP, anticorpo soro de cabra antigama-globulina de coelho (Sigma Chemical Co.), centrífuga refrigerada (Himac CR 21E Hitachi, Rotor n^0 40), evaporador Speed-Vac (Eppendorf, modelo 5301), contador gama (LKB).

- e) Hormônio antidiurético: HAD (Península Laboratories Inc), inibidores de proteases pOHHg Bnz, PMSF, EDTA, O-Fenantrolina, Pepstatina e albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co.), metanol e ácido trifluoroacético (Merck)), tampão vasopressina, colunas Sep-Pak, centrífuga refrigerada (Himac CR 21E Hitachi, Rotor n^0 40), freezer – 20 °C, evaporador Speed-Vac ((Eppendorf, modelo 5301).

- f) Na^+ ATPase e da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$: sacarose, HEPES/TRIS, EDTA, PMSF, 5 ATP-Na, ouabaína e furosemida (Sigma Chemical Co.). Cloreto de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, ácido clorídrico e carvão

ativado foram obtidos de diversos fornecedores e apresentavam grau de pureza adequada ao ensaio. Homogenizador do tipo potter com pistilo de teflon, centrífuga refrigerada (Himac CR 21E Hitachi, Rotor nº 46), ultracentrífuga (Sorvall Ultra Pro 80, rotores t-880 e 90Ti).

- g) Histologia: formol neutro, parafina, hematoxilina e eosina foram obtidos de diversos fornecedores e apresentavam grau de pureza adequada ao ensaio.

- h) Atividade hemolítica: tubos de ensaio, heparina, cloreto de sódio, tubos para centrífuga tipo eppendorf (1,5 mL), microcentrífuga (eppendorf 5415D), homogenizador tipo potter com pistilo de teflon, centrífuga refrigerada (Himac CR 21E Hitachi, Rotor nº 40), banho-maria, bomba de infusão (Stoelting Co.620, USA).

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Preparação do extrato bruto das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e isolamento de suas saponinas

As raízes da planta foram secas em local arejado, à temperatura ambiente e, em seguida, foram trituradas. O processo extrativo foi feito por percolação, onde as raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke foram colocadas em contato direto com solução de etanol 80%, em um percolador, por cerca de dois dias. Essa operação foi repetida duas vezes. Ao final desse procedimento, obteve-se uma solução hidroalcoólica que foi evaporada obtendo o extrato bruto da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}).

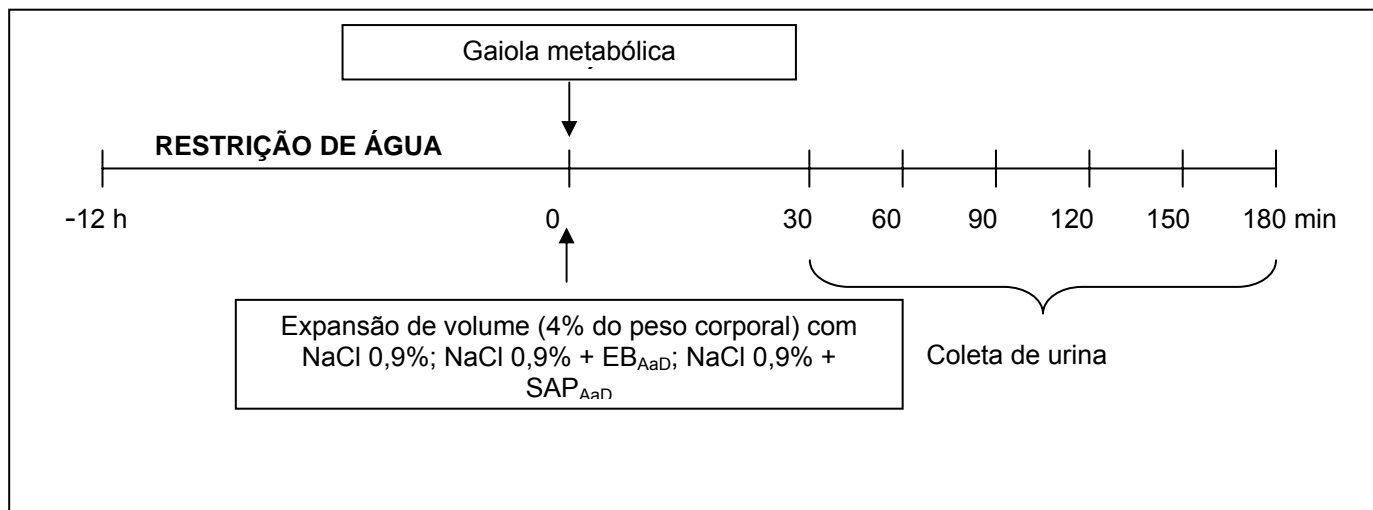
Para a obtenção das saponinas, o EB_{AaD} foi dissolvido em água e misturado a uma solução de n-butanol e água destilada (2:1). A fase n-butanólica foi retida e a fase aquosa foi descartada. Em seguida, o extrato n-butanólico foi evaporado a vácuo até a obtenção do extrato seco, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílicagel 60 eluída com solução de diclorometano, metanol e água (64:40:8). Dessa coluna foram coletadas 60 frações. As frações contendo as saponinas foram identificadas por cromatografia em camada delgada utilizando, como revelador, o reagente de Komarowsky (H₂SO₄ : 4-OH-Benzaldeído, 3:2). Nas frações contendo saponinas, o solvente foi evaporado e obteve-se o extrato seco das saponinas da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (SAP_{AaD}) (BRANDÃO *et al*, 1992). Esses procedimentos foram executados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, UFMG, pela Profa. Maria das Graças Lins Brandão.

4.2 Protocolos Experimentais

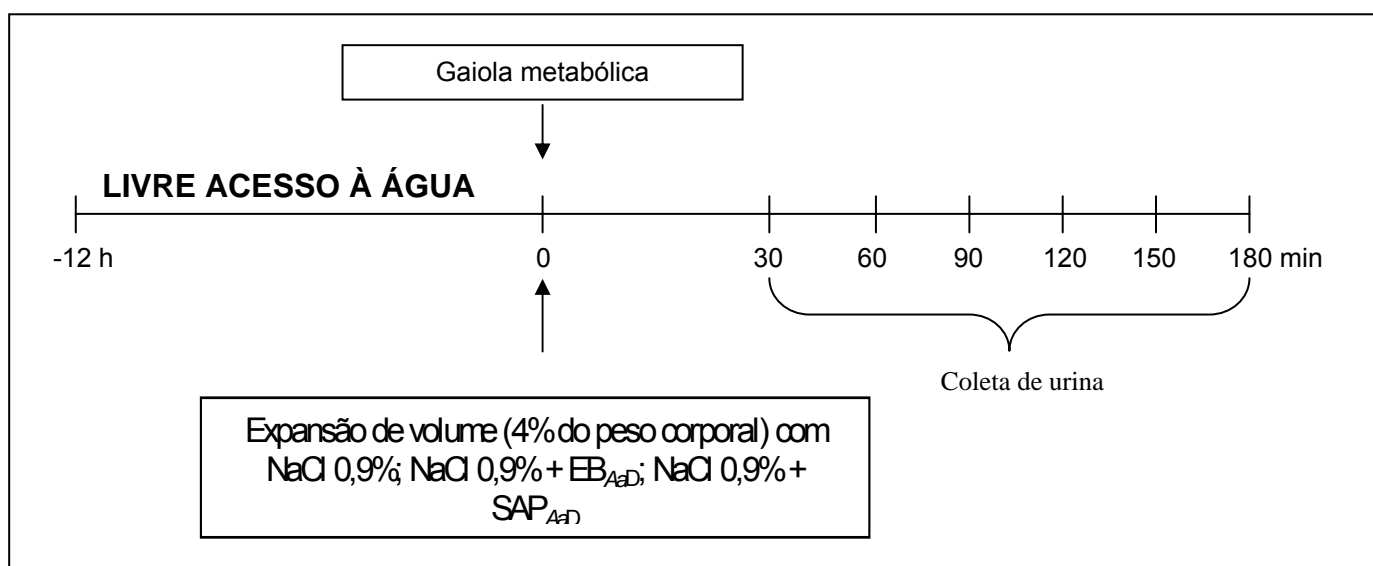
Os experimentos foram executados de acordo com os 6 protocolos descritos a seguir.

4.2.1 Protocolo I: Os ratos, mantidos SOB RESTRIÇÃO de água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos, foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo

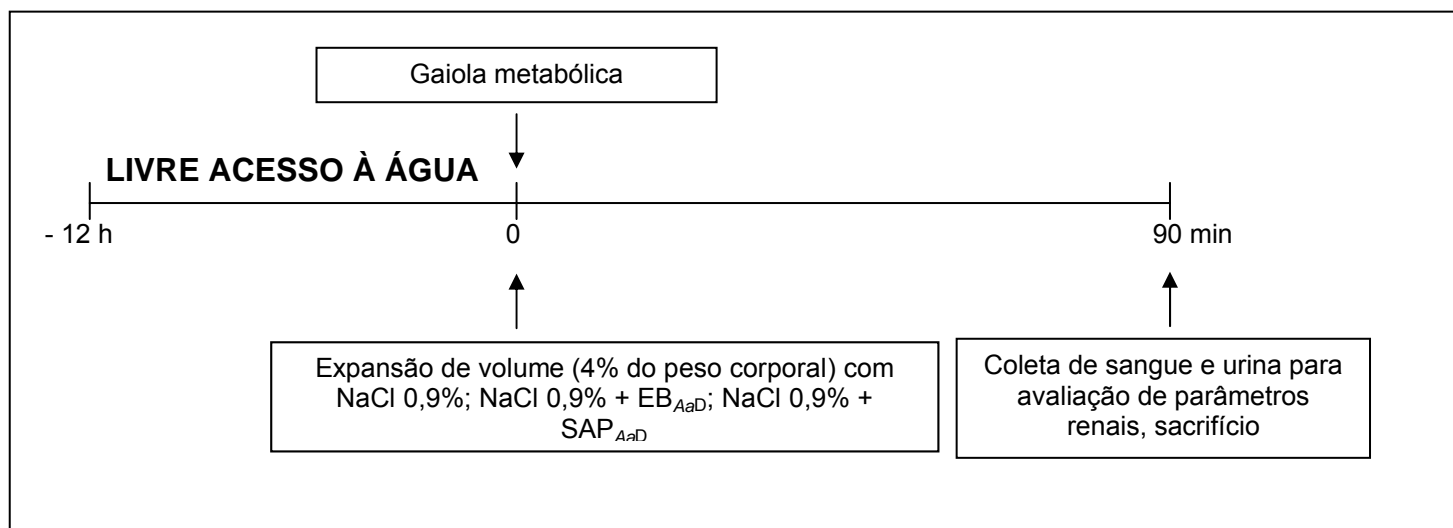
quantidades crescentes de EB_{AaD} de tal forma que cada rato recebeu de 100 a 400 mg/Kg deste ou de SAP_{AaD} (dose/rato = 50 a 200 mg/Kg). Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.



4.2.2 Protocolo II: Os ratos, COM LIVRE acesso à água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos, foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo quantidades crescentes de EB_{AaD} de tal forma que cada rato recebeu de 50 a 200 mg/Kg deste ou de SAP_{AaD} (dose/rato = 50 e 1000 mg/Kg). Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.

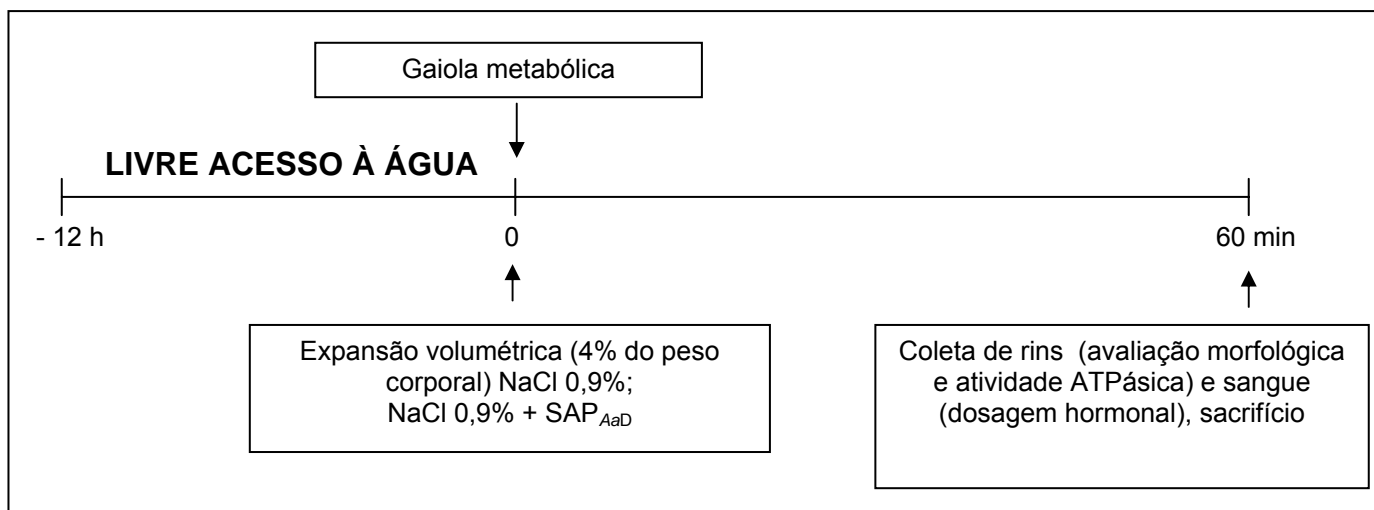


4.2.3 Protocolo III: Os ratos, COM LIVRE acesso à água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos, foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo EB_{AaD} (100 mg/kg) ou SAP_{AaD} (50 mg/kg). Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, até 90 min, onde o efeito máximo da substância testada foi atingido. A urina dos últimos 30 min foi coletada para análises posteriores (dosagens de creatinina, sódio e potássio, osmolalidade e urodilatina). Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com tiopental (40 mg/Kg). O abdome foi aberto e cerca de 4 ml de sangue foram coletados, da veia cava inferior, em tubos heparinizados, também, para as mesmas análises posteriores já mencionadas para a urina. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm, por 5 min, para obtenção do plasma.

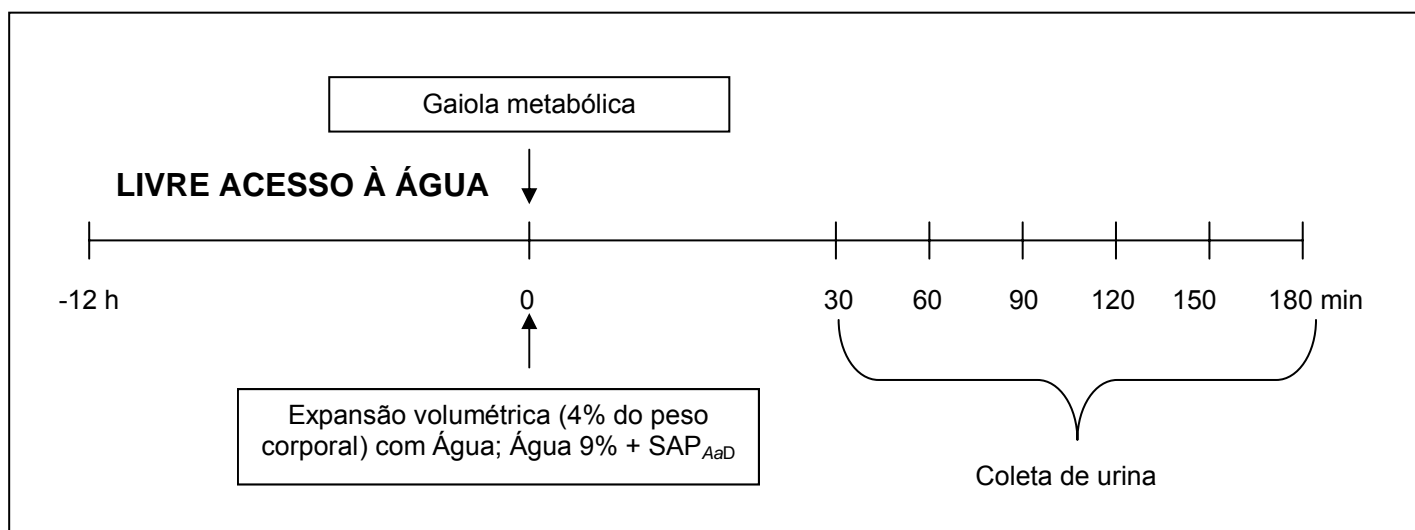


4.2.4 Protocolo IV: Os ratos, COM LIVRE acesso à água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos, foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo SAP_{AaD} na dose de 50 mg/Kg. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min até 60min, tempo no qual o efeito máximo da substância testada é antecedido em 30 min. A urina dos últimos 30 min foi coletada para dosagem de urodilatina. Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com tiopental (40 mg/Kg). O abdome foi aberto e cerca de 4 ml de sangue foram coletados, da veia

cava inferior, em tubos heparinizados contendo inibidores de proteases, para a dosagem de ANP e HAD. Os átrios também foram coletados para a dosagem de ANP. Os rins foram coletados para a avaliação morfológica e para determinação da atividade ATPásica.



4.2.5 Protocolo V: Os ratos, COM LIVRE acesso à água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos, foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de água ou água contendo SAP_{AaD} (50 mg/kg) de tal forma que cada rato recebeu uma dose efetiva da mesma. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina é medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.



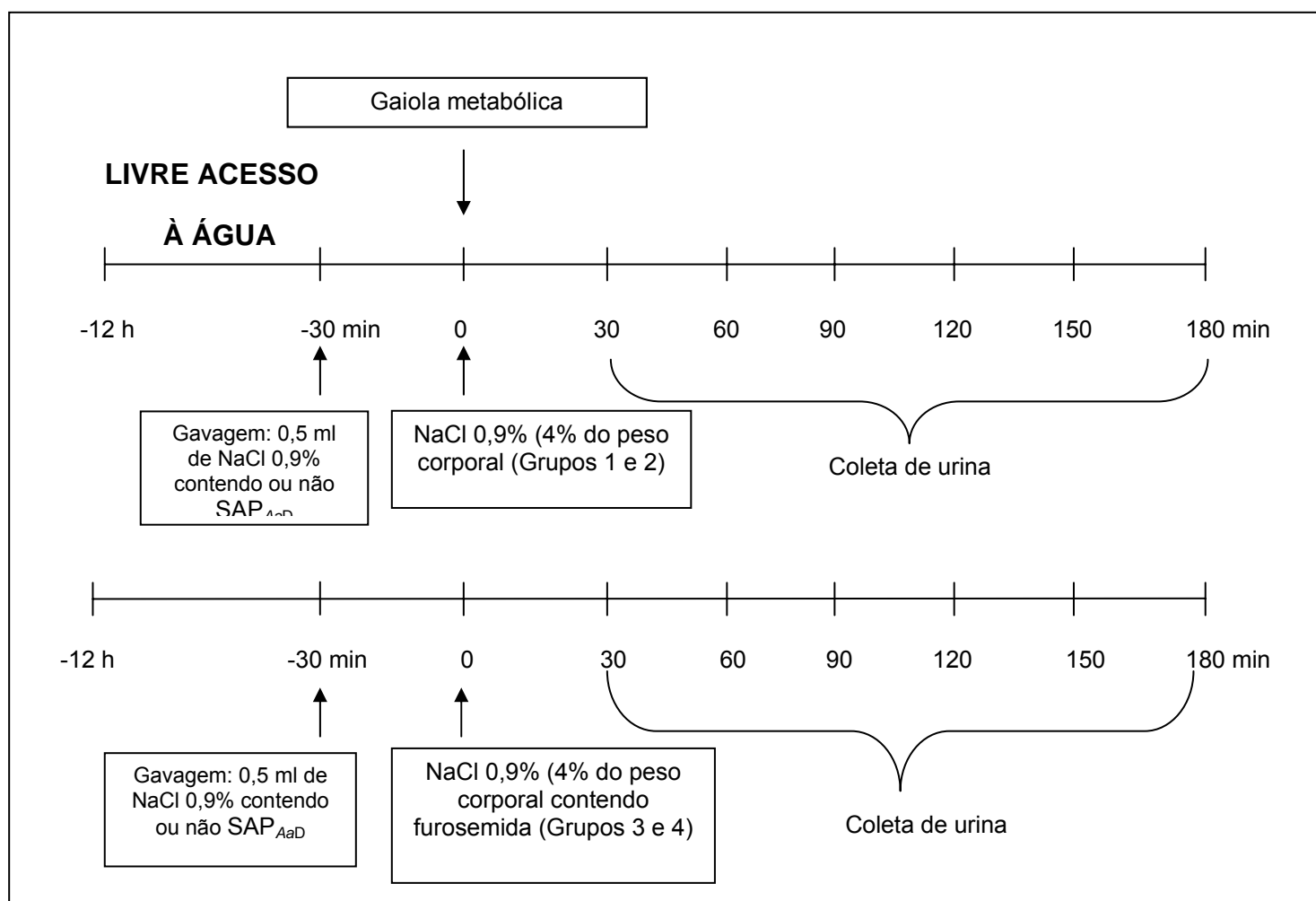
4.2.6 Protocolo VI: Os ratos COM LIVRE acesso à água por 12 h imediatamente anteriores ao início dos experimentos. Este protocolo experimental foi executado em 4 grupos, como descrito a seguir.

a) Grupo 1: Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 0,5 ml de NaCl 0,9% apenas. Após 30 min, também por gavagem, foram administrados 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9%. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.

b) Grupo 2: Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 0,5 ml de NaCl 0,9% contendo SAP_{AaD} de tal forma que cada rato recebeu uma dose efetiva de 50 mg/kg. Após 30 min, também por gavagem, foram administrados 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9%. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.

c) Grupo 3 : Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 0,5 ml de NaCl 0,9% apenas. Após 30 min, também por gavagem, foram administrados 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo furosemida de tal forma que cada rato recebeu 13 mg/Kg da mesma. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.

d) Grupo 4: Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 0,5 ml de NaCl 0,9% contendo SAP_{AaD} de tal forma que cada rato recebeu uma dose efetiva de 50 mg/kg. Após 30 min, também por gavagem, foram administrados 4 ml por cada 100 g de peso corporal, de NaCl 0,9% contendo furosemida de tal forma que cada rato recebeu 13 mg/kg da mesma. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h.



4.3 Dosagens bioquímicas

4.3.1 “Clearance” de Creatinina: A creatinina no plasma e na urina foi medida, colorimetricamente, de acordo com o método de Jaffé modificado utilizando kit apropriado. Esse ‘kit’ é composto por i) solução padrão de creatinina (3 mg/dl) (reagente n^o 1), ii) solução de ácido pícrico (60 mmol/l) (reagente n^o 2), iii) solução de NaOH (110mmol/l), Na₂CO₃ (75 mmol/l) e surfactante (reagente n^o 3) e iv) solução de CH₃COOH (12,25 mol/l) (reagente n^o 4). Os meios de reação foram preparados de acordo com o quadro a seguir.

	Plasma	Urina	Água destilada	Reagente 1	Reagente 2	Reagente 3
Branco	--	--	0,125 ml	--	0,250 ml	1 ml
Padrão	--	--	--	0,125 ml	0,250 ml	1 ml
Amostra	0,125 ml	--	--	--	0,250 ml	1 ml
	--	0,125 ml	--	--	0,250 ml	1 ml

As reações foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria 37 °C, por 10 min. As absorbâncias da amostra e do padrão foram lidas a 510 nm, acertando o zero com o branco. Essa absorbância foi utilizada para a determinação da concentração de creatinina nas amostras de urina. Para as amostras de plasma, esse primeiro valor de absorbância foi denominado de **A1**. Após a leitura de A1, às amostras de plasma e ao branco, foram adicionados 50 µl do reagente nº 4. Após homogeneização, uma segunda leitura de absorbância das amostras de plasma (**A2**) foi feita também a 510 nm, acertando o zero com o branco.

As amostras de urina foram previamente diluídas 1: 25 e não passam pela etapa de acidificação, como o plasma.

A concentração de creatinina, em mg/dl, foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{Creatinina(mg/dl)} = \frac{A1 - A2}{\text{Absorbância Padrão}} \times 3$$

Como a reação segue a lei de Lambert-Beer, o fator de Calibração pode ser usado.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Creatinina(mg/dl)} = (A1 - A2) \times \text{Fator de Calibração}$$

O “clearance” de creatinina foi usado para medir o ritmo de filtração glomerular (RFG), que foi calculado segundo a equação:

$$C = \frac{[\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo Urinário}}{[\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}}$$

Já a fração de excreção de água (FE_{H_2O}) foi calculada pela seguinte equação:

$$FE_{H_2O}(\%) = \frac{\text{Fluxo Urinário}}{\text{Ritmo de Filtração Glomerular}} \times 100$$

4.3.2 Sódio e potássio no plasma e urina: As concentrações de sódio e potássio nas amostras de urina e plasma foram determinadas por fotometria de chama. As amostras foram diluídas 200 vezes em água destilada. Para isso, alíquotas (15 μ l) da amostra foram diluídas em 3 ml de água destilada sendo, a dosagem em cada amostra, feita em duplicata contra o seu padrão correspondente (140 mEq/l de Na^+ e 5 mEq/l de K^+). Conhecendo-se as concentrações plasmática e urinária de Na^+ e K^+ , as frações de excreção de Na^+ (FE_{Na^+}) e de K^+ (FE_{K^+}), bem como as respectivas frações de reabsorção, FR_{Na^+} e FR_{K^+} , foram quantitativamente determinadas conforme as equações:

$$FE_{Na^+} \text{ ou } FE_{K^+} (\%) = \frac{\text{Quantidade Excretada de } Na^+ \text{ ou } K^+}{\text{Quantidade Filtrada de } Na^+ \text{ ou } K^+} \times 100$$

$$FR_{Na^+} \text{ ou } FR_{K^+} (\%) = 100 - FE_{Na^+} \text{ ou } FE_{K^+}$$

4.3.3 Osmolalidades Plasmática e Urinária: A determinação das osmolalidades plasmática e urinária foi feita diretamente por osmometria de congelamento, usando padrões com osmolalidade apropriadas.

Para a calibração do osmômetro, foram utilizadas soluções padrão com osmolalidade de 100, 290 e 1000mOsm/Kg. Todas as amostras foram diluídas em água destilada. As amostras de urina foram diluídas 10 vezes (5 µl de urina + 45 µl de água destilada), enquanto que as amostras de plasma foram diluídas 2 vezes (25 µl de plasma + 25 µl de água destilada) sendo, a osmolalidade de cada amostra, determinada em duplicata. Conhecendo-se as osmolalidades plasmática e urinária, o “Clearance” osmolar (Cosmolar) e o “Clearance” de água livre (C_{H_2O}) puderam ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$\text{Cosmolar} = \frac{\text{Osmolalidade}_{\text{urina}} \times \text{Fluxo Urinário}}{\text{Osmolalidade}_{\text{plasmática}}}$$

$$C_{H_2O} = \text{Fluxo Urinário} - \text{Cosmolar}$$

4.3.4 Dosagem de ANP e urodilatina: As dosagens de ANP e Urodilatina foram feitas por radioimunoensaio (RIE) de duplo-anticorpo.

a) *Extração dos peptídeos*: O sangue foi coletado, de acordo com o Protocolo IV, em tubo contendo um coquetel de inibidores de proteases que consistiu de EDTA $10^{-5}M$, Pepstatina $0,5 \times 10^{-5} M$ e PMSF $10^{-5} M$, na proporção de 30µl para cada 1 ml de sangue. Imediatamente após a coleta, esse sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada ($4^{\circ} C$), a 5000 rpm, por 20 min. O plasma foi submetido à extração dos peptídeos, usando-se colunas Sep-Pak C_{18} . Estas colunas foram previamente ativadas com 8 ml de acetonitrila e lavadas com 8 ml de acetato de amônio a 0,2%, pH 4. A seguir, o plasma foi aplicado à coluna. Após lavagem com 5 ml de acetato de amônio, o ANP adsorvido foi eluído com 3 ml de acetonitrila 60% em acetato de amônio 40%. Após evaporação à vácuo, as amostras foram reconstituídas em 500 µl de tampão (fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,14M, albumina sérica bovina 0,1%, azida sódica 0,01% e triton X-100 0,1%, pH 7.4) e dosadas por RIE. Os átrios foram homogeneizados em 2 ml de ácido acético 0,1M, contendo

inibidores de proteases (EDTA 10^{-5} M, Pepstatina $0,5 \times 10^{-5}$ M e PMSF 10^{-5} M). Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante (20 μ l) foram diluídas em no mesmo tampão fosfato (acima) para determinação do ANP por RIE. As urinas utilizadas para a dosagem de urodilatina foram coletadas em tubos contendo inibidores de proteases (EDTA 10^{-5} M, Pepstatina $0,5 \times 10^{-5}$ M e PMSF 10^{-5} M). Após centrifugação, alíquotas do sobrenadante (100 μ l) foram utilizadas para determinação da urodilatina por RIE.

b) *Iodação do ANP*: a iodação do ANP de rato (Ser⁹⁹- Tyr¹²⁶) foi feita pelo método da Lactoperoxidase com ¹²⁵I-sódico conforme descrito por Gutkowska et al. (1987). A purificação da fração monoiodinada foi feita por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

c) *Radioimunoensaio do ANP e da urodilatina*: o ANP imunorreativo foi determinado por radioimunoensaio de acordo com técnica descrita por Gutkowska et al. (1987). Uma alíquota de 100 μ l, em duplicata, contendo o ANP extraído do plasma e reconstituído em 0,5 ml de tampão fosfato foi incubada “overnight” com 100 μ l de anticorpo anti-ANP, a 4 °C. Alíquotas diluídas do tecido cardíaco também foram incubadas com o anticorpo. Duas diluições, em série, foram realizadas: 20 μ l do sobrenadante do homogenato do átrio foram diluídos em 1 ml de solução tampão e 25 μ l desta diluição foram novamente diluídos em 1 ml de solução tampão (diluição final de 1/2000). O RIE foi realizado com 50 μ l desta segunda diluição. A esta amostra, foram adicionados 100 μ l (cerca de 8000 cpm) de ¹²⁵I-ANP. Esta reação foi incubada por mais de 24 h. A separação do imunocomplexo foi feita por precipitação com o segundo anticorpo. Após 2 h à temperatura ambiente, 0,5 ml de polietilenoglicol a 6,25%, em água, foi adicionado. Os tubos foram centrifugados a 1200g, a 4 °C, por 20 min, e a radioatividade do imunocomplexo foi determinada em contador gama.

Uma vez que a única diferença entre as estruturas das moléculas de ANP e urodilatina é apenas quatro aminoácidos adicionais na porção amino-terminal da molécula de urodilatina (Schulz-Knappe *et al.*, 1988) e que no rim,

o nível de ANP circulante é drasticamente reduzido pela ação de peptidases presentes nas membranas celulares do córtex renal (Gegelmann *et al.*, 1988) ou por ligação de moléculas de ANP ao receptor para peptídeo natriurético tipo C, receptores responsáveis pela depuração metabólica dos peptídeos natriuréticos, levando a quantidades muito insignificantes de ANP presente na urina (Abassi *et al.*, 1992; Cohen, 1996), pode – se então associar que a mensuração da concentração urinária de ANP, com a utilização de anticorpo anti-ANP, seja na realidade uma determinação dos níveis urinários de urodilatina. Sendo assim, a dosagem da urodilatina foi feita de forma indireta utilizando mesmo protocolo usado na dosagem do ANP e utilizando 100 µl de urina, em duplicata

A dosagem de ANP e Urodilatina foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do ICB, UFMG, sob a supervisão da Profa. Adelina Martha dos Reis.

4.3.5 Dosagem de HAD: a dosagem do HAD também foi feita por RIE. O sangue coletado de acordo com o Protocolo IV, em tubo contendo um coquetel de inibidores de proteases que consistiu de pOHHg Bnz 1mM, PMSF 1mM, EDTA 7,5%, O-Fenantrolina 30mM e Pepstatina 1mM na proporção de 140µl para 1ml de sangue. Imediatamente após a coleta, esse sangue foi centrifugado a 5.000 rpm, por 20 min, em centrífuga refrigerada a 4 °C. O plasma foi transferido para tubos lavados com BSA 0,1% e mantidos em freezer a –20 °C. O plasma foi, então, aplicado em colunas pré-ativadas por lavagem seqüencial com 10 ml de metanol 99,9% e 10 ml de ácido trifluoroacético 0,1%. Em seguida, a coluna foi lavada, seqüencialmente, com 10 ml de metanol 99,9% e 10 ml de TFA 0,1%, 3 ml de TFA 0,1% contendo 0,1% de BSA, 10 ml de metanol 10% - TFA 0,1% e 3 ml de TFA 0,1%.

Os peptídeos adsorvidos na coluna foram eluídos com 3 ml de metanol 99,9% - TFA 0,1%. As amostras extraídas foram secas em centrífuga evaporadora durante aproximadamente 10 h. As amostras de plasma foram ressuspensas em 300 µl de tampão para vasopressina não diluído. Uma alíquota (100 µl) desta solução foi utilizada no RIE. Todas as dosagens foram feitas em duplicatas.

4.3.6 Atividade enzimática da Na^+ -ATPase e da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase renais: os ratos submetidos ao tratamento com SAPAaD conforme o protocolo IV foram sacrificados e os dois rins foram, imediatamente, removidos, descapsulados e mantidos em uma solução gelada contendo composta por sacarose (250 mM), HEPES/TRIS, pH 7,6 (10 mM), EDTA (2 mM) e PMSF (1 mM) (solução 1). Em seguida, os rins foram dissecados e fatias, de de cerca de 1 μm , da face externa do rim foram separadas e homogeneizadas em solução 1, utilizando um homogenizador do tipo potter com pistilo de teflon. O homogenato resultante foi centrifugado em centrífuga refrigerada, a 10000 rpm, à 4 °C, durante 10 min. O precipitado foi descartado e uma segunda centrifugação, em iguais condições da anterior, foi realizada. Ao término da centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 60000 rpm, 4 °C por 1 h. O precipitado, contendo a fração microssomal, foi ressuspenso em uma solução de sacarose 250 mM dando uma concentração final de, aproximadamente, 3 mg de proteína por ml de solução e armazenado à -4 °C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) usando BSA como padrão.

a) *Medida da atividade ATPase:* a atividade ATPásica foi determinada segundo o método descrito por Grubmeyer & Penefsky (1981). A composição do meio de reação padrão foi (em mM): MgCl_2 , 10, HEPES-TRIS, 20 (pH 7,0), ATP-Na, 5, NaCl, 120. Para determinação da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase, foram adicionados de KCl 30 mM. A reação foi iniciada pela adição de proteína (0,1- 0,3 mg/ml) e parada, após 30 min, pela adição de carvão ativado em HCl 0,1N. As atividades Na^+ -ATPásica e $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPásica, expressas em nmoles Pi x mg^{-1} x min^{-1} , foram calculadas pela diferença na ausência e presença de ouabaína 1 mM e de furosemida 2 mM, respectivamente (Caruso-Neves *et al.*, 2002; Provérbio *et al.*, 1989) sendo, a segunda, na presença de 1 mM de ouabaína. O [^{32}P] Pi produzido foi medido por cintilação líquida em uma alíquota do sobrenadante obtido após a centrifugação a 2000 rpm, por 5min.

Os ensaios para determinação da atividade ATPásica foram realizados no Laboratório de Bioquímica Renal do Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, com a colaboração do Prof. Celso Caruso.

4.3.7 Avaliação morfológica: os ratos submetidos ao tratamento com SAP_{AaD} conforme o protocolo IV foram anestesiados, a cavidade abdominal foi aberta para a retirada dos rins e, em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical. Os rins foram fixados em formol neutro e tamponado a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET, 1992). Secções histológicas de 4 µm foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (LUNA, 1968) para avaliação morfológica.

O procedimento acima foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do ICB, UFMG, com a colaboração do Prof. Geovanni Dantas Cassali.

4.4 Atividade hemolítica das Saponinas isoladas das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke.

O ensaio da atividade hemolítica das SAP_{AaD} foi feito através de adaptação do método descrito por Wall *et al* (1952), utilizando sangue de rato. Um rato foi anestesiado com Tiopental 40 mg/Kg (ip) e cerca de 3 ml de sangue foram coletados, em tupos heparinizados, da veia cava inferior. Uma solução de SAP_{AaD}, para uma concentração final de 50 mg/ml, foi preparada em NaCl 0,9%. A partir dessa solução, foram preparadas diluições sucessivas na proporção de 1:2, sempre usando o NaCl 0,9% como diluente, até a proporção de 1: 64. Dessa forma, ao final da diluição, foram obtidas soluções de SAP_{AaD} com concentrações finais iguais a 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78 mg/ml. Para o ensaio da atividade hemolítica, 0,3 ml de cada uma dessas soluções de SAP_{AaD} foi adicionado a 0,3 ml de sangue previamente colocado em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml de capacidade). Essa mistura foi centrifugada a 3000 rpm, por 5 min, à temperatura ambiente. Como controle negativo (ausência de hemólise) 0,3 ml de sangue foi adicionado a 0,3 ml de NaCl 0,9% e como controle positivo (hemólise total), o mesmo volume de sangue (0,3 ml) foi adicionado a 0,3 ml de água destilada. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, pela tonalidade da cor vermelha no sobrenadante obtido após a centrifugação. Essa tonalidade foi comparada aos controles e variava de zero (controle negativo) a 6 cruces (+++++, controle positivo).

A atividade hemolítica também foi ensaiada utilizando-se SAP_{AaD} previamente incubada com homogenato de fígado e de intestino delgado. Isto foi feito na tentativa de se detectar alguma possível modificação na estrutura das SAP_{AaD} , por enzimas presentes no fígado e no intestino delgado, que afetasse a sua ação hemolítica. Para isso, o fígado e parte do intestino delgado de rato foram coletados em solução gelada de NaCl 0,9%, imediatamente homogeneizados em um homogenizador do tipo potter com pistilo de teflon e centrifugados a 10000 rpm, por 10 min, à 4 °C. O precipitado foi descartado e uma alíquota do sobrenadante (0,5 ml) foi incubada com 0,5 ml de cada uma das diluições da solução de SAP_{AaD} 50 mg/ml, conforme descrito acima. A incubação, feita em banho-maria à 37°C, teve duração de 30, 60 ou 90 min. Ao final da incubação, 0,3 ml do incubado foi adicionado a 0,3 ml de sangue sendo, essa mistura centrifugada a 3000 rpm, por 5 min, à temperatura ambiente. O grau de hemólise foi avaliado da mesma forma como já descrito acima.

Para avaliar o grau de hemólise produzida pela SAP_{AaD} intacta quando diretamente injetada na circulação, uma solução de SAP_{AaD} 50 mg/ml foi, continuamente, infundida na veia femoral esquerda, a um fluxo de 50 μ l/min durante 60 min. Amostras de sangue foram coletadas da artéria femoral direita a intervalos de 15 min. Essas amostras foram centrifugadas e o grau de hemólise foi avaliado conforme descrito anteriormente.

4.5 Análise Estatística

O delineamento utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Os animais, de mesmo sexo, espécie e peso aproximadamente igual, foram distribuídos de maneira aleatória. As condições ambientais foram uniformes e os mesmos procedimentos foram aplicados a todos os animais que eram submetidos a um determinado protocolo experimental. Existindo assim apenas as variações individuais e devido ao tratamento.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Como critério de significância, foi considerado $p < 0,05$.

A variação individual ou variação do erro na comparação das médias entre os grupos estudados foi determinada através da análise de variância ANOVA one way, seguida do teste de Bonferroni na comparação entre três ou mais grupos.

A comparação de média realizada entre dois grupos apenas foi feita através do teste t de "student".

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE

Como as saponinas, de um modo geral, possuem reconhecida atividade hemolítica, a sua capacidade de produzir hemólise, *in vitro* e *in vivo*, foi aqui avaliada. A SAP_{AaD} incubada diretamente com sangue de rato, provocou hemólise de maneira concentração-dependente. Nas concentrações de 50 e 25 mg/ml, a SAP_{AaD} apresentou grau de hemólise similar ao apresentado pelo controle positivo (água destilada) (Tab. 1). Nas demais concentrações utilizadas, a SAP_{AaD} produziu uma hemólise classificada de média a moderada, à medida que as concentrações de SAP_{AaD} foram sendo diminuídas apresentando hemólise, visualmente detectável, até a concentração de 1,5 mg/ml (Tab. 1).

TABELA 1

Atividade hemolítica de concentrações decrescentes de SAP_{AaD}.

Agente Hemolítico	Hemólise
Água destilada	++++++
NaCl 0,9 %	-
SAP _{AaD} – 50 mg/ml	++++++
SAP _{AaD} – 25 mg/ml	++++++
SAP _{AaD} – 12,5 mg/ml	++++
SAP _{AaD} – 6,25 mg/ml	+++
SAP _{AaD} – 3,13 mg/ml	++
SAP _{AaD} – 1,5 mg/ml	+
SAP _{AaD} – 0,75 mg/ml	-
SAP _{AaD} – 0,38 mg/ml	-

++++++, hemólise total; -, ausência de hemólise.

A fim de investigar se a atividade hemolítica das SAP_{AaD} poderia ser modificada por enzimas presentes no intestino delgado e no fígado, homogenatos destes órgãos foram incubados com as mesmas. A pré-incubação de diferentes concentrações de SAP_{AaD} com homogenatos de intestino delgado (Tab. 2) ou de fígado (Tab. 3), por 30, 60 e 90 min, não foi capaz de alterar a atividade hemolítica da SAP_{AaD}, independentemente da concentração de SAP_{AaD} usada ou do tempo de duração da pré-incubação.

TABELA 2

Atividade hemolítica das SAP_{AaD} pré-incubadas, por diferentes períodos, com homogenato de intestino delgado.

Duração da pré-incubação com homogenato de intestino delgado	[SAP _{AaD}] na pré-incubação (mg/ml)	Grau de hemólise
30 min	50	++++++
60 min	50	++++++
30 min	25	++++++
60 min	25	++++++
30 min	12,5	++++
60 min	12,5	++++

++++++, hemólise total; -, ausência de hemólise.

TABELA 3

Atividade hemolítica das SAP_{AaD} pré-incubadas, por diferentes períodos, com homogenato de fígado.

Duração da pré-incubação homogenato de Fígado	[SAP_{AaD}] na pré-incubação (mg/ml)	Grau de hemólise
30 min	50	++++++
60 min	50	++++++
30 min	25	++++++
60 min	25	++++++
60 min	6,25	+++
90 min	6,25	+++
30 min	3,13	++
60 min	3,13	++
90 min	3,13	++

++++++, hemólise total; -, ausência de hemólise.

A infusão intravenosa de SAP_{AaD} (50 mg/ml) a um fluxo de 50 μ l/min, por 1h, leve e já detectável aos 30 min após o início da infusão (Tab. 6). Esta hemólise permanecia até o final do procedimento (1 h) e foi similar à hemólise observada na incubação direta de sangue com SAP_{AaD} na concentração de 1,5 mg/ml (Tab. 3).

TABELA 4

Atividade hemolítica das SAP_{AaD} infundida intravenosamente, por 1 h, a um fluxo de 50 μ l/min.

Tempo de infusão com SAP_{AaD} (50 mg/ml)	Grau de hemólise
0 min	-
30 min	+
45 min	+
60 min	+

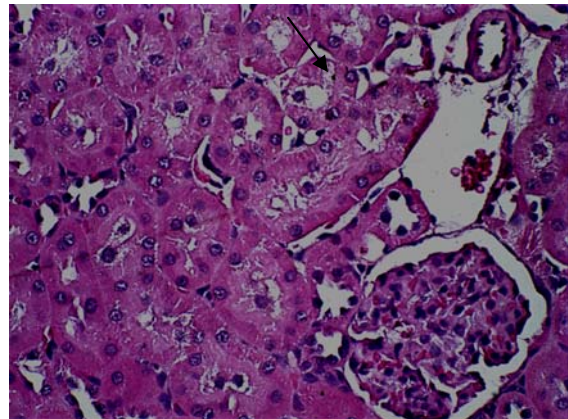
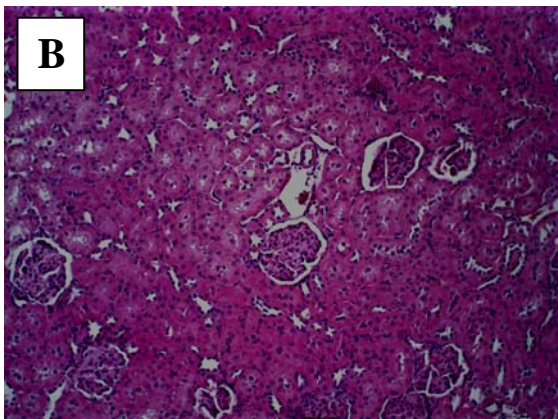
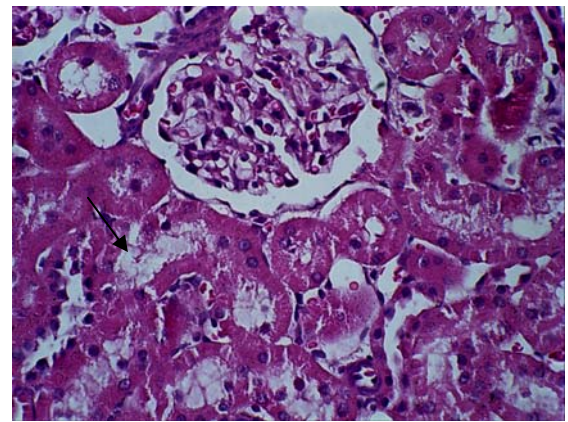
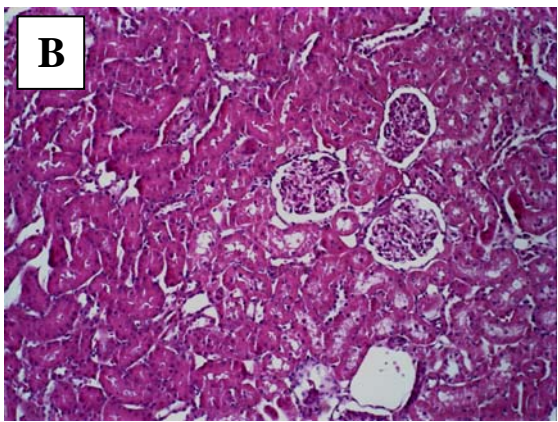
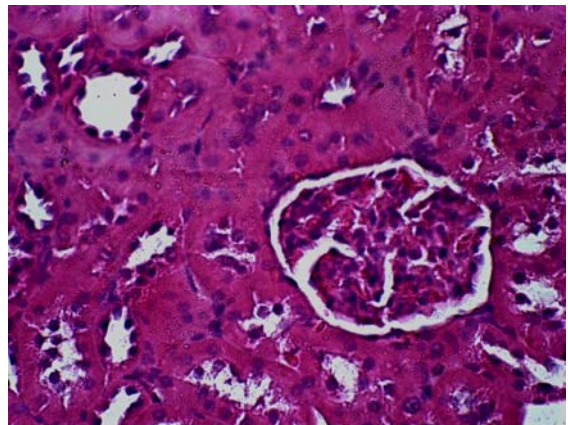
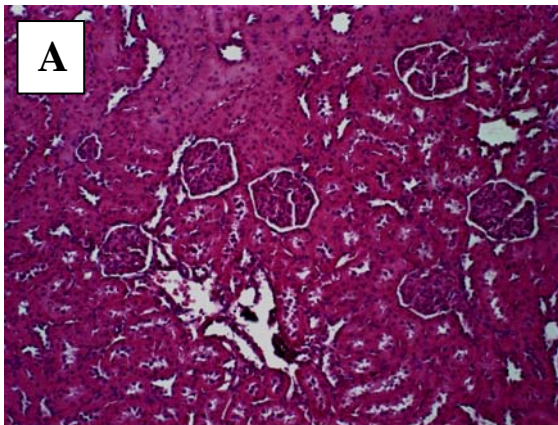
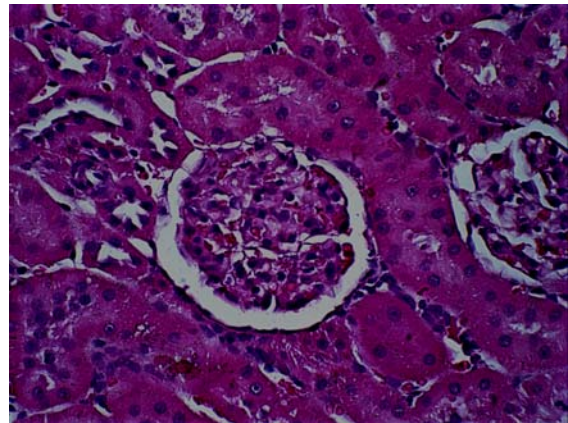
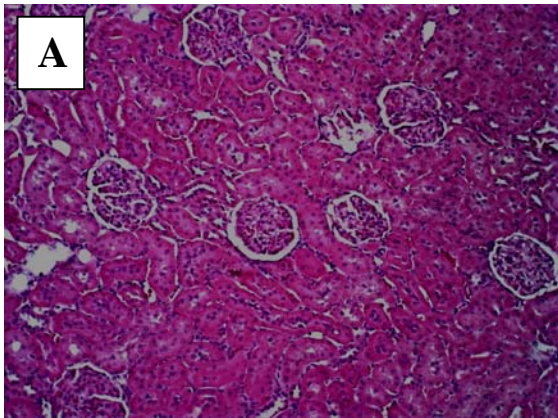
++++++, hemólise total; -, ausência de hemólise.

5.2 EFEITO DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A MORFOLOGIA RENAL.

As lâminas histológicas dos rins de animais do grupo controle, que receberam expansão volumétrica (4% do peso corporal) de NaCl 0,9 % conforme o protocolo IV, apresentaram células tubulares corticais bastantes acidófilas (corada de rosa com eosina), com núcleos íntegros arredondados e com pouca presença de vacúolos (índice de processo degenerativo), sem anormalidades nos glomérulos e na região medular, indicando assim uma integridade morfológica (Fig. 5A). As lâminas dos rins de animais submetidos à expansão volumétrica (4%) de NaCl 0,9 % contendo SAP_{AaD} (50 mg/kg) (Fig. 5B) apresentaram um perfil morfológico similar ao observado no grupo controle, porém, observou-se um aumento no número e na frequência de vacúolos presentes nas células dos túbulos da região cortical (comparar Figs. 5A e 5B). Nos animais tratados com uma dose elevada de SAP_{AaD} (1000 mg/kg), usando o mesmo protocolo utilizado nos grupos anteriores (protocolo IV), foi observado um aumento ainda maior no número e na frequência de vacúolos nas células tubulares do córtex renal, quando comparado aos grupos controle e SAP_{AaD} (50 mg/kg) passando, de um evento pontual, como no caso desses grupos, a um evento mais difuso. Além disso, a presença de células com núcleos em estado de picnose e membranas danificadas foi verificada no grupo tratado com 1000 mg/kg de SAP_{AaD}. Em nível glomerular, 1000 mg/kg de SAP_{AaD} aumentou a rede capilar com redução do espaço de Bowman sendo que nenhuma alteração, em nível medular, foi verificada (Fig. 5C).

20 X

60X



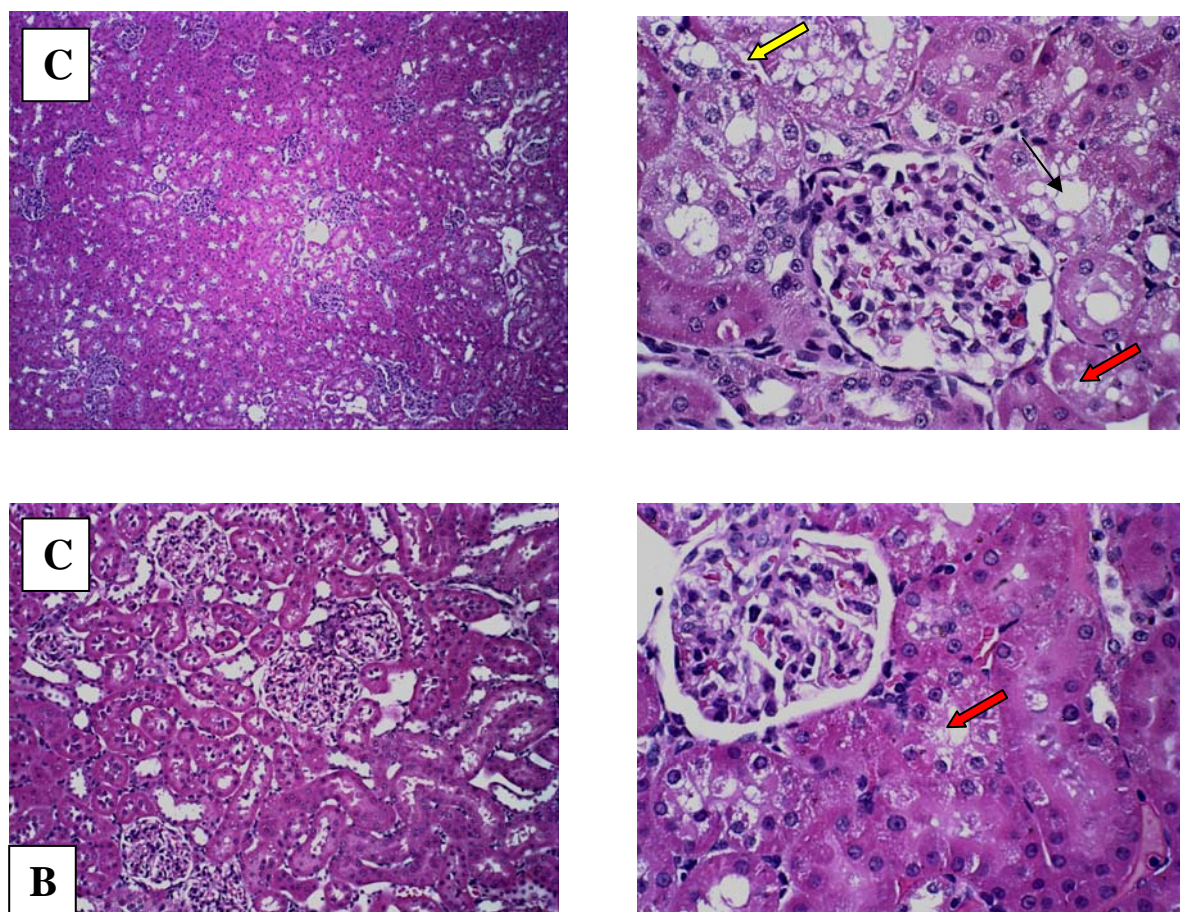


FIGURA 5. Efeito das SAP_{AaD} sobre o aspecto morfológico de rins de ratos. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg, n = 4) **(B)** ou SAP_{AaD} (1000 mg/Kg, n = 4) **(C)** dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta dos rins foi feita conforme o protocolo IV (Métodos). As setas pretas indicam vacúolos na célula tubular cortical, as setas amarelas indicam núcleos picnóticos e as setas vermelhas indicam células tubulares corticais com membrana desintegrada. Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 4 **(A)**.

5.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O primeiro protocolo experimental, por nós utilizado, consistiu em testar o extrato bruto de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}) em ratos colocados individualmente em gaiolas metabólicas. Após um período de adaptação (5 dias), os ratos eram tratados com diferentes doses do EB_{AaD} administrado, por gavagem, de 24 em 24 h, por 5 dias. O volume de urina e água ingerida era medido a cada período de 24 h. Este protocolo mostrou-se inadequado, pois os animais encontrava-se sob condições normais de expansão de volume e o período de 24 h para a medida do volume urinário era muito longo e, por isso, caso o EB_{AaD} fosse eficaz em um período de tempo mais curto, as possíveis alterações na diurese poderiam ser mascaradas pelo longo período de coleta. Além do mais, o tratamento prolongado (5 dias), com o EB_{AaD}, pode levar a uma adaptação dos animais ao mesmo. Assim, um procedimento experimental foi desenvolvido e padronizado com o intuito de se avaliar o efeito agudo (horas) do EB_{AaD} e/ou de substâncias dele isoladas, sobre a função renal. Porém, antes de se iniciar os estudos sobre esse possível efeito agudo, um experimento foi conduzido para se avaliar a magnitude da diurese, em curtos períodos de tempo, produzida por expansões crescentes de volume (1 a 6% do peso corporal) com NaCl 0,9%. Conforme ilustrado pela **Figura 6**, a administração, por gavagem, de NaCl 0,9% em volumes correspondentes a percentuais crescentes de expansão volumétrica, aumenta o volume de urina de maneira dependente da magnitude da expansão. Com 4 e 6% de NaCl 0,9% por cada 100g de peso corporal, a diurese iniciou-se mais cedo (60 – 90 min) e os volumes cumulativos de urina foram similares. A expansão de volume com 4% de NaCl 0,9%, por cada 100g de peso corporal, foi utilizada na maioria das séries experimentais subseqüentes. Em alguns experimentos, a expansão de volume foi feita com água de torneira (4% de água por cada 100g de peso corporal).

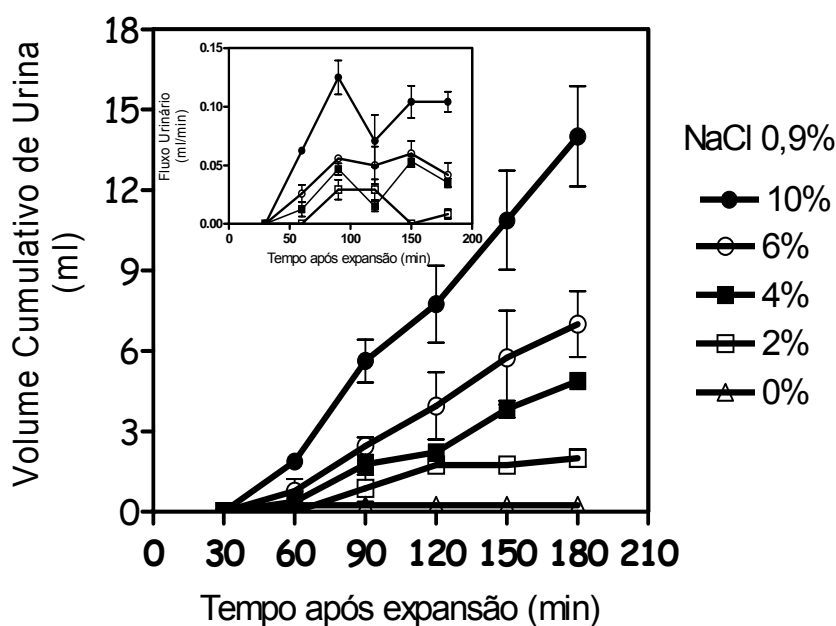


FIGURA 6. Efeito de expansões crescentes de volume extracelular sobre o volume cumulativo de urina. Os ratos com livre acesso à água receberam, por gavagem, volumes variáveis (0 a 10% do peso corporal) de NaCl a 0,9%. Em seguida, foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina foi medido de 30 em 30 min, durante 3 h após a expansão. “*Inset*”: Variação do fluxo urinário (ml/min) durante as 3 h após a expansão de volume.

5.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO E DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A DIURESE EM RATOS

Nessa série experimental, foi investigado o efeito do EB_{AaD} e SAP_{AaD} sobre a diurese em ratos previamente mantidos sob 2 condições de hidratação: i) restrição de água por 12 h ou ii) livre acesso à água.

A Figura 7 mostra o efeito do EB_{AaD} (Fig. 7A) e da SAP_{AaD} (Fig. 7B) sobre a diurese em ratos mantidos sob restrição de água durante as 12 h que antecederam o início dos experimentos (protocolo I). Nesta condição, a expansão de volume (4%) com NaCl 0,9%, por si só, praticamente, não aumentou a diurese e o EB_{AaD}, na maioria das doses utilizadas, também não foi capaz de modificá-la (Fig. 7A). Apenas a dose de 150 mg/Kg produziu um ligeiro aumento no volume de urina quando

comparado, tanto com o controle (sem expansão), quanto com a expansão com NaCl 0,9% apenas. Surpreendentemente, a SAP_{AaD}, mesmo sob restrição de água e ao contrário do EB_{AaD}, inibiu o aumento, mesmo que discreto, no volume urinário

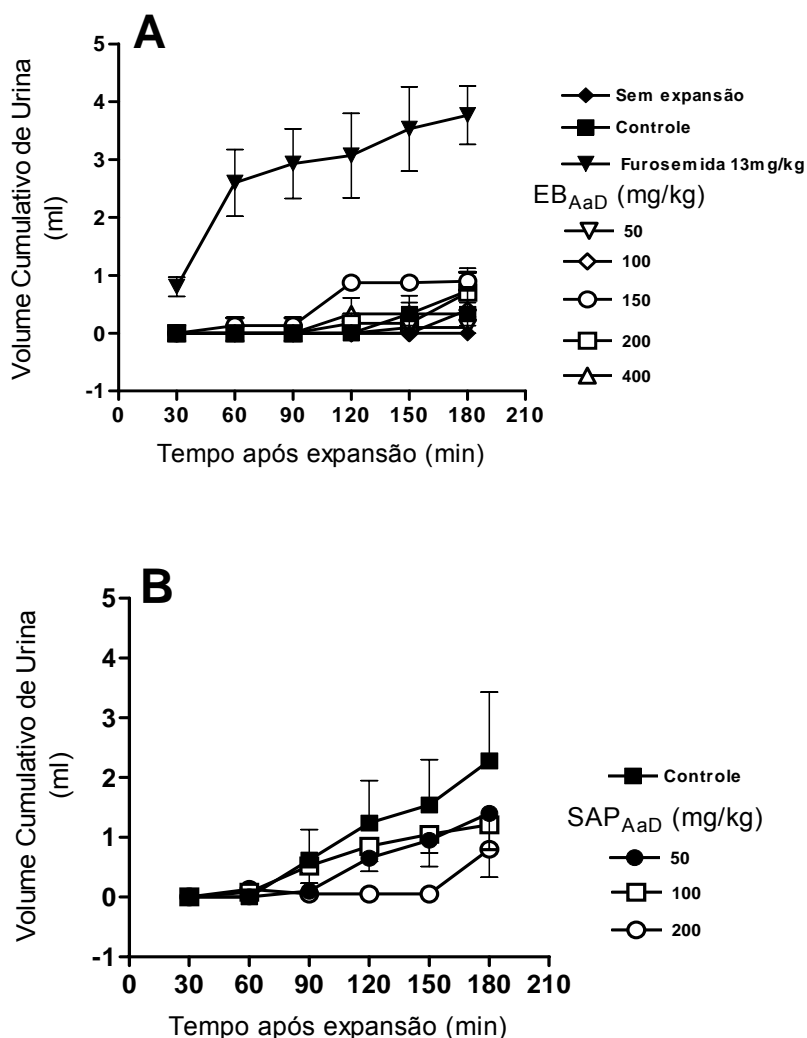


FIGURA 7. Efeito de diferentes doses de EB_{AaD} e de SAP_{AaD} sobre o volume cumulativo de urina. Os ratos sob restrição de água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, doses crescentes de EB_{AaD} (A) ou SAP_{AaD} (B) dissolvidos em um volume de NaCl a 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo).

induzido pela expansão de volume (4%) com NaCl 0,9% (Fig. 7B). Esta inibição foi dose-dependente e atingiu valor máximo com a dose de 200 mg/Kg de SAP_{AaD}. Comparativamente, a Figura 8 mostra o efeito do EB_{AaD} (Fig. 8) e da SAP_{AaD} (Fig. 9) sobre a diurese em ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento (protocolo I). As condições de expansão de volume foram as mesmas já descritas para os experimentos com os ratos sob restrição de água (acima). Sob acesso livre à água, a diurese induzida pela simples expansão com NaCl 0,9% foi bem mais pronunciada (Figs. 8 e 9) do que quando os ratos foram mantidos sob restrição de água (Figs. 7A e 7B). A Figura 8 ainda mostra que o EB_{AaD} aumentou, de forma mais pronunciada, a diurese produzida pela expansão com NaCl 0,9% nos ratos com livre acesso à água (comparar Figs. 7 e 8). Similarmente ao observado nos ratos sob restrição de água, a SAP_{AaD} inibiu a diurese, produzida pela expansão com NaCl 0,9% (Fig. 9), nos ratos com livre acesso à água. Conforme mostra a Figura 9, a redução do volume urinário, em relação à diurese produzida pela expansão com NaCl 0,9% apenas, pela SAP_{AaD} foi dose-dependente. Aos 60 min após a expansão de volume, foi observado uma queda no volume urinário de $1,23 \pm 0,156$ ml (controle, sem SAP_{AaD}) para $0,2 \pm 0,14$ e $0,0 \pm 0,0$ ml, na presença de 50 e 1000 mg/kg de SAP_{AaD}, respectivamente. O efeito antidiurético máximo foi observado aos 90 min de expansão na presença de 50 e 1000 mg/kg de SAP_{AaD} ($0,513 \pm 0,271$ e $0,125 \pm 0,125$ ml vs $2,28 \pm 0,17$ ml).

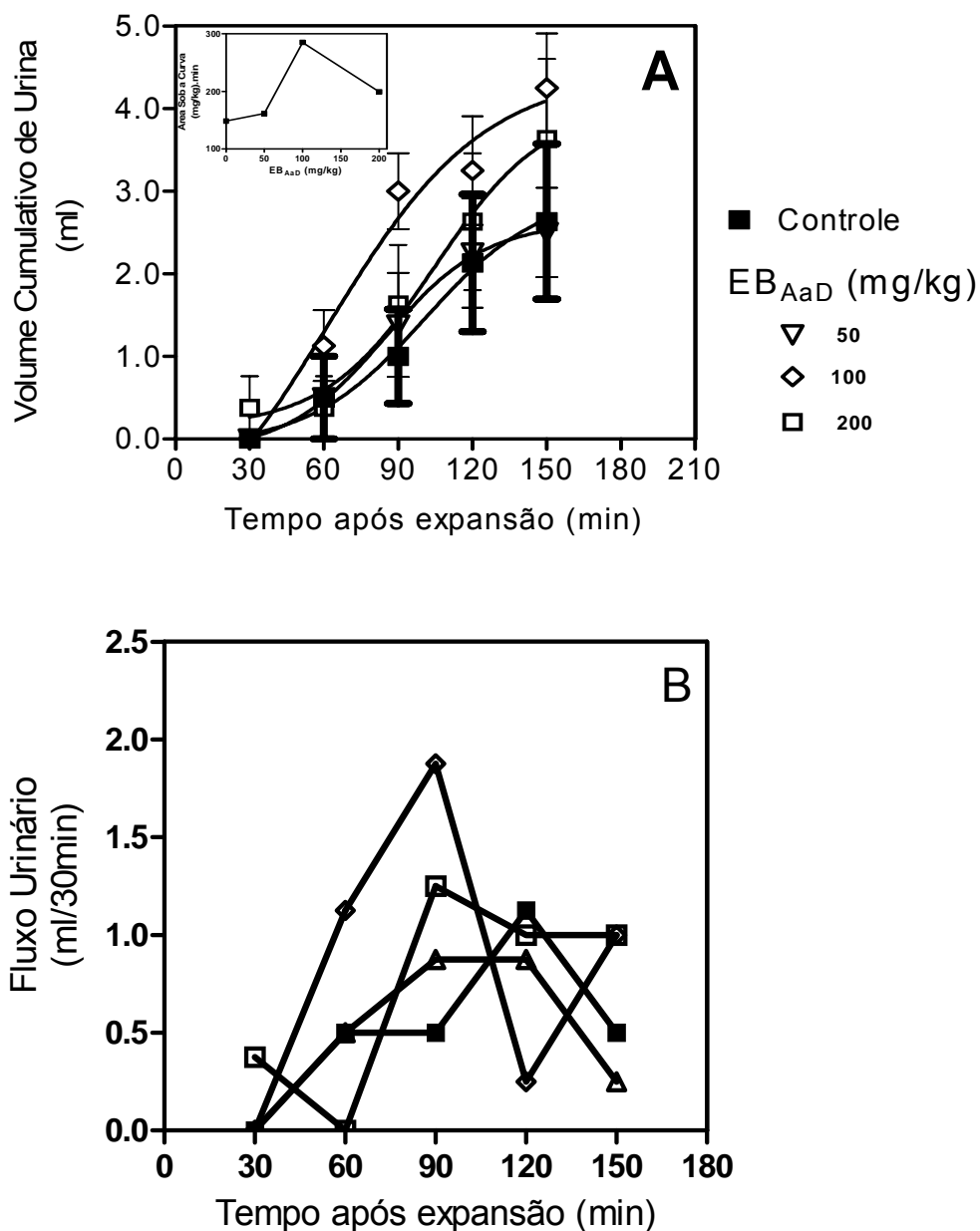


FIGURA 8. Efeito de diferentes doses de EB_{AaD} sobre a diurese em ratos. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, doses crescentes de EB_{AaD} dissolvido em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina (**A**) foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo). “*Inset*” em **A**, área sob a curva (ml.min); **B**, fluxo urinário (ml/30 min) vs tempo após a expansão.

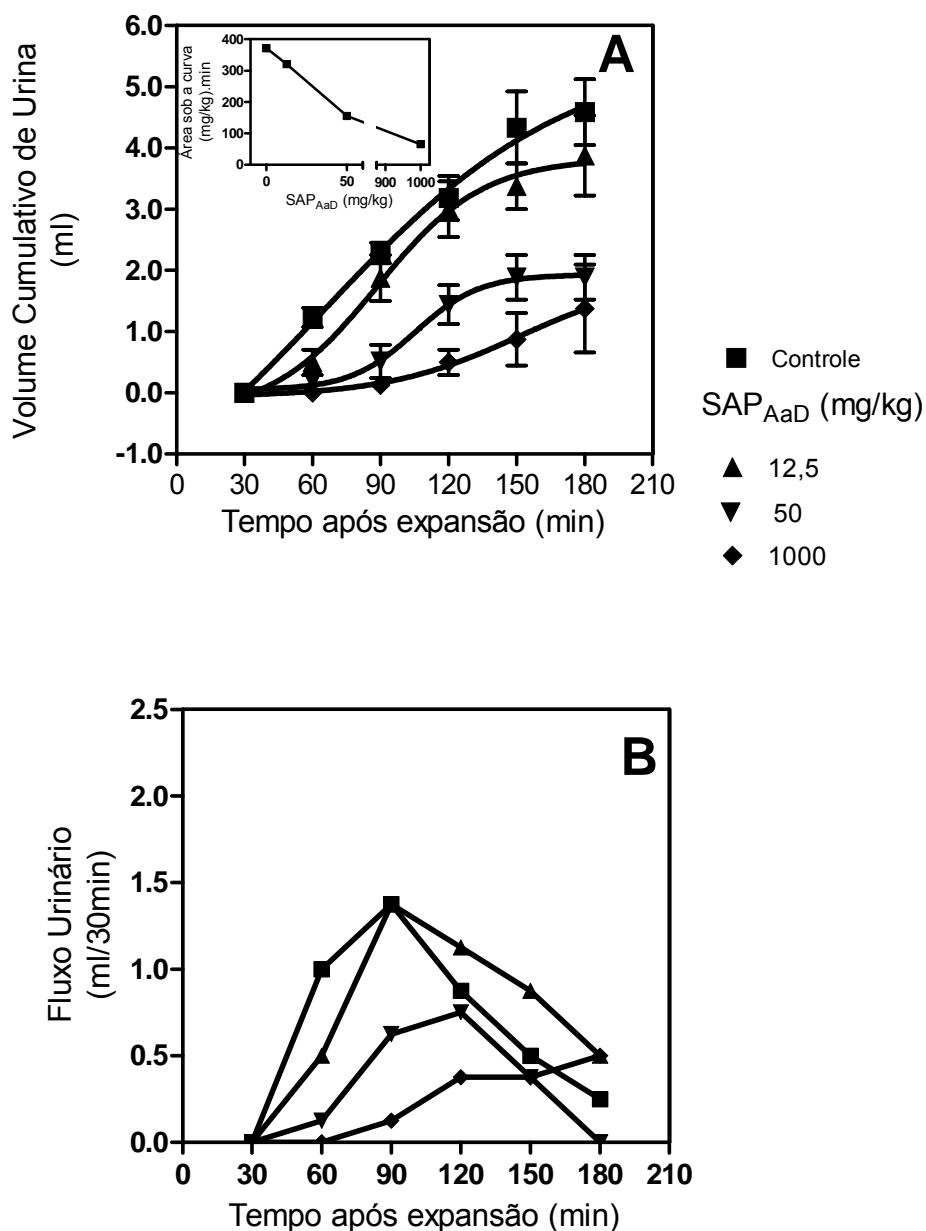


FIGURA 9. Efeito de diferentes doses de SAP_{AaD} sobre a diurese em ratos. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, doses crescentes de SAP_{AaD} dissolvidas em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina (**A**) foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo). “*Inset*” em **A**, área sob a curva (ml.min); **B**, fluxo urinário (ml/30 min) vs tempo após a expansão.

5.5 EFEITO DAS SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A DIURESE INDUZIDA POR EXPANSÃO HIPOSMÓTICA DE VOLUME

De forma similar ao observado na expansão com NaCl 0,9%, quantidades variáveis de SAP_{AaD} reduziram, de maneira dose-dependente, o volume urinário em relação à diurese produzida pela expansão de volume com água comum (4% do peso corporal) (Fig. 10).

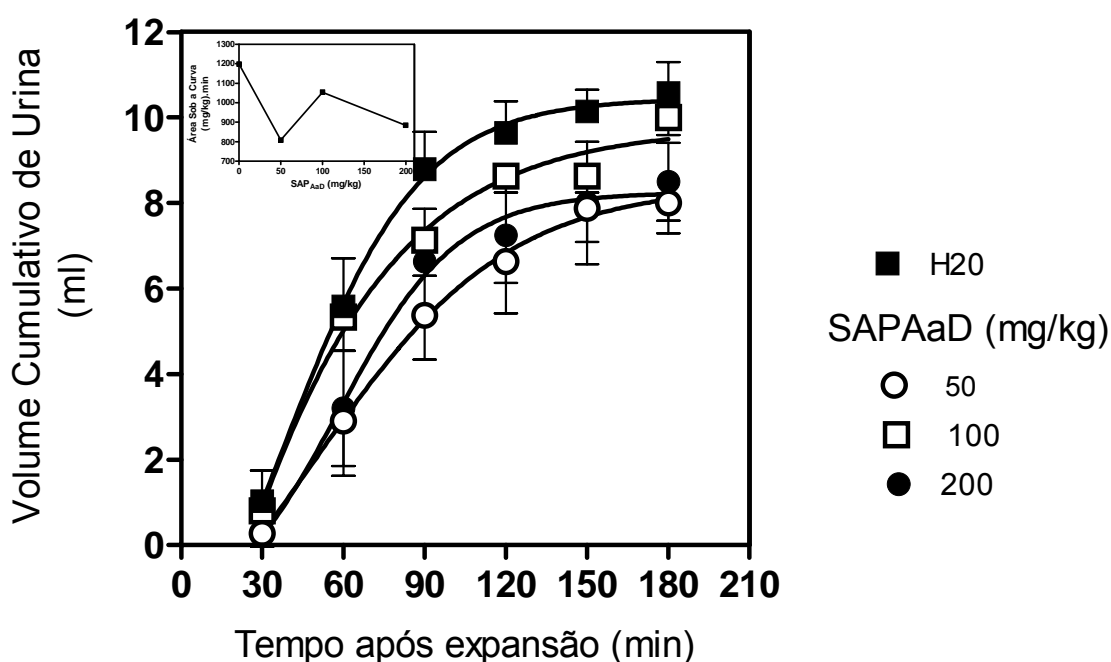


FIGURA 10. Efeito de doses variáveis de SAP_{AaD} sobre a diurese em ratos após expansão hiposmótica de volume. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, doses crescentes de SAP_{AaD} dissolvidas em um volume de água comum suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo). “*Inset*”, área sob a curva (ml.min).

Embora a diurese induzida pela expansão com água (protocolo V) seja mais intensa do que aquela induzida pela expansão com NaCl 0,9% (Figs. 8 e 9), o efeito inibidor da SAP_{AaD} sobre a diurese induzida pela expansão com água foi similar ao efeito observado na expansão com NaCl 0,9%, conforme mostrado nas Figuras 10 e 11.

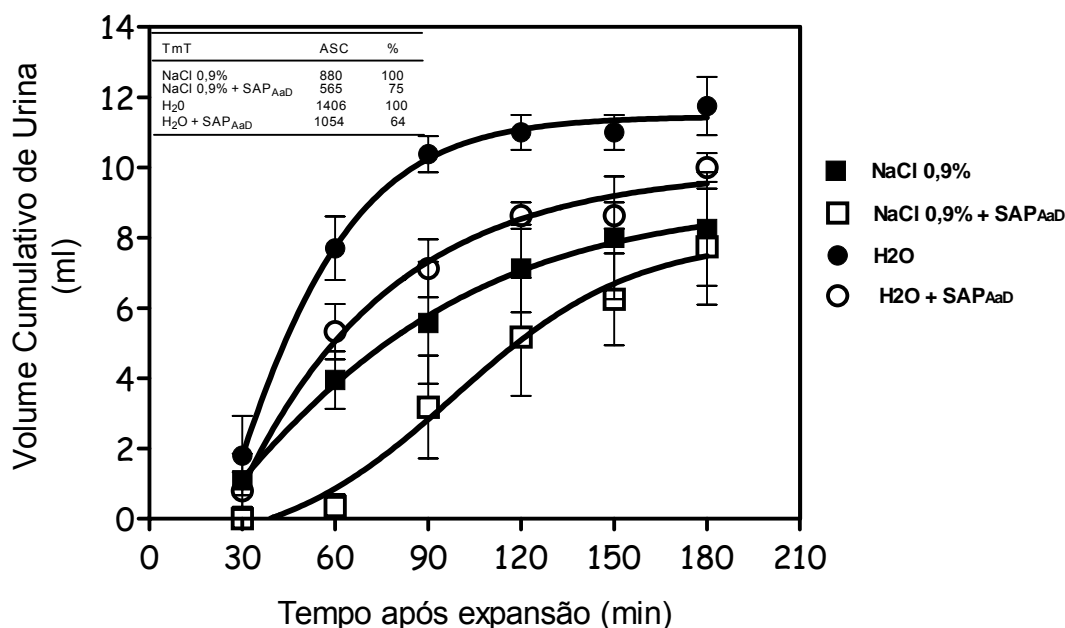


FIGURA 11. Efeito das SAP_{AaD} sobre a diurese em ratos submetidos a expansões iso e hiposmótica de volume. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início dos experimentos receberam, por gavagem, 100 mg/Kg de SAP_{AaD} dissolvidas em um volume, de NaCl 0,9% ou água comum, suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo). “*Inset*”, área sob a curva (ASC, ml.min); 100% representa a diurese produzida pela expansão com água ou NaCl 0,9% na ausência SAP_{AaD}.

Em face dessa similaridade de efeitos sobre a diurese e considerando que a expansão isosmótica não afeta parâmetros como liberação de HAD, nas próximas etapas experimentais, a expansão de volume foi feita com NaCl 0,9%.

5.6 EFEITO DE SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE SOBRE A REABSORÇÃO E EXCREÇÃO DE ÁGUA E ELETROLITOS

A Figura 12 mostra o efeito da SAP_{AaD} sobre o RFG e a FE_{H₂O} aos 90 min após o tratamento. Embora a SAP_{AaD} não tenha afetado, significativamente ($p = 0,112$), o RFG, pôde-se observar que houve uma tendência de redução do mesmo (Fig. 12A). Os valores de RFG foram de $248,5 \pm 68,8$ e $104,6 \pm 16,9$ ml/90 min nos ratos não tratados (controle) e tratados com SAP_{AaD} (50 mg/kg), respectivamente. A FE_{H₂O} também não foi, significativamente ($p = 0,082$), modificada pela SAP_{AaD}, muito embora tenha sido elevada de $1,35 \pm 0,42$ (controle) para $2,46 \pm 0,38\%$ (Fig. 12B). A Tabela 5 mostra os valores médios de osmolalidade e das concentrações plasmática e urinária de Na⁺ e K⁺ nos ratos tratados com SAP_{AaD} (50 mg/kg). À exceção da nenhum desses parâmetros foi, significativamente, alterado pela SAP_{AaD}. Já a urina dos ratos tratados apresentou-se mais concentrada com uma osmolalidade de $1033,7 \pm 66,9$ mOsm/l contra $694,2 \pm 58,3$ mOsm/l na urina dos ratos não tratados (controle).

TABELA 5

Efeito das SAP_{AaD} (50 mg/kg) sobre a osmolalidade e concentrações plasmática e urinária de Na⁺ e K⁺.

Parâmetro	Controle	SAP _{AaD}
[Na ⁺] Plasma, mEq/l (n = 7)	137 ± 2,1	126,7 ± 6,4
[Na ⁺] Urina, mEq/l (n = 7)	99,2 ± 12,7	111,9 ± 11,2
[K ⁺] Plasma, mEq/l (n = 7)	2,6 ± 0,08	2,5 ± 0,14
[K ⁺] Urina, mEq/l (n = 7)	119,7 ± 11,9	194,8 ± 38,4
Osm Plasmática, mOsm/l (n = 6)	298,9 ± 1,7	299,1 ± 2,2
Osm Urina, mOsm/l (n = 6)	694,2 ± 58,3	1033,7 ± 66,9*

Osm, osmolalidade; *p = 0,004

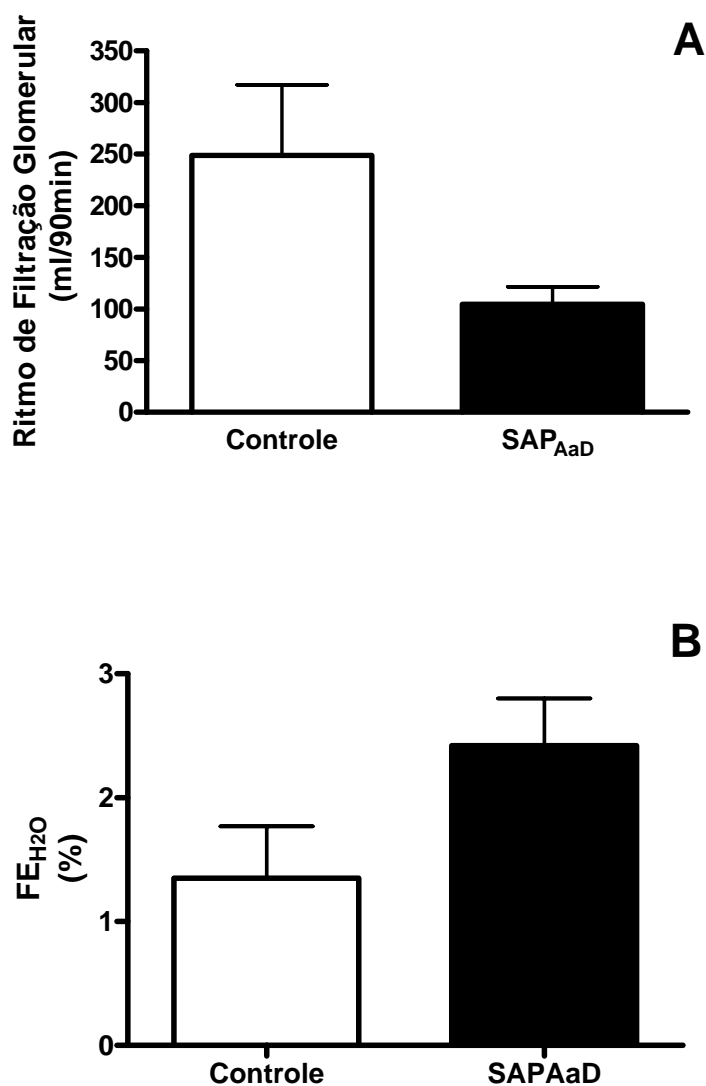


FIGURA 12. Efeito da SAP_{AaD} sobre o ritmo de filtração glomerular (A) e a fração de excreção de H₂O (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg, n = 7) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de urina e sangue foi feita conforme o protocolo III (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 5.

As SAP_{AaD} (50 mg/kg) não apresentou efeito significativo ($p = 0,232$) sobre o “clearance” osmolar que foi de $7,90 \pm 0,55$ ml/min (vs $5,84 \pm 1,45$ ml/min, no controle) (Fig. 13A). Já o “clearance” de água livre tornou-se mais negativo nos ratos tratados com as SAP_{AaD} , passando de $-3,21 \pm 0,73$ ml/min, no controle, para $5,56 \pm 0,45$ ml/min (Fig. 13B). Isto representa um aumento de, aproximadamente, 70% na reabsorção de água.

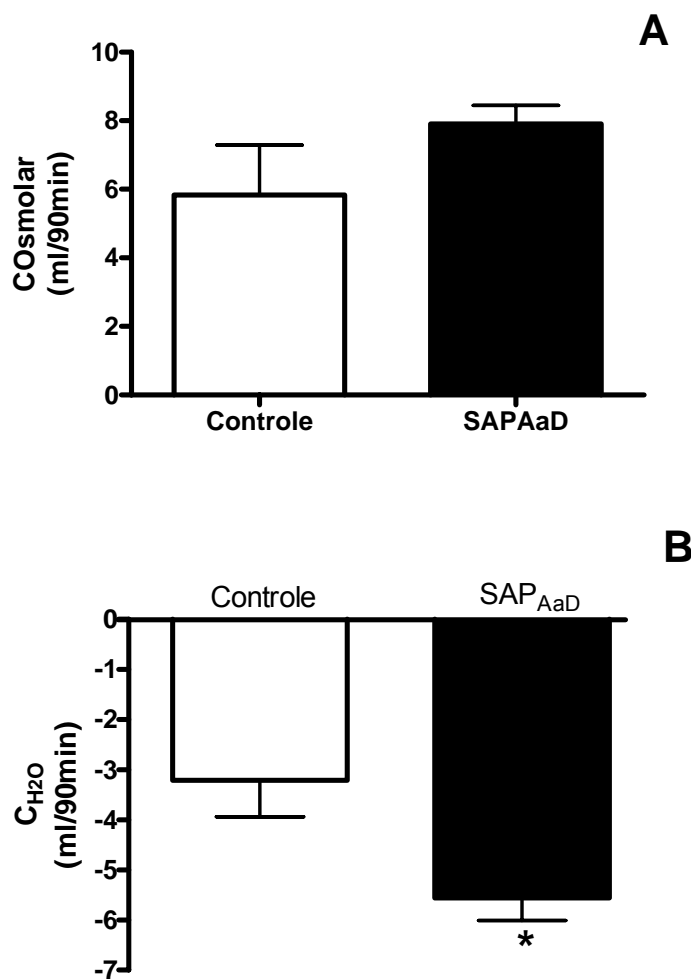


FIGURA 13. Efeito da SAP_{AaD} sobre o “clearance” osmolar (A) e “clearance” de água livre (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg, $n = 6$) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de urina e sangue foi feita conforme o protocolo III (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, $n = 6$. * $p = 0,025$.

A Figura 14 mostra que a FE_{Na^+} e a FE_{K^+} foram, significativamente, elevadas pelo tratamento com SAP_{AaD} (50 mg/Kg). A FE_{Na^+} (Fig. 14A) foi aumentada de $1,01 \pm 0,27\%$ (controle) para $2,17 \pm 0,43\%$, enquanto que a FE_{K^+} (Fig. 14B) passou de $60,1 \pm 20,0\%$ para $131,5 \pm 17,5\%$. Esses valores representam um aumento de cerca de 2 vezes em ambas as frações. Para efeito de informação, as quantidades filtradas e excretadas de Na^+ e de K^+ estão mostradas na Tabela 6.

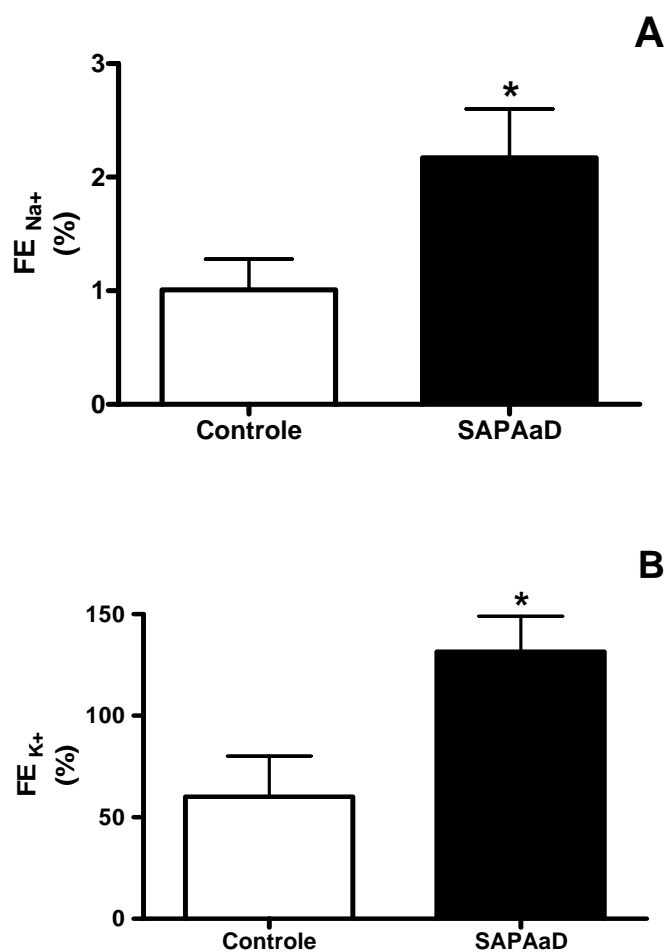


FIGURA 14. Efeito da SAP_{AaD} sobre as frações de excreção de sódio (A) e de potássio (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg, n = 6) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de urina e sangue foi feita conforme o protocolo III (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 6. Em A, *p = 0,048 e em B, *p = 0,028.

TABELA 6

Efeito das SAP_{AaD} (50 mg/kg) sobre as quantidades filtrada e excretada de Na⁺ e K⁺.

Quantidades	Controle	SAP _{AaD}
QFNa ⁺ , mmol/90 min	45,25 ± 19,43 (n = 5)	13,37 ± 2,36 (n = 7)
QENa ⁺ , mmol/90 min	0,30 ± 0,07 (n = 5)	0,25 ± 0,03 (n = 7)
QFK ⁺ , mmol/90 min	0,84 ± 0,36 (n = 5)	0,3 ± 0,08 (n = 6)
QENa ⁺ , mmol/90 min	0,29 ± 0,06 (n = 5)	0,36 ± 0,06 (n = 6)

QF, quantidade filtrada; QE, quantidade excretada

5.7 INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO PELO QUAL AS SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE RAÍZES DA *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE INDUZEM ANTIDIURESE EM RATOS

5.7.1 Saponinas Triterpênicas e peptídeos natriuréticos

A Figura 15 mostra que o tratamento com SAP_{AaD} (50 mg/kg) não afetou os níveis plasmáticos (79,0 ± 12,7 .vs 72,0 ± 12,2 µg/ml, controle) nem o conteúdo atrial de ANP (.4,5 ± 0,6 vs 3,9 ± 0,4.µg/átrio, controle).

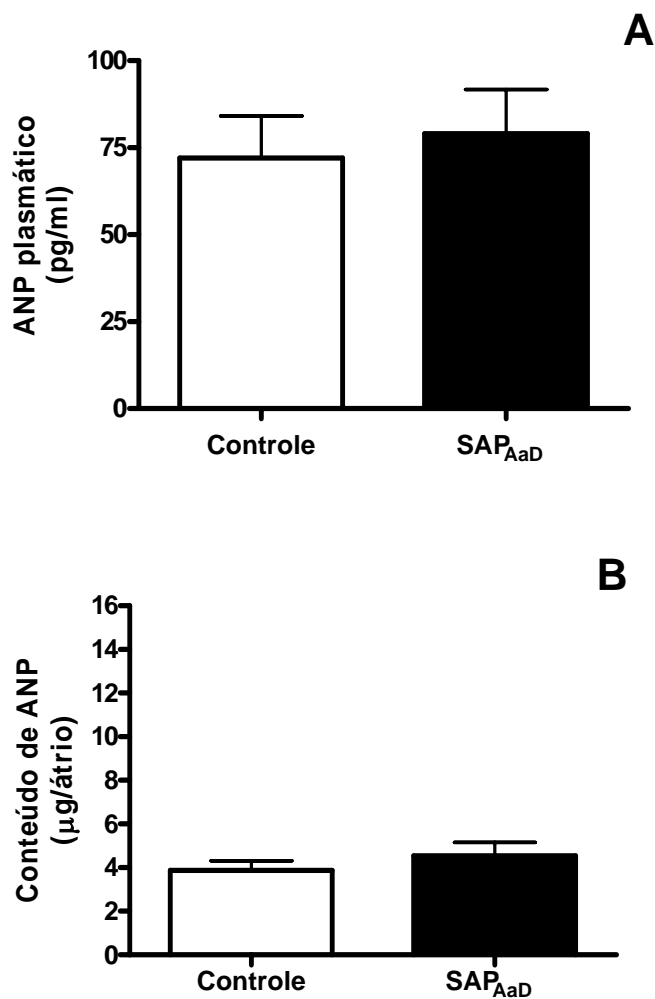


FIGURA 15. Efeito das SAP_{AaD} sobre o peptídeo natriurético atrial no plasma (A) e nos átrios (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg, n = 6) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de sangue e átrios foi feita conforme o protocolo IV (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 12.

Contrariamente ao observado para o ANP, as SAP_{AaD} (50 mg/kg) reduziram, de forma significativa, o conteúdo urinário de urodilatina, o qual diminuiu de 792 ± 132 pg/ml para 299 ± 88 (Controle) (Fig. 16).

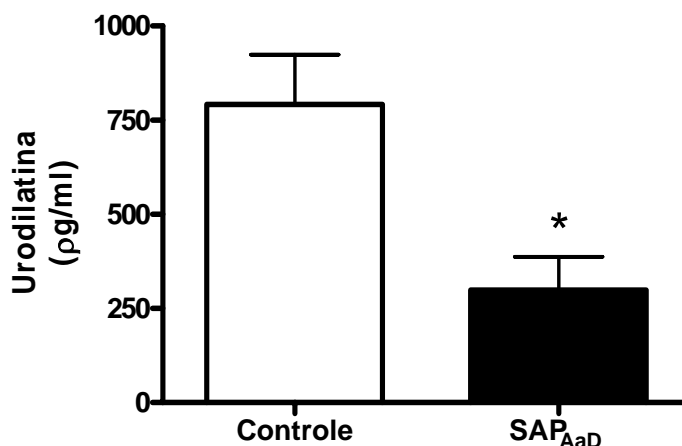


FIGURA 16. Efeito das SAP_{AaD} sobre o conteúdo urinário de urodilatina. Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg = 7) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de sangue e átrios foi feita conforme o protocolo IV (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 7. *p = 0,011

5.7.2 Saponinas Triterpênicas e Atividade ATPásica do Córtex Renal

A Figura 17 mostra o efeito das SAP_{AaD} (50 mg/kg) sobre a atividade da Na⁺ -ATPase e da (Na⁺ + K⁺) ATPase. Enquanto que a atividade da Na⁺ -ATPase foi elevada de 25,0 ± 5,9 (controle) (Fig. 17A) para 52,7 ± 8,9 nmol Pi x mg⁻¹x min⁻¹, atividade da (Na⁺ + K⁺) ATPase aumentou de 47,8 ± 13,3. para 69,7 ± 11,2 nmol Pi x mg⁻¹x min⁻¹.

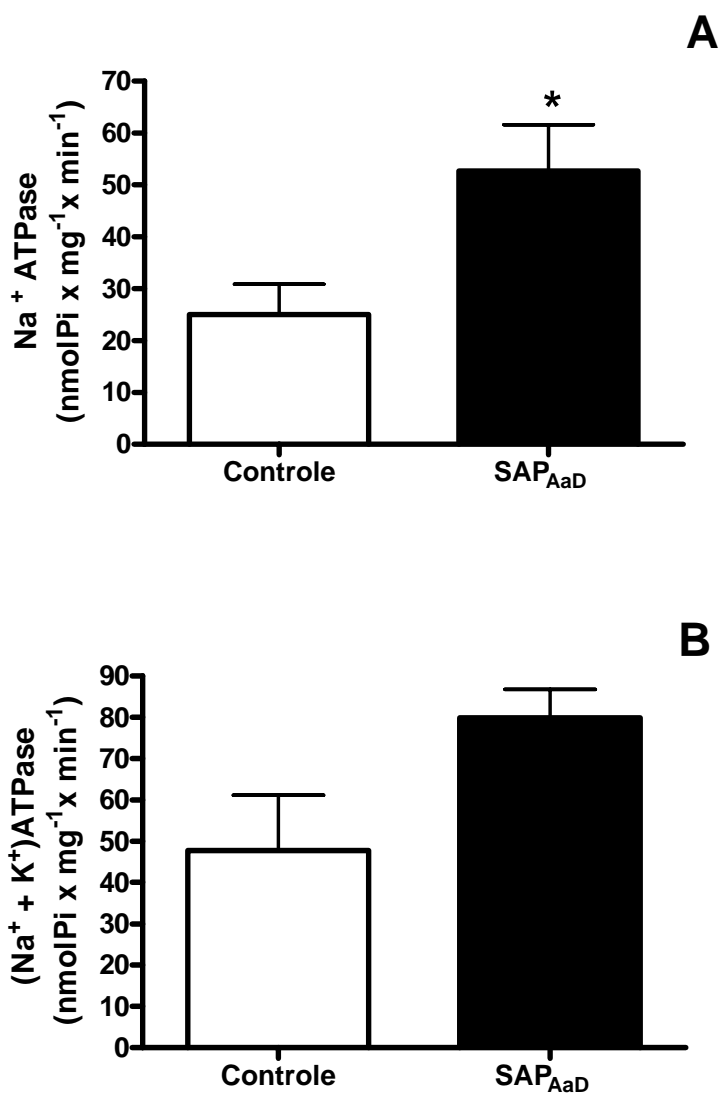


FIGURA 17. Efeito das SAP_{AaD} sobre a atividade da Na⁺-ATPase (A) e da (Na⁺ + K⁺) ATPase (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início do experimento receberam, por gavagem, SAP_{AaD} (50 mg/Kg = 4) dissolvida em um volume de NaCl 0,9% suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e a coleta de sangue e átrios foi feita conforme o protocolo IV (Métodos). Controle: NaCl 0,9% apenas, n = 4. *p = 0,049.

5.7.3 Saponinas Triterpênicas e diurese induzida por furosemida

Nesta série experimental (protocolo VI) foi investigado o efeito das SAP_{AaD} sobre a diurese induzida pela furosemida. Conforme pode ser observado na Figura 18A, o pré-tratamento com SAP_{AaD} (50 mg/Kg) , 30 min antes da expansão de volume (4%) com NaCl 0,9% apenas, não teve qualquer efeito sobre a diurese provocada pela simples expansão. Por exemplo, aos 60 min após a expansão, o volume de urina foi de $3,5 \pm 0,44$ e $4 \pm 0,5$ nos animais tratados e não tratados com SAP_{AaD}, respectivamente. Já nos animais expandidos com NaCl 0,9% contendo furosemida (13 mg/Kg), a SAP_{AaD}, administrada 30 min antes da expansão de volume (4%) reduziu, significativamente ($p < 0,02$), o efeito diurético da furosemida (Fig. 18B). Aos 60 min após a expansão, o volume de urina foi reduzido de $8,13 \pm 0,7$ ml para $5,25 \pm 0,4$ ml.

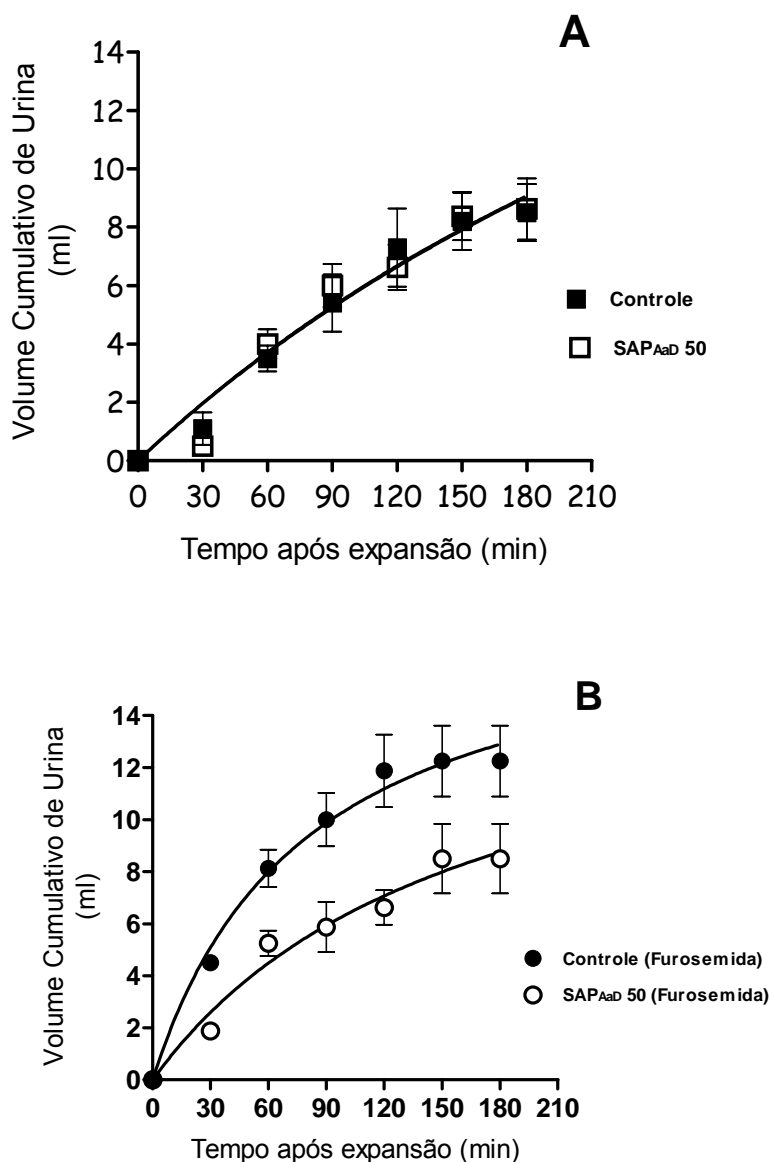


FIGURA 18. Efeito das SAP_{AaD} sobre a diurese em ratos submetidos à expansão de volume com NaCl 0,9% apenas (A) ou com NaCl 0,9% contendo furosemida (B). Os ratos com livre acesso à água durante as 12 h que antecederam o início dos experimentos receberam, por gavagem, 0,5 ml de NaCl 0,9% contendo ou não 50 mg/kg de SAP_{AaD}. Após 30 min, os ratos receberam, também por gavagem, NaCl 0,9% apenas ou NaCl 0,9% contendo furosemida (13mg/kg) em volume suficiente para promover uma expansão de volume correspondente a 4% do peso corporal do rato (protocolo VI, Métodos). Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas e o volume cumulativo de urina foi medido a cada 30 min, durante 3 h (n = 5, por grupo).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo mostra que enquanto o extrato bruto das raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}) aumenta a diurese em ratos, as saponinas (SAP_{AaD}) dele extraídas produzem antidiurese. Porém, para se estudar os efeitos de tais substâncias sobre a função renal, o grau de toxicidade das SAP_{AaD} foi avaliado pela análise da morfologia renal e pela sua atividade hemolítica. Como esperado, as SAP_{AaD} apresentaram atividade hemolítica *in vitro*, em concentrações que variaram de 50 a 0,78 mg/ml. Essa atividade foi dependente da concentração de SAP_{AaD} utilizada, ou seja, a atividade hemolítica foi máxima com SAP_{AaD} na concentração de 50 mg/ml e mínima na concentração de 0,78 mg/ml. Esse resultado está de acordo com o observado por outros autores, uma vez que a grande maioria das saponinas presentes em outras plantas apresenta atividade hemolítica, sobretudo quando as saponinas apresentam apenas uma única cadeia de açúcares ligados a sua aglicona (CHANDEL *et al.*, 1980; PRINCE *et al.*, 1987; OLESKEZ, 1990; OLESKEZ *et al.*, 1992). Esse efeito é resultante da capacidade das saponinas de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular (GLAUERT *et al.*, 1967; KARABALIEV *et al.*, 2003). A SAP_{AaD}, ao ser infundida intravenosamente a uma taxa de 2,5 mg/min (SAP_{AaD} 50 mg/ml, fluxo na infusão = 50 µl/min, durante da infusão = 90 min), apresentou uma atividade hemolítica leve comparável à hemólise produzida pela SAP_{AaD} na concentração de 0,78 mg/ml, no experimento *in vitro*. A dose intravenosa de 2,5 mg/min equivaleu a uma dose média de 750 mg/kg. Essa baixa atividade hemolítica das SAP_{AaD}, *in vivo*, está de acordo com o relatado por BRUNETON (1999) ao ressaltar que muitas das características biológicas e farmacológicas das saponinas, observadas *in vitro*, não são reproduzíveis *in vivo*. Isto se dá, principalmente, quando administradas oralmente, uma vez que muito pouco das saponinas intactas, na forma de glicosídeos, é absorvido no intestino (GESTETNER *et al.*, 1968). A baixa absorção intestinal pode ser responsável pela baixa toxicidade apresentada pelas saponinas, quando administradas oralmente. O baixo grau de toxicidade pôde ser comprovado pela análise histológica de rins de

ratos tratados, oralmente, com SAP_{AaD} (50 e 1000 mg/kg). Os rins dos animais tratados com SAP_{AaD} 50 mg/kg apresentaram apenas um pequeno aumento no número vacúolos nos túbulos renais, ao passo que nos rins dos ratos tratados com SAP_{AaD} 1000 mg/kg houve um aumento ainda maior no número de vacúolos e aparecimento de focos pontuais de degeneração da membrana celular e de núcleos picnóticos.

Alguns relatos da literatura mostram que derivados de plantas, inclusive saponinas triterpênicas, podem atuar sobre a função renal exibindo tanto efeitos benéficos, como maléficos. Por exemplo, saponinas triterpênicas (saikisaponina-d) extraídas de raízes da *Bupleurum falcatum* L. apresentaram atividade nefroprotetora ao prevenir o desenvolvimento de proteinúria induzido por aminonucleosídeos, em ratos (ABE *et al.*, 1986). De forma similar, a hiperplasia mesangial glomerular e a espessura da membrana basal glomerular, em ratos Spragle-Dawley com nefropatia diabética induzida por streptozotocina, foram reduzidas por saponinas extraídas da *Astragalus membranaceus* BUNGE (YIN *et al.*, 2004). Enfim, um grande número de plantas, muitas delas ricas em saponinas triterpênicas, possui atividade nefrotóxica, quer seja pela propriedades inerentes aos compostos vegetais, quer seja pelo uso inadequado das mesmas como, por exemplo, interações com outras drogas e utilização de altas doses (WOJCIKOWSKI *et al.*, 2004). Efeitos como necrose e infiltração celular no glomérulo e no epitélio dos túbulos renais têm sido atribuídos às saponinas presentes em plantas como a Rinbacina, relatados (AFONNE *et al.*, 2002) e *Argania spinosa* e *Citrullus colocynthis* (ALAOUI *et al.*, 1998; DIWAN *et al.*, 2000). SOKAR *et al.* (2003) também atribuem às saponinas triterpênicas, presentes na *Herniaria cinerea* DC, a grande necrose tubular e a hemorragia observadas em lâminas histológicas de rins de ratos tratados, por via oral, por 2 semanas, com o extrato butanólico da *Herniaria cinerea* DC, em doses superiores a 1g/kg. Em nosso estudo, a dose de 1g/Kg, foi a dose mais elevada de SAP_{AaD} utilizada. Isto pode explicar a não observação de grandes alterações na morfologia renal. Além do mais, nesse trabalho, examinamos o efeito agudo (horas) de uma única dose de SAP_{AaD}, ao contrário dos protocolos usados nos trabalhos acima relatados, onde foram analisados os efeitos crônicos (dias a semanas) com doses repetidas dos extratos das plantas. Embora questionável, está estabelecido que em um estudo de toxicidade aguda, via oral, um produto só é considerado não tóxico quando, em

doses inferiores a 5g/kg, não provoca morte e nenhum sinal clínico é observado em consequência da administração do mesmo (BROCK *et al.*, 1995). Diante disso, as SAP_{AaD} podem ser consideradas não tóxicas ou, pelo menos, com toxicidade leve.

A fim de se investigar o efeito agudo do EB_{AaD} e das SAP_{AaD}, uma expansão de volume (4% do peso corporal) foi feita na maioria dos protocolos experimentais. A opção pelos 4% foi feita com base no fato de que a diurese promovida por essa magnitude de expansão não é mínima nem máxima, o que permite o estudo de efeitos de substâncias que tanto estimula como inibe a diurese. Experimentos sob condições normais de expansão de volume requer um período longo de coleta de urina (24 h) e assim, caso tais substâncias tenham efeito mais imediato, as possíveis alterações na diurese poderiam não ser detectadas pelo longo período de coleta. Estudo prévio em nosso Laboratório (MEYER, 2002) mostrou que o tratamento prolongado (5 dias) com o EB_{AaD} aumenta a diurese em ratos com livre acesso à água. Em um protocolo experimental inicialmente utilizado, nesse estudo, foi observado que o EB_{AaD} aumentava, apenas discretamente, a diurese induzida pela expansão de volume (4% do peso corporal) com NaCl 0,9% em animais que haviam sido mantidos sob restrição de água durante as 12 h que antecederam o início do experimento. A razão para a minimização do efeito do EB_{AaD} pode ser que, sob a condição de restrição de água, mecanismos que promovem antidiurese como, por exemplo, a liberação de HAD, devem estar estimulados. Já nos animais com livre acesso à água nas 12 h que antecederam o início do experimento, o EB_{AaD} produziu um aumento mais pronunciado na diurese sendo, esse efeito, dose-dependente. A fim de identificar qual(is) composto(s) presente(s) no EB_{AaD} seria(am) responsável(is) pelo aumento na diurese, o mesmo foi submetido a processos de fracionamento. Uma fração daí obtida e composta por saponinas triterpênicas (SAP_{AaD}) foi usada na maioria das etapas deste trabalho. A forma de isolamento e a elucidação estrutural de saponinas triterpênicas das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke já havia sido descrita, em 1991, por LINS BRANDÃO *et al.*

Para a nossa surpresa e contrariamente ao esperado, as SAP_{AaD} extraídas do EB_{AaD} produziram antidiurese. Este efeito, embora mais acentuado em animais com livre acesso à água nas 12 h que antecederam o início dos experimentos, também foi observado nos ratos mantidos sob restrição de água durante esse mesmo período. O efeito antidiurético das SAP_{AaD} foi observado tanto na expansão de

volume com NaCl 0,9% (expansão isosmótica), quanto na expansão com água (expansão hiposmótica). Embora a diurese produzida pela expansão hiposmótica seja maior do que aquela induzida pela expansão isosmótica, a inibição da diurese pela SAP_{AaD} foi, proporcionalmente, semelhantes sendo, esta inibição, igual a 75 e 64% nas expansões isosmótica e hiposmótica, respectivamente. Assim, uma maior inibição da liberação de HAD, em decorrência da baixa osmolalidade plasmática (BANKIR, 2001; VERBALIS, 2003) provocada pela expansão hiposmótica, não interferiu com o efeito antidiurético das SAP_{AaD}.

A ação diurética de plantas tem sido relatada por alguns autores. Por exemplo, BEVEVINO et al. (1994) verificaram que o extrato bruto das raízes de *Bredemeyera floribunda* induz aumento significativo no fluxo urinário, em ratos e que esse efeito era devido às saponinas triterpênicas presentes na planta. De forma semelhante, o efeito antihipertensivo exibido pelas saponinas encontradas nas partes aéreas da *Herniaria glabra* parece ser devido ao efeito diurético das mesmas, em ratos espontaneamente hipertensos (RHIOUANI et al., 1999). Além disso, estudos utilizando ratos geneticamente hipertensos tipo DahlII sensíveis a sal (DSS), mostraram que o efeito anti-hipertensivo do ácido oleanólico e do ácido ursólico era devido ao potente efeito diurético desses compostos triterpênicos (SOMOVA et al., 2003).

Em nosso trabalho mostramos, pela primeira vez, que as saponinas extraídas da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke possui efeito antidiurético, já que nenhum trabalho relatando efeito semelhante foi encontrado na literatura.

Além do efeito antidiurético, as SAP_{AaD} não afetaram, significativamente, o RFG, embora tenha sido observado uma tendência de redução do mesmo (Fig. 12). Igualmente, a fração de excreção de água não foi afetada, de forma significativa. Novamente, os nossos dados estão em desacordo com dados encontrados na literatura. Segundo BEVEVINO et al., (1994), além de aumentar o fluxo urinário, o extrato bruto das raízes da *Bredemeyera floribunda* também aumenta o RFG.

Nenhum estudo relatando que algum tipo de planta é inefetivo ou mesmo capaz de promover queda no RFG foi, por nós localizado. Com relação às discrepâncias entre os nossos resultados com a *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke e aqueles relatados para a *Bredemeyera floribunda*, diversas hipóteses para explicá-las podem ser levantadas como, por exemplo, a própria diferença de espécie e o

protocolo experimental utilizado nos dois estudos. Um aumento no número de experimentos bem como o delineamento de experimentos que mostrem um efeito mais direto das SAP_{AaD} sobre o RFG, sem dúvida, fazem-se necessários.

As SAP_{AaD} aumentou, de forma significativa, a osmolalidade urinária, embora não tenha afetado as concentrações plasmática e urinária de Na^+ e de K^+ e também da osmolalidade plasmática. Pela análise da excreção de Na^+ e de K^+ observa-se que a SAP_{AaD} aumentou a fração de excreção de ambos os íons. Esses dados estão em consonância com a observação de BEVEVINO *et al.* (1994) que relataram um aumento na fração de excreção de Na^+ e K^+ produzido pelo extrato bruto de raízes da *Bredemeyera floribunda*.

O aumento na excreção de K^+ , promovida pelo tratamento com SAP_{AaD} , pode estar relacionado com um aumento nos níveis plasmáticos do HAD. Vários estudos mostram que o HAD estimula a secreção de íons K^+ no túbulo distal e no ducto coletor cortical (FIELD *et al.*, 1984; TOMITA *et al.*, 1987; SCHAFER *et al.*, 1986; WANG *et al.*, 1991; AMORIM *et al.*, 2000). Em um outro estudo, ELALOUF *et al.* (1973), usando ratos Brattleboro, que são animais que não produzem HAD, verificaram que o tratamento com HAD exógeno promovia um aumento na secreção de tubular de íons potássio nos túbulos distais. Esse aumento era independente de um aumento do fluxo no túbulo distal ou do aporte de íons sódio neste segmento do néfron, fatores conhecidos por influenciarem na secreção de íons K^+ (GOOD *et al.*, 1979).

A dosagem de HAD no plasma de ratos tratados com SAP_{AaD} foi objetivo desse trabalho. Durante o processo de dosagem, por motivos técnicos (escassez de anticorpo) tais medidas não se mostraram, quantitativamente, fidedignas. Apesar disso, os níveis de HAD foram, qualitativamente, mais elevados no plasma de animais tratados com as SAP_{AaD} , quando comparados ao HAD plasmático de ratos não tratados. Para a comprovação desse dado, a dosagem de HAD necessita ser repetida para. De qualquer forma, um possível aumento no HAD circulante, induzido pelas SAP_{AaD} , poderia ser o responsável pela elevação da fração de excreção de K^+ .

Diversos fatores endógenos podem ser os responsáveis por um aumento na excreção de Na^+ e K^+ . A filtração glomerular é um dos principais mecanismos que regulam a excreção renal de Na^+ . Uma vez que grandes quantidades de Na^+ são filtradas nos rins, pequenas mudanças no RFG podem ter grandes efeitos no Na^+

excretado, apesar de que mudanças na quantidade de Na^+ filtrado serem compensadas com concomitantes mudanças na reabsorção de Na^+ nos túbulos proximais, via “feedback” tubuloglomerular (EATON & POOLER, 2006). Outro fator determinante na excreção renal de sódio é a secreção de aldosterona, hormônio que aumenta a reabsorção de Na^+ nos segmentos distais do néfron. Esse efeito se dá por i) indução da síntese de canais iônicos que afetam a reabsorção de Na^+ e K^+ , nas células epiteliais tubulares, principalmente, os canais de Na^+ localizados no lúmen das células tubulares e ii) ativação da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ presente no ducto coletor cortical (VERBALIS, 2003; BLOT-CHABAUD et al., 1990).

Uma redução na síntese e/ou liberação de aldosterona, estimulada pelas SAP_{AaD} , poderia ser a responsável pelo aumento na fração de excreção de Na^+ observado em nosso estudo. Uma queda nos níveis plasmáticos de aldosterona poderia diminuir a síntese daqueles canais de Na^+ localizados no lúmen das células tubulares medulares reduzindo, então, a sua reabsorção. Nesse sentido, encontra-se na literatura alguns exemplos de plantas medicinais envolvidas em alterações dos níveis plasmático de aldosterona, tais como a *Salvia miltiorrhiza* usada, cronicamente, por 12 semanas, diminuiu os níveis plasmáticos de aldosterona em ratos espontaneamente hipertensos (HAN et al., 2002). FORSULND et al. (1989) relataram que a ingestão diária, por 8 semanas, de licorice (alcaçuz), composto vegetal extraído da *Glycyrrhiza glabra* L. e que possui em sua composição saponinas triterpênicas, reduziu a concentração plasmática de aldosterona. Em um outro estudo, AL-QUARAWI et al. (2002) que mostraram que a administração oral do extrato aquoso das raízes dessa mesma planta (*Glycyrrhiza glabra* L.), nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg promoveu a redução dos níveis de aldosterona em ratos. Estudos mostram que a *Glycyrrhiza glabra* L é um inibidor competitivo da isoforma 11 β Hidroxiesteroide Desidrogenase 2 (11 β - HSD2), enzima que catalisa a reação da conversão de cortisol em cortisona, prevenindo a ativação dos receptores de mineralocorticóides pelo cortisol (STEWART et al., 1994; DRAPER et al., 2005). O cortisol é um glicocorticóide envolvido no controle da pressão sanguínea capaz de se ligar tanto a receptores de glicocorticóides como a receptores de mineralocorticóides (FUNDER et al., 1988). Assim a inibição da 11 β - HSD2 pela *Glycyrrhiza glabra* L, nos tecidos alvos da aldosterona, leva a um quadro de hipertensão e hipocalcemia, conhecido como síndrome aparente do excesso de aldosterona, que resulta da

ativação dos receptores de mineralocorticóides pelo cortisol em excesso, que compete com a aldosterona pelo sítio de ligação dos receptores (CONN *et al.*, 1968; FUNDER *et al.*, 1988; WHITE *et al.*, 1997).

Apesar da grande influência sobre a variação da excreção de Na^+ , somente o RFG e a aldosterona não podem explicar completamente a natriurese que ocorre na ausência de grandes mudanças no RFG e na secreção de aldosterona observadas, por exemplo, durante expansão isotônica de volume. Isto sugere a participação de outros fatores na regulação da excreção de Na^+ .

No presente trabalho, verificamos que as SAP_{AaD} diminuíram o conteúdo urinário de urodilatina, embora não tenha afetado os níveis plasmático e atrial de ANP. Dados da literatura têm mostrado que o ANP_{99-126} estimula a natriurese e diurese pela inibição da reabsorção do sódio, no ducto coletor medular interno, resultante da inibição de canais de Na^+ presentes na membrana apical e da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase da membrana basolateral das células principais desse segmento do néfron (BELTOWSKI, 2002; ZEIDEL *et al.*, 1993; KNEPPER *et al.*, 1991). Além da inibição da reabsorção tubular de Na^+ , o ANP_{99-126} pode induzir natriurese adicional por aumento no RFG (COGAN, 1986), inibição do sistema renina-angiotensina, da atividade do sistema nervoso simpático (ESPINER *et al.*, 1995) e do efeito do HAD (DILLINGHMAN *et al.*, 1986).

A urodilatina é um peptídeo natriurético que, em condições fisiológicas, não é detectado no plasma (DRUMMER *et al.*, 1993). Por isso, acredita-se que o peptídeo seja sintetizado pelas próprias células tubulares renais e secretado dentro do lúmen do túbulo distal e ducto coletor onde se liga ao receptor NPR-A, atuando de forma parácrina na regulação da excreção de Na^+ e da água (RITTER *et al.*, 1991; FELLER *et al.*, 1988). Estudos sugerem que o efeito da urodilatina sobre a função renal é semelhante ao efeito do ANP_{99-126} , ou seja, a urodilatina diminui a reabsorção tubular de Na^+ e água principalmente no ducto coletor medular (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1988; MEYER *et al.*, 1996; BESTLE *et al.*, 1999). Experimentos em animais e humanos têm mostrado que a urodilatina, em doses equimolares ao ANP, possui um efeito diurético e natriurético maior que o do ANP (HILDEBRANDT *et al.*, 1992; BESTLE *et al.*, 1993). Uma possível explicação para essa maior potência natriurética e diurética, em relação ao ANP, seria uma maior quantidade de urodilatina a atingir os seus receptores nos túbulos renais em virtude de uma menor degradação de

suas moléculas. Estudos mostram que, ao contrário do ANP, a urodilatina não é inativada pelas peptidases presentes na membrana de células do córtex renal em cão (GEGELMANN *et al.*, 1988). Além do mais, a inibição da endopeptidase neutra não afetou o “clearance” metabólico da urodilatina, ao contrário do ANP₉₉₋₁₂₆ que teve seu “clearance” diminuído, em ratos (ABASSI *et al.*, 1992). Assim, em nosso estudo, a diminuição nos níveis urinários de urodilatina pode estar envolvida na redução da diurese produzida pelas SAP_{AaD}.

Poucos estudos mostram o efeito de extratos vegetais ou compostos isolados de plantas medicinais sobre peptídeos natriuréticos. No trabalho de FORSULN *et al.* (1989), além da redução na aldosterona plasmática, foi verificado que o licorice (alcaçuz) extraído da *Glycyrrhiza glabra* aumenta, em cerca de 80%, a concentração plasmática de PNA. Em um trabalho, utilizando um modelo de insuficiência cardíaca aguda induzida em ratos, a *Astragalus membranaceus*, planta medicinal chinesa, administrada intraperitonealmente (1g/dia) aumentou, de forma significativa, a relação PNA plasmático/GMPc (MA *et al.*, 1998). Em nosso estudo, as SAP_{AaD} não afetou os níveis plasmático e atrial de PNA. Isto pode ser devido ao protocolo utilizado, uma vez que apenas uma dose de SAP_{AaD} foi administrada. Nenhum trabalho, relacionando urodilatina com plantas medicinais, foi encontrado na literatura.

De modo geral, efeito dessas substâncias pode se dar de forma indireta, via estimulação da liberação de outros mediadores ou diretamente, ao atuar sobre mecanismos tubulares de transporte de eletrólitos e água. Nesse estudo, mostramos que as SAP_{AaD} não afetam, significativamente, a atividade da (Na⁺+K⁺) ATPase da fração microssomal do córtex renal, embora tenha havido uma tendência de aumento da mesma. Há muito tempo, o aumento da atividade dessa ATPase por substâncias com propriedade detergentes, assim com as SAP_{AaD}, tem sido relatado. Assim, JORGENSEN *et al.* (1971) verificaram que substâncias com propriedades detergentes, assim como as SAP_{AaD}, aumentam a atividade da (Na⁺+K⁺) ATPase na fração microssomal de medula externa de rins de coelho. Os autores sugeriram que essa ativação da (Na⁺+K⁺) ATPase era devido à capacidade, dessas substâncias, de promoverem uma abertura na estrutura de vesículas citoplasmáticas favorecendo, assim, migração dessa enzima para a membrana celular. Em concordância com esta observação, GONIN *et al.* (2001) mostraram que as saponinas são capazes de

aumentar a atividade da ($\text{Na}^+\text{+K}^+$) ATPase localizada nas membranas de células do ducto coletor cortical de ratos e em cultura de células principais dos ductos coletores de camundongos (mpkCCD_{c14}). Este efeito foi devido à capacidade das saponinas em aumentar a permeabilidade das membranas de organelas citoplasmáticas que possuem esse tipo de bomba, favorecendo, assim, a migração de grande número de moléculas de ($\text{Na}^+\text{+K}^+$) ATPase do citoplasma para a membrana celular. Em nosso estudo a elevação da atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase não atingiu significância estatística, muito provavelmente, devido ao número (n=4) pequeno de amostras experimentais. Um possível aumento da atividade da ($\text{Na}^+\text{+K}^+$) ATPase poderia contribuir para o efeito de redução da diurese promovidas pelas SAP_{AaD} . Por outro lado, as SAP_{AaD} aumentaram, significadamente, a atividade de uma segunda bomba de Na^+ , a Na^+ ATPase. Esta enzima localiza-se na membrana basolateral das células epiteliais dos túbulos renais e transporta Na^+ do meio intracelular para o meio intersticial, utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP. A atividade dessa enzima é inibível pela furosemida e pelo ácido etacrínico (PROVÉRPIO, 1986). Por apresentar cerca de 10% da atividade ATPásica total, acredita-se que a Na^+ ATPase esteja envolvida numa pequena parcela do transporte do íon sódio ao longo do néfron, portanto, participando do controle fino do transporte de Na^+ e água (CARUSO-NEVES *et al.*, 2002). Esse aumento na atividade da Na^+ ATPase pode estar diretamente relacionado com o efeito antidiurético das SAP_{AaD} .

Uma possível interação entre os efeitos da furosemida e das SAP_{AaD} , *in vivo*, foi avaliada, nesse estudo. O efeito diurético da furosemida foi abolido pelo pré-tratamento dos ratos com SAP_{AaD} . Observação semelhante foi relatada por BECKER *et al.* (1996), que verificou refração ao efeito diurético da furosemida em um paciente hipertenso, que fazia uso domiciliar de um suplemento nutricional à base de ginseng. O ginseng é um composto natural rico em saponinas triterpênicas do tipo dammarano, ou seja, o mesmo tipo de saponinas encontrado nas raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (BRUNETON, 1999).

A atividade aumentada da Na^+ ATPase pode estar envolvida na redução do efeito diurético da furosemida provocada pelas SAP_{AaD} . Em suma, a SAP_{AaD} pode antagonizar o efeito da furosemida sobre a Na^+ ATPase diminuindo seu efeito diurético.

Diversos trabalhos têm relatado que derivados de plantas medicinais afetam a atividade de enzimas envolvidas no transporte renal de eletrólitos. Ao contrário do observado em nosso trabalho, Souza *et al.* (2004) observaram que saponinas isoladas das raízes da *Costus spicatus* reduzem a atividade da Na⁺ ATPase do túbulo proximal de rins de porco. Essa discrepância entre os dois pode ser devido a diferenças nos protocolos experimentais utilizados. O efeito das saponinas isoladas da *C. spicatus* sobre a atividade da bomba foi medido após contato direto das saponinas com as membranas basolaterais dos túbulos proximais (*in vitro*), enquanto que o efeito das SAP_{AaD} sobre a bomba foi medido, em nosso estudo, na fração microssomal do córtex renal, 90 min após a sua administração (*in vivo*). Assim, no primeiro modelo experimental, pode-se observar um efeito direto das saponinas intactas sobre a Na⁺ ATPase, ao passo que no segundo modelo experimental, as SAP_{AaD} podem sofrer alguma transformação metabólica, por ação de enzimas localizadas em diferentes órgãos, produzindo metabólitos que apresentam efeitos semelhantes ou completamente diferentes ao apresentado pela molécula precursora de saponina na sua forma intacta. Assim, o efeito ativador da Na⁺ ATPase promovido pelas SAP_{AaD} administradas, por gavagem, pode ser devido à ação de saponinas intactas e/ou pela ação de algum metabólito formado. Além disso, as saponinas são de natureza diferentes já que as saponinas da *C. spicatus* são do tipo esteroidais e as saponinas da *A. amazonicus* Ducke são do tipo triterpênicas.

Nos vários tecidos que compõem o organismo, a atividade das bombas de sódio é regulada por hormônios como aldosterona, HAD, peptídeos natriuréticos, dopamina, entre outros. Por exemplo, CARUSO-NEVES *et al.* (2004) verificaram que a urodilatina e o ANP não alteram a atividade da (Na⁺ + K⁺)-ATPase, porém, inibem a atividade da Na⁺ ATPase em membrana basolateral isoladas do túbulo proximal de rins de porcos adultos. Os autores sugeriram que essa inibição é mediada pelo GMP cíclico, uma vez que o efeito inibidor de ambos peptídeos foi revertido pela presença de um inibidor da guanilil-ciclase, MLY83583, e pela adição de GMP cíclico. Em nosso estudo, a redução no nível urinário de urodilatina, verificada 90 min após a administração de SAP_{AaD}, pode estar correlacionada com o aumento na atividade da Na⁺ ATPase da fração microssomal do córtex renal. Os peptídeos natriuréticos parecem não modular a atividade da (Na⁺ + K⁺)-ATPase, a menos que haja uma estimulação prévia da enzima pela noroepinefrina (GARVIN,

1992) ou angiotensina II (HARIS *et al.*, 1987). Já o HAD parece estimular sua atividade. TOMITA *et al.* (1987) verificaram que a administração intramuscular de HAD, por 7 dias, produz aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no ducto de coletor cortical de ratos. Assim, um eventual aumento, pelas SAP_{AaD} , dos níveis plasmáticos de HAD poderia estar mediando o aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, o que contribuiria para um aumento na reabsorção de água nas porções finais do néfron.

A Figura 19 esquematiza o(s) provável(is) mecanismo(s) pelo(s) qual (is) as SAP_{AaD} poderiam produzir antidiurese. A redução dos níveis renais de urodilatina pelas SAP_{AaD} implicaria em um aumento na atividade de ATPases renais, principalmente, da $\text{Na}^+ \text{ATPase}$, o que pode levar a um aumento da reabsorção de Na^+ . Por sua vez, níveis de HAD plasmático elevados resultaria numa maior reabsorção de água no ducto coletor medular. Uma maior reabsorção de água associada a uma maior reabsorção cortical de Na^+ poderia ser a maior responsável pela antidiurese induzida pelas SAP_{AaD} . No entanto, não podemos deixar de considerar que a fração de excreção de Na^+ , em nosso estudo, foi aumentada pelas SAP_{AaD} . Uma hipótese para explicar tal efeito, é que uma possível redução, pelas SAP_{AaD} , nos níveis plasmáticos de aldosterona levaria a uma queda na reabsorção de Na^+ , pelo ducto coletor medular, com conseqüente aumento na excreção desse íon.

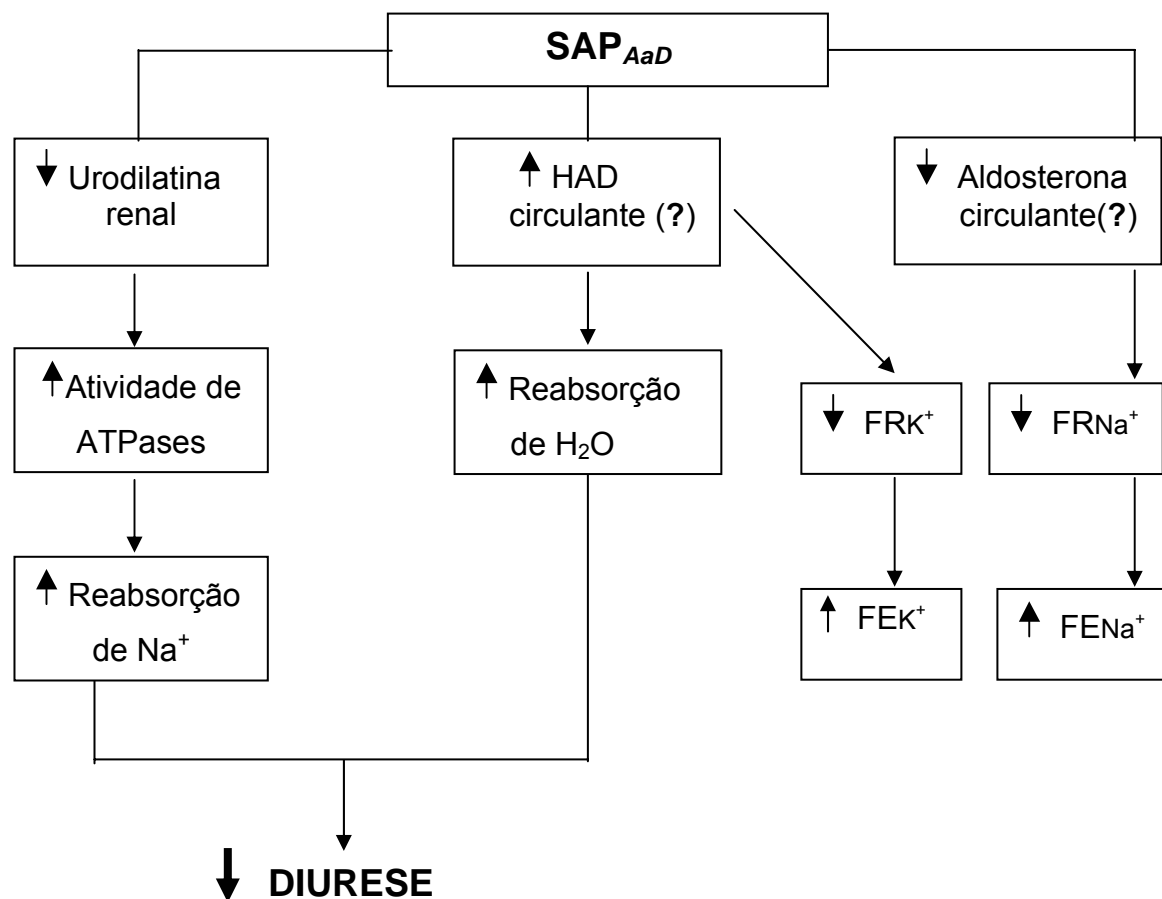


Figura 19. Provável(is) mecanismo(s) pelo(s) qual (is) as SAP_{AaD} podem diminuir a produzir antidiurese. FR, fração de reabsorção; FE, fração de excreção.

7.CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

7.1 O extrato bruto das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (EB_{AaD}) aumenta a diurese em ratos submetidos à expansão isosmótica de volume.

7.2 Ao contrário do EB_{AaD} , as saponinas dele isoladas (SAP_{AaD}) reduz a diurese em ratos submetidos a expansões iso e hiposmótica de volume. Além disso, na expansão isosmótica, as SAP_{AaD} :

- a) aumentaram a reabsorção de água, evidenciada por um “clearance” de água livre mais negativo;
- b) aumentaram a excreção de Na^+ e K^+ .

7.3 O efeito antidiurético das SAP_{AaD} pode estar relacionado, pelo menos em parte, com:

- a) uma redução dos níveis renais de urodilatina;
- b) aumento da atividade de ATPases renais, principalmente, a Na^+ ATPase.

7.4 O efeito diurético da furosemida é abolido pelas SAP_{AaD} , provavelmente, por inibir ATPases renais.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI, Z.A.; TATE, J.; HUNSBERGER, S.; KLEIN, H.; TRACHEWSKY, D.; KEISSER, H.R. Pharmacokinetics of ANP and urodilatin during CANF receptor blockade and neutral endopeptidase inhibition. *American Journal Physiologic*, v.263, p.870-876, 1992.

ABE, H.; ORITA, M.; HONISHI, H.; ARICHI, S.; ODASHIMA, S. Effects of saikosaponin-d on aminonucleoside nephrosis in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.120, p.171-178, 1986.

AFONNE, O.J.; ORISAKWE, O.E.; DIOKA, C.E.; OBI, E.; EZEJIOFOR, T.; ASOMUGHA, L.; UKOHA, U. Effects of rinbacin extract on rat kidney. *Biol. Pharm. Bull*, v.25, p.1022-1025, 2002.

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; BOUWMEESTER, H.J. Volatile science? Matabolic rmgineering of terpenoids in plants. *TRENDS in Plant Science*, v.10, p. 594-602, 2005.

AKERELE, O. The word health organization tradicional medicine programme: policy and implementation. *International Tradicional Medicine Newsletter*, v.1, p.1-3, 1985.

ALAOUI, K.; BELABBES, M.; CHERRAH, Y.; HASSAR, M.; CHARROUF, Z.; AMAROUCHE, H.; ROQUEBERT, J. Acute and chronic toxicity of saponins from *Argania Spinosa*. *Ann Pharm Fr*, v. 56, p. 213-219, 1998.

ALBORNOZ, A. *Productos Naturales: Sustnacias y drogas extraidas das plantas*. Caracas: Publicaciones Universidad Central de Venezuela, 1980, v. 1, cap 1, p.10-25.

AL-QARAWI, A.A.; ABDEL-RAHMAN, H.A.; ALI, B.H.; EL MOUGHY, S.A. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) and the adrenal-kidney-pituitary axis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.40, p.1525–1527, 2002.

AMORIM, J.B.; MALNIC, G. V₁ receptors in luminal action of vasopressin on distal K⁺ secretion. *American Journal of Physiology*, v.278, p.809-816, 2000.

ANAND-SRIVASTAWA, M.B.; TRACHTE, G.J. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacology Review*, v.45, p.455-497, 1993.

ARBER, A. Herbs: their origin and evolution. A Chapter in the history of botanic. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

BANKIR, L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V_{1a} and V₂ receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*, v.51, p.372-390, 2001.

BARLET-BAS, C.; KHADOURI, C.; MARSY, S., DOUCET, A. Enhanced intracellular sodium concentration in kidney cells recruits a latent pool of Na-k-ATPase whose size is modulated by corticosteroids. *Journal of Biological Chemistry*, v.265, p.7799-7803, 1990.

BECKER, B.N.; GREENE, J.; JAMES, E.; GEOFF, C.; STONE, W.J. Ginseng-induced diuretic resistance. *The Journal of American Medical Association*, v.276, p.606-607, 1996.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med.Sci.Monit*, v.8, p.A39-A52, 2002.

BESTLE, M.H.; BIE, P. Renal effects of urodilatin and atrial natriuretic peptide in volume expanded conscious dogs. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.149, p.77-83, 1993.

BESTLE, M.H.; OSLEN, N.V.; CHRISTENSEN,P.; JENSEN, B.V.; BIE, P. Cardiovascular, endocrine, and renal effects of urodilatin in normal humans.The American Journal Physiological, v.276, p.684-695, 1999.

BEVEVINO, L.H.; MELLO AIRES, M. Effects of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Wild. II. Effect on glomerular filtration rate and renal tubular function of rats.Journal of Ethnopharmacology, v.43, p.203-207, 1994.

BISWAS, S.; MURUGESAN, T.; MAITI, K.; GHOSH, L.; PAL, M.; SAHA, B.P. Study on the diuretic activity of *Strychnos potatorum* Linn. Seed extract in albino rats. Phytomedicine, v.8, p. 469-471, 2004.

BLANCO, G; MERCER, R.W. Isozymes of the NA-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. American Journal Physiology, v.275, p.633-650, 1998.

BLOT-CHABAUD, M.; WANSTOK, F.; BONVALET, J.P.; FARMAN, N. Cell sodium-induced recruitment of Na⁺- K⁺- ATPase pumps in rabbit cortical collecting tubules is aldosterone-dependent. The Journal of Biological Chemistry, v.265, p.11676-11681, 1990.

BRANDÃO, M.G.L. Estudo Químico da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, planta utilizada na Amazônia como preventivo da malária. In: PhD tesis, Univerdidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991, p.281.

BRANDÃO, M.G.L.; DUBOIS, M.A.L.; TEXEIRA, M.A.; WAGNER, H. A dammarane-type saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*.Phytochemistry, v.34, p. 1123-1127, 1993.

BRANDÃO, M.G.L.; DUBOIS, M.A.L.; TEXEIRA, M.A.; WAGNER, H. Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*.Phytochemistry, v.31, p.352-354, 1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

BROCK, W.J.; TROCHIMOWICZ, H.J.; MILLISCHER, R.J.; FARR, C.; KAWANO, T.; RUSCH, G.M. Acute and subchronic toxicity of 1,1-dichloro-1-fluoroethano (HCFC-141b). *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, p.483-490, 1995.

BRUNETON, J. Triterpenes and Steroids. In: BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Londres: Intercept Ltd, 1999. v.2, cap. X, p. 661-719.

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P.M.L.; OKAMOTO, Y.; MASAKI, T.; MBWAMBO, Z.; APERS, S.; GUPTA, M.P.; PIETERS, L.; VANQUELIN, G.; VLITINEK, A. Evolution of bioactive saponins and triterpenoidal aglycons for their binding properties on human endothelin ET_A and Angiotensin AT₁ receptors. *Phytotherapy Research*, v.18, p.729-736, 2004.

CARRANZA, M.L.; ROUSSELOT, M.; CHIBALIN, A.V.; BERTORELLO, A.M; FAVRE, H.; FÉRAILLE, E. Protein Kinase A induces recruitment of active Na⁺,K⁺-ATPase units to the plasma membrane of rat proximal convoluted tubule. *Journal of Physiology*, v.511, p.235-243, 1998.

CARUSO-NEVES, C.; COELHO-SOUZA, S.A.; VIVES, D.; GOES, G.; LARA, L.S.; LOPES, A.G. Modulation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg²⁺, MgATP and furosemide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.34, p.1586-1593, 2002.

CARUSO-NEVES, C.; VIVES, D.; DANTAS, C.; ALBINO, C.M.; FONSECA, L.M.; LARA, L.S.; ISO, M.; LOPES, A.G. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of the proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1660, p.93-98, 2004.

CASTRO, J.L. Teoria e prática conforme a naturopatia: Medicina Vegetal. Rio de Janeiro: Publicações Europa América, 1981. v.2, p.373.

CHANDEL, R.S.; RASTOGI, R.P. Triterpenoid saponins and sapogenins: 1973-1978. *Phytochemistry*, v.19, p.1889-1908, 1980.

CHARKRABORTY, A.; BRANTNER, A.; MUKAINAKA, T.; NOBUKUNI, Y.; KUCHIDE, M.; KONOSHIMA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters*, v.177, p.1-5, 2002.

CHEN, M.; SU, M.; ZHAO, L.; JIANG, J.; LIU, P.; CHENG, J.; LAI, Y.; LIU, Y.; JIA, W. Metabonomic study of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Proteome Research*, v.5, p.995-1002, 2006.

COGAN, M.G. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *The American Journal Physiological*, v.250, p.710-714, 1986.

COGAN, M.G. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *American Journal Physiologic*, v.250, p.F710-F714, 1986.

COHEN, D. et al. Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p.9863-9869, 1996.

CONN, J.W.; ROVNER, D.R.; COHEN, E.L. Licorice-induced pseudoaldosteronism. Hypertension, hypokalemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity. *The Journal of the American Medical Association*, v. 205, p. 492 – 496, 1968..

CRUZ, G.L. Livro verde das plantas medicinais e industriais brasileiras. Belo Horizonte: Editora universitária UFMG, 1965. v.1,p. 43-47.

DE BOLD, A.J.; BORENSTEIN, H.B.; VERESS, A.T. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sciences*, v.28, p.94-98, 1981.

DEL CASTILLO, J.R.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.692, p.61-68, 1982.

DESCHÊNES, G.; DOUCET, A. Collecting duct Na⁺/K⁺-ATPase activity is correlated with urinary sodium excretion in rat nephritic syndromes. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.11, p.604-615, 2000.

DILLINGHAM, M.A.; ANDERSON, R.J.; Inhibition of vasopressin action by natriuretic factor. *Science*, v.231, p. 395-397, 1986.

DIWAN, F.H.; ABDEL-HASSAN, I.A.; MOHAMMED, S.T. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. *Eastern Mediterranean Health Journal*, v.6, p.345-351, 2000.

DJELIDI, S. et al. Vasopressin stimulates long-term net chloride secretion in cortical collecting duct cells. *Federation of European Biochemical Societies*, v.460, p.533-538, 1999.

DRAPER, N.; STEWART, P.M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *The Journal of Endocrinology*; v.186, p. 251-271, 2005.

DRUMMER, C.; FIEDLER, F.; BUD, A.; KLEEFELD, D.; DIMITRIADES, E.; GERZER, R.; FORSSMANN, W.G. Development and application of a urodilatin (CCD/ANP-95-126)-specific radioimmunoassay. *Pflugers Arch*, v.423, p.372-377, 1993.

EAKLE, K.A.; LYU, R.M.; FARLEY, R.A. The influence of β subunit structure on the interaction of Na^+/K^+ ATPase complexes with Na^+ . A Chimeric β subunit reduces the Na^+ dependence of phosphoenzyme formation from ATP The Journal of Biological Chemistry, v. 270, p. 13937-13947, 1995.

EAKLE, K.A.; M.A. KABALIN, S.G.; WANG.; FARLEY, R.A. The influence of β subunit structure on the stability of Na^+/K^+ ATPase complexes and interaction with K^+ . The Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 6550-6557, 1994.

EATON, D.C.; POOLER, J.P. Fisiologia Renal de Vander. In: EATON, D.C.; POOLER, J.P. Fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular. Porto Alegre : Artmed, 6 ed. cap. 2, p.37-51, 2006.

ELALOUF, J.M.; ROINEL, N.; ROUFFIGNAC, C. Effects of antidiuretic hormone on electrolytes reabsorption and secretion in distal tubules of the rat kidney. Pfluegers Archiv, v.401, p.167-173, 1973.

EMERY, A.M.; BILLINGSLEY, P.F.; READY, P.D.; DJAMGOZ, M.B.A. Insect Na^+/K^+ -ATPase. Journal of Insect Physiology, v.44, p.197-209, 1998.

ESPINER, E.A.; RICHARDS, A.M.; YANDLE, T.G.; NICHOLLS, MG. Natriuretic hormones. Endocrinol Metab Clin North Am, v.24, p. 481-509, 1995.

EWART, H.S.; KLIP, A. Hormonal regulation of the Na^+/K^+ -ATPase: mechanism underlying rapid and sustained changes in pump activity. The American Journal of Physiology, v.269, p. C295-311, 1995.

FELLER, S.M.; SCHULTZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, W.G. The Kidney, a paracrine, urodilatin-producing organ. Circulation, v.78, p.429, 1988.

FIELD, M.J.; STANTON, B.A.; GIEBISCH, G.H. Influence of ADH on renal potassium handling: a micropuncture and microperfusion study. Kidney International, v.25, p.502-511, 1984.

FLECK, C. Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances. *Physiological Research*, v.48, p.267-279, 1999.

FLYNN, T.G.; DE BOLD, M.L.; DE BOLD, A.J. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.117, p.859-865, 1983.

FORSLUND, T.; FUHRQUIST, F.; FROSETH, B.; TIKKANEN, I. Effects of licorice on plasma atrial natriuretic peptide in healthy volunteers. *J.Intern.Med*, v.225, p.95-99, 1989.

FORSSMANN, W.; MEYER, M.; FORSSMANN, K. The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovascular Research*, v. 51, p. 450-462, 2001.

FORSSMANN, W.G.; RITCHER, R.; MEYER, M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochemistry Cell Biology*, v.110, p. 335-357, 1998.

FUNDER, J.W.; PEARCE, P.T.; SMITH, R.. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, v. 242, p. 583-585, 1988.

GARVIN, J.L. ANF inhibits norepinephrine-stimulated fluid absorption in rat proximal straight tubule. *American Journal of Physiology*, v. 263, p.581-585, 1992.

GEGELMANN, M.; HOCK, D.; ORSSMANN, W.G. Urodilatin (CCD/ANP-95-126) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide/cardiodilatin (α -hANP/CDD-99-126). *FEBS Letter*, v.233, p.249-254, 1988.

GERMONPREZ, N.; MAES, L.; PUYVELDE, L.V.; TRI, M.V.; TUAN, D.A.; DE KIMPE, N. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-Leishmanial Activity of Triterpenoid Saponins Isolated from *Maesa balansae* and Some Chemical Derivatives. *J. Med. Chem*, v.48, p.32-37, 2005.

GESTETNER, B.; BIRK, Y.; TENCER, Y. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.16, p.1031-1035, 1968.

GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, v.196, p.952-955, 1962.

GOLDFARB, A.M.A. *Da alquimia à química*. São Paulo: Nova Estella-EDUSP, 1988. v.1, cap.2, p.110.

GONIN, S. et al. Cyclic AMP increases cell surface expression of functional Na,K-ATPase units in mammalian cortical collecting duct principal cells. *Molecular Biology of the Cell*, v.13, p.255-264, 2001.

GOOD, D.W.; WRIGHT, F.S. Luminal influences on potassium secretion: sodium concentration and fluid flow rate. *American Journal of Physiology*, v.236, p.192-205, 1979.

GOETZ, K.L. Renal natriuretic peptide (urodilatin?) and atriopeptin: evolving concepts. *American Journal of Physiology*, v.261, p. F921-932, 1991.

GRUBMEYER, C.; PENEFSKY, H. S. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphate. *Journal Biological Chemistry*, v.261, p. 3718-3727, 1981.

GUTKOWSKA, J.; *et al.* Circulating Forms and radioimmunoassay of Natriuretic Factor. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v.16, n.1, p.183-198, 1987.

HALOUI, M.; LOUEDEC, L.; MICHEL, J.B.; LYOUSSI, B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. Journal of Ethnopharmacology, v.71, p.465-472, 2000.

HAN, S.; ZHENG, Z.; REN, D. Effect of *Salvia miltiorrhiza* on left ventricular hypertrophy and cardiac aldosterone in spontaneously hypertensive rats. J huazhong Uni Sci Technolog Med Sci, v.22, p.302-304, 2002.

HARRIS, P.J.; THOMAS, D.; MORGAN, T.O. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. Nature, v. 326, p.697-698, 1987.

HARUNA, M.; TANAKA, M.; SUGIMOTO, T.; KOJIMA, R.; SUZUKI, Y.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; ITO, K. Alteration of Na⁺ permeability in human erythrocytes as studied by ²³Na-NMR and inhibition of the kidney Na⁺,K⁺-ATPase activities with saponins: Interaction of *Gleditsia* saponins with human erythrocyte membranes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.5, p.827-830, 1995.

HERRERA-ARELLANO, A.; FLORES-ROMERO, S.; CHÁVEZ-SOTO, M.A.; TORTORIELLO, J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. Phytomedicine, v.11, p. 375-382, 2004.

HILDEBRANDT, D.A.; MIZELLE, H.L.; BRANDS, M.W.; HALL, J.E. Comparison of renal actions of urodilatin and atrial natriuretic peptide. American Journal Physiological, v.262, p.395-399, 1992.

HOUILLIER, P.; BLANCHARD, A.; PAILLARD, M.; Metabolism of the potassium. EMC-Endocrinologie, v.1, p.138-157, 2004.

INOUE, T.; NONOGUCHI, H.; TOMITA, K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. Cardiovascular Research, v.51, p.470-480, 2001.

JONES, P.V. Mito, Filosofia e Medicina/ Os médicos gregos. In: FONTES, M. O mundo de Antenas. São Paulo, 1997. p. 285-90 e 193-5.

JORGENSEN, P.L.; SKOU, J.C.H.R. Purification and Characterization of (Na⁺ - K⁺)-ATPase: The influence of detergents on the activity of (Na⁺-K⁺)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.233, p.366-380, 1971.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators B*, v.88, p.101-105, 2003.

KIM, D.S.; OH, S.R.; LEE, I.S.; JUNG, K.Y.; PARK, J.D.; KIM, S.L.; LEE, H.K. Anticomplementary activity of ginseng saponins and their degradation products. *Phytochemistry*, v.47, p.397-399, 1998.

KIROYTCHEVA, M.; CHEVAL, L.; CARRANZA, M.L; MARTÍN, P.Y.; FAVRE,H.; DOUCET, A.; FERAILLE, E. Effect os cAMP on the activity and phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kidney International*, v.55, p.1819-1931, 1999.

KISHIMOTO, J.; DUBOIS, S.K.; GARBERS, D.L. The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl ciclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response expansion. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, v.93, p.6215-6219, 1996.

KNEPPER, M.A.; LANKFORD, S.P.; TERADA, Y. Renal Tubular actions of ANF. *Canadian Journal Physiol Pharmacol*, v.69, p.1537-1545, 1991.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.Ç FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and Malaria or plants randomly selected: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.1033-1042, 2001.

KREYDIYYEH, S.I.; USTA, J. Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, p. 353-357, 2002.

KREYDIYYEH, S.I.; USTA, J.; KNIO, K.; MARKOSSIAN, S.; DAGHER, S. Anised oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat. *Life Sciences*, v.74, p. 663-673, 2003.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, v.2, p. 363-386, 1996.

LEVIN, E.R.; GARDINER, D.G.; SAMSON, W.K. Natriuretic peptides. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p.321-328, 1998.

LINGREL, J.B.; KUNTZWELLER, T. Na⁺, K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 19659-19662, 1994.

LUNA, L. G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3 ed. New York: mac Graw Hill, p.258, 1968.

MA, J.; PENG, A.; LIN, S. Mechanisms of the therapeutic effect os *Astragalus membranaceus* on sodium and water retention in experimental heart failure. *Chin Med J*, v.111, p.17-23, 1998.

MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, v.27, p.3037-3067, 1988.

MERCER, R.W. Structure of the Na,K-ATPase. *International Review of cytology*, v. 137, p. 139-168, 1993.

MEYER, M. et al. Urodilatin is involved is sodium homeostasis and exerts sodium-state-dependent natriuretic and diuretic effects. *American Journal Physiological*, v.271, p.489-497, 1996.

MEYER, N.B.; BRANDÃO, M.G.L.; VIEIRA, M.A.R. Efeito do extrato bruto da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (cerveja de índio) sobre a diurese em ratos acordados mantidos em gaiolas metabólicas. In: XI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002, Belo Horizonte, Minas Gerais.

MORETI, R.; MARTÍN, M.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARÍN, R. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Biochemistry Physiology*, v.98B, p.623-626, 1991.

NICCO, C.; WITTNER, M.; DISTEFANO, A.; JOUNIES, S.; BANKIR, L.; BOUBY, N. Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat collecting duct. *Hypertension*, v. 38, p.1143-1149, 2001.

NIELSEN, S.; CHOU, C.L.; MARPLES, D. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Aca Sci USA*, v.92, p.1013-1017, 1995.

NONOGUCHI, H.; SANDS, J.M.; KNEPPER, M.A. ANF inhibits NaCl and fluid absorption in cortical collecting duct of rat kidney. *The American Journal of Physiology*, v.256, p. F179-186, 1989.

NUSSENSZVEIG, D.R.; LEWICKI, J.A.; MAACK, T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J. Biol. Chem.* v.265(34), p20952-81990, 1990.

OLESZEK, W. Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*) saponin haemolysis and its impacts on two haemolysis-based quantification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.53, p.477-485, 1990.

OLESZEK, W.; JURZYSTA, M.; PLOSZYNSKI, M.; COLQUHOUN, I.J.; PRINCE, K.R.; FENWICK, G.R. Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.191-196, 1992.

ORLANDI, O.; VERNLOET, A.E. Homeopatia ou Alopattia. Rio de Janeiro: Marco Zero, 1983. v.1, p.37-44.

OSORE, H. A Na⁺-activated Mg²⁺-dependent renal adenosine triphosphatase (Na⁺-ATPase) sensitive to aldosterone. *Biochemical Pharmacology*, v. 28, p.2865-2866, 1979.

PAULINO-FILHO, H.F.; GOTTLIEB, H.E.; TOMIKA, K.; GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M.; LEMONICA, J.P. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke- Rhamnaceae. In: I Encontro Regional de Química, 1979, São Carlos, São Paulo.

PARACELSO. Plantas Mágicas Edição revista. Rio de Janeiro: Ed. Hemus Ltd, 2005. v.1, p 5-243.

PINHEIRO SOBRINHO, J.M.; GRANDI, T.S.M. Plantas diuréticas. Rio de Janeiro: Oréades, 1978. v.11, p.26-42.

PRINCE, K.R.; JONHSON, I.T.; FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *CRC Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, v.26, p.27-135, 1987.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. *et al.* AFIP laboratory Methods In Histotechnology. Washington: Am. Registry of Pathology, p.278, 1992.

PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. the "second" sodium pump and cell volume. *Curr. Top. Membr. Transp*, v.34, p.105-120, 1989.

PROVÉRIBIO, F.; CONDRESCU-GUIDI, M.; WHITTEMBURY, G. Ouabain insensitive Na⁺-stimulation of an Mg²⁺-dependent ATPase in the kidney tissue. *Biochimica et biophysica acta*, v. 394, p.281-292, 1975.

PROVERBIO, F.; PROVERBIO, T.; MARÍN, R. Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺ + K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.858, p.202-205, 1986.

PROVÉRBIO, F.; DEL CASTILLO, J.R. Na⁺- stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.646, p.99-108, 1981.

PUSCHETT, J.B. Sites and Mechanisms of action of diuretics in the kidney. *J Clin Pharmacol*, v.21, p.564-574, 1981.

RHIOUANI, H.; SETTAF, A.; LYOUSSI, B.; CHERRAH, Y.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; HASSAR, M. Effects of saponins from *herniaria glabra* on blood pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Therapie*, v.54, p.735-739, 1999.

RIDDLE, J.M. *Dioscorides on Pharmacy and Medicine*. Austin: University of Texas Press, 1985.

RITTER, D.; NEEDLEMAN, P.; GREENWALD, J.E. Synthesis and secretion of an atriopeptin-like protein in rat kidney cell culture. *Journal Clinical Invest*, v.87, p.208-212, 1991.

RUSKOAHO, H. *et al.* The phorbol ester induced atrial natriuretic peptide secretion is stimulated by Forskolin and Bay K8644 and inhibited by 8-Bromo-cyclic GMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 139, p. 266-274, 1986.

SAHOT, T.; COHEN, H.T.; KATZ, A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase: Role of cyclic AMP and Phospholipase A₂. *J. Clin. Invest*, v.89, p.1496-1500, 1992.

SAHOT, T.; COHEN, H.T.; KATZ, A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase: Role of Eicosanoids. *J. Clin. Invest*, v.91, p.409-415, 1993.

SAKAMOTO, M. et al. Existence of atrial natriuretic polypeptide in kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.128, p.1281-1287, 1985.

SANDS, J.M.; NONOUGUCHI, H.; KNEPPER, M.A. Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *American Journal Physiology*, v.253, p.823-832, 1987.

SCHAFFER, J.A.; HAWK, C.T. Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids. *Kidney International*, v.41, p.255-268, 1992.

SCHAFFER, J.A.; TROUTMAN, S.L. cAMP mediates the increase in apical membrane Na⁺ conductance produced in the rat CCD by vasopressin. *The American Journal of Physiology*, v.259, p. F823-831, 1990.

SCHAFFER, J.A.; TROUTMAN, S.L. Effect of ADH on rubidium transport in isolated perfused rat cortical collecting tubules. *American Journal of Physiology*, v.250, p.1063-1072, 1986.

SCHULZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, K.; HERBST, F.; HOCK, D.; PIPKORN, R.; FORSSMANN, W.G. Isolation and structural analysis of urodilatin, a new peptide of the cardiolatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klinische Wochenschrift*, v.66, p.752-759, 1988.

SCHULZ-KNAPPE, P.; HONRATH, U.; FORSSMANN, W.G.; SONNENBERG, H. Endogenous natriuretic peptides: effects on collecting duct function in rat kidney. *Electrolyte Physiology*, v.28, p.F415-418, 1990.

SCHWINGER, R.H.G.; BUNDGAARD, H.; MULLER-EHMSSEN, J.; KJELDSEN, K. The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovascular Research*, v.57, p.913-920, 2003.

SEGURO, A.C.; KUDO, L.H.; HELOU, C.M.B. Função tubular. In: RIELLA, M.C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2003. v.4, cap.4, p. 37-48.

SEMPPLICINI, A. et al. Ouabain-inhibiting activity of aldosterone antagonists. *Steroids*, v.60, p.110-113, 1995.

SOKAR, Z.; GADHI, C.A.; BENHARREF, A.; JANA, M. Toxic effect of *Herniaria cinerea* DC. On the stomach, intestine, lung, and kidney of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.88, p.149-153, 2003.

SOMOVA, L.O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, v.10, p.115-121, 2003.

SOUZA, A.M. et al. Modulation of sodium pumps by steroidal saponins. *Z.Naturforschung*, v.59c, p.432-436, 2004.

SRIPANIDKULCHAI, B.; WONGPANICH, V.; LAUPATTARAKASEM, P.; SUWANSAKSRI, J.; JIRAKULSOMCHOK, D. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.75, p.185-190, 2001.

STEWART, P.M.; MURRY, B.A.; MASON, J.I. Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 79, p. 480-484, 1994.

THERIEN, G.R.; GOLDSHLEGER, S.J., KARLISH, D.; BLOSTEIN, R. Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.32628-32634, 1997.

TOMITA, K.; OWADA, A.; IINO, Y.; YOSHIYAMA, N.; SHIIGAI, T. Effect of vasopressin on Na⁺- K⁺- ATPase activity in rat cortical collecting duct. The American Physiological Society, v. 253, p.874-879, 1987.

VALTIN, H.; SCHAFFER, J.A. Tubular reabsorption. In: VALTIN, H.; SACHAFER, J.A. Renal function. New York: Little, Brown and Compaby, 1995. v, 3, p.62-82.

VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v.17, p.471-503, 2003.

WALL, M.E.; EDDY, C.R.; McCLENNAN, M.L.; LJUMPP, M.E. Detection and estimation of steroidal sapogenins in plant tissue. Analytical Chemistry, v.24, p.1337-1341, 1952.

WANG, W.; GIEBISCH, G. Dual modulation of renal ATP-sensitive K⁺ channel by protein kinase A and C. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, v.88, p.9722-9725, 1991.

WHITE, P.C.; MUNE, T.; AGARWAL, A.K. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. Endocrine Reviews, v.18, p. 135 -156, 1997.

WHITTEMBURY, G.; PROVERBIO, F. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. Pflugers Arch, v.316, p.1-25, 1970.

WOJCIKOWSKI, K.; JOHSON, D.W.; GOBE, G. Medicinal herbal extracts – renal friend or foe? Part one: The toxicities of medicinal herbs. Nephrology, v.9, p.313-318, 2004.

YANG, Z.G.; SUN, H.X.; FANG, W.H. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine, v.23, p.5196-5203, 2005.

YIN, X.; ZHANG, Y.; WU, H.; ZHU, X.; ZHENG, X.; JIANG, S.; ZHUO, H.; SHEN, J.; LI, L.; QIU, J. Protective effects of *Astragalus* saponin I on early stage of diabetic nephropathy in rats. *Journal of Pharmacology Sciences*, v.95, p.256-266, 2004.

YUNES, R.A.; FILHO, V.C. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. Santa Catarina: Argos editora, 2001. v.1. cap1, p.19-24.

ZEIDEL, M.I. Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *American Journal Physiologic*, v.265, p.F159-F173, 1993.