

**Caracterização bioquímica e funcional de
frações hemaglutinantes da peçonha do peixe-
escorpião *Scorpaena plumieri***

Helena Bulhões Fiorotti

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, abril de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA
AO TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2018132291

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado intitulada "Caracterização bioquímica e funcional de frações hemaglutinantes da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*", apresentada e defendida publicamente pela aluna Helena Bulhões Fiorotti, no dia 03 de abril de 2020, às 14h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 03 de abril de 2020.

Prof.^a Dr.^a Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr.^a Fabiana Vasconcelos Campos
Universidade Federal do Espírito Santo – Co-orientadora

Prof.^a Dr.^a Suely Gomes Figueiredo
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele fez e faz em minha vida; por ter me permitido chegar até aqui; por cada pessoa que Ele colocou em meu caminho; por todas as bênçãos a mim concedidas. Essa conquista só foi possível graças ao amor que o meu Senhor tem por mim e eu por Ele.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e sempre me deram suporte para que eu pudesse lutar e conquistar os meus sonhos.

Aos meus avôs e avós, pelas incessantes orações e por tudo que representam pra mim.

À minha afilhada, Shurya, por ter dado um novo sentido pra minha vida e por me apresentar o amor de uma forma completamente nova e indescritível.

Ao meu companheiro de vida, Vinícius, por me incentivar e nunca me deixar desistir dos meus sonhos, mesmo diante de todas as dificuldades. Por acreditar em mim mais do que eu mesma. Por todo cuidado e carinho que sempre teve comigo e por toda a felicidade que trouxe para a minha vida.

Às minhas orientadoras, Dr^a Suely e Dr^a Fabiana, por tudo que fizeram por mim durante esses dois anos no Laboratório de Química de Proteínas. Obrigada pela confiança, por acreditarem no meu potencial e por terem me auxiliado tanto nessa caminhada. Saibam que toda a paciência e carinho, todos os ensinamentos - que vão além da ciência -, eu levarei para sempre comigo. Vocês são muito mais do que apenas orientadoras!

A todos os colegas cientistas que me ajudaram durante essa jornada. Em especial, à Thamires (melhor IC que a UFES já teve!), Thiago Menezes, Prof^a Juliana Coitinho, Prof^a Cristina Martins e colegas de pós-graduação.

Aos colaboradores deste trabalho – Dr^a Alessandra Matavel, M.e. Thiago Soares, Dr. Leonardo dos Santos - que cederam seu tempo, laboratório e paciência para me ajudar na realização de alguns dos experimentos.

A Alice Nogueira da Gama, por gentilmente financiar as impressões desse trabalho. Eu nunca irei esquecer tamanha generosidade e bondade que você teve comigo. O mundo precisa de mais pessoas como você! Serei eternamente grata por sua atitude e pela confiança no meu trabalho.

Ao Mário, parceiro querido sempre disposto a coletar os espécimes de peixe-escorpião, tornando assim, esse e os demais trabalhos do nosso grupo de pesquisa possíveis.

A todos os meus amigos e familiares em geral que contribuíram de alguma para que eu chegasse até aqui.

A CAPES e Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Peçonhas animais	13
1.1.1 Peixes peçonhentos	15
1.1.2 Caracterização química das peçonhas de peixes	17
1.4 Lectinas	18
1.4.1 Lectinas animais	22
2. OBJETIVOS	27
2.2 Objetivo geral	27
2.3 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais e aspectos éticos	28
3.2 Obtenção da peçonha	29
3.3 Dosagem de proteínas	30
3.4 Purificação de frações hemaglutinantes	30
3.4.1 <i>Atividade hemaglutinante</i>	30
3.4.2 <i>Primeira etapa de purificação: precipitação salina</i>	31
3.4.3 <i>Segunda etapa de purificação: cromatografia de filtração molecular</i>	31
3.5 SDS-PAGE	32
3.6 Caracterização química	32
3.6.1 <i>Dicroísmo circular</i>	32
3.6.2 <i>Ensaio de estabilidade da atividade hemaglutinante</i>	33
3.6.3 <i>Ensaio de avaliação da atividade hemaglutinante na presença de carboidratos e EDTA</i>	33
3.7 Caracterização funcional	33
3.7.1 <i>Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	33
3.7.2 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	34
3.7.3 <i>Ensaio de atividade Edematogênica</i>	35
3.7.4 <i>Ensaio de reatividade vascular</i>	35
4. RESULTADOS	38
4.1 Purificação de frações hemaglutinantes	38
4.1.1 <i>Primeira etapa de purificação: precipitação salina</i>	38
4.1.2 <i>Segunda etapa de purificação: cromatografia de filtração molecular</i> ...39	39

4.2 Caracterização química	41
4.2.1 <i>Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de diferentes espécies</i>	41
4.2.2 <i>Estabilidade da atividade hemaglutinante</i>	41
4.2.3 <i>Dicroísmo circular</i>	42
4.2.4 <i>Especificidade da atividade hemaglutinante</i>	44
4.3 Caracterização funcional	44
4.3.1 <i>Concentração inibitória mínima (CIM) antimicrobiana</i>	44
4.3.2 <i>Viabilidade celular</i>	45
4.3.3 <i>Atividade Edematogênica</i>	46
4.3.4 <i>Reatividade vascular</i>	47
5. DISCUSSÃO	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS	60
9. ANEXOS	68
Anexo I – Resumos apresentados no “X Simpósio da pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan”.....	68
Anexo II – Artigo submetido à revista Toxicon.....	71
Anexo III – Estágio realizado na Fundação Ezequiel Dias.....	72

LISTA DE TABELAS/QUADROS

QUADRO 1: Proteínas purificadas de peçonhas de peixes.....	20
TABELA 1: Rendimento e CMH das frações hemaglutinantes.....	42
TABELA 2: Estabilidade da atividade hemaglutinante das amostras FH1 e FH3, após armazenamento em várias temperaturas.....	41
TABELA 3: Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos e EDTA.....	44
TABELA 4: Atividade antimicrobiana de FH1 e FH3 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proteínas isoladas de venenos animais.....	15
Figura 2: Peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	16
Figura 3: Alguns dos principais tipos de lectinas animais.....	23
Figura 4: Extração da peçonha.....	29
Figura 5: Fluxograma do processo de purificação das frações hemaglutinantes da peçonha bruta (Sp-V) do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	38
Figura 6: Segunda etapa de purificação: perfil cromatográfico da filtração molecular da fração P15.....	39
Figura 7: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha bruta de <i>Scorpaena plumieri</i> e das frações obtidas nas etapas de purificação.....	40
Figura 8: Atividade hemaglutinante da fração P15 em eritrócitos de diferentes espécies.....	41
Figura 9: Dicroísmo circular de FH1 e FH3.....	43
Figura 10: Efeito das amostras FH1 e FH3 na viabilidade celular em linhagens de células (CHO, HEK, RAW, HeLa, RKO, C6 E Neuro2A.	45
Figura 11: Atividade edematogênica das frações hemaglutinantes FH1 e FH3.....	45
Figura 12: Efeitos de FH1 e FH3 na reatividade vascular em anéis isolados de aorta de ratos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMH	Concentração Mínima Hemaglutinante
CRDs	Domínios de reconhecimento de carboidrato
CTLDs	Domínios semelhantes às lectinas do tipo C
DMEM	Meio água modificado da Dubelcco
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
i.p.	Intraperitoneal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
PBS	Tampão fosfato de sódio com salina
FE	Fenilefrina
PSA	Persulfato de amônio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SN	Sobrenadante
Sp-CTx	Toxina citolítica purificada da peçonha de <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-GP	Protease gelatinolítica purificada da peçonha de <i>Scorpaena plumieri</i>

Sp-H	Hialuronidase purificada da peçonha de <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-LC	Lectina tipo C purificada da peçonha de <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-V	Fração solúvel da peçonha bruta de <i>Scorpaena plumieri</i>
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina

RESUMO

Entre várias atividades biológicas relevantes, o veneno do peixe *Scorpaena plumieri* (Sp-V) é conhecido por promover hemaglutinação. Embora se pense que esta atividade esteja associada à presença de lectinas do tipo C no veneno, ela ainda não foi caracterizada, nem quimicamente nem funcionalmente. No presente trabalho, buscamos avançar a caracterização de frações hemaglutinantes associadas a esse veneno. Para isso, o Sp-V foi fracionado por precipitação salina seguida de cromatografia de exclusão por tamanho, resultando na purificação de duas frações - FH1 e FH3 - com atividade aglutinante específica e dependente de Ca^{2+} contra eritrócitos de coelho, mantendo-se estável após o armazenamento em 4 ou -80°C . Uma análise de dicroísmo circular mostrou que ambas as frações apresentaram alta proporção de folhas-beta em suas estruturas secundárias. Constatamos que o FH1 e o FH3 eram bacteriostáticos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, um ensaio de viabilidade à base de resazurina revelou que ambas as frações, em doses de até 370 $\mu\text{g/mL}$, eram citotóxicas contra linhagens de células tumorais e não tumorais. Uma tendência à formação de edema pôde ser detectada quando as frações ativas - particularmente o FH1 - foram injetadas em patas de camundongos, embora sem significância estatística na amostra utilizada. Finalmente, FH1 apresentou efeito vasodilatador concentração-dependente (5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre anéis de aorta torácica de ratos. Acreditamos que nossos dados contribuem para uma melhor compreensão das propriedades biológicas dos venenos de peixes, muitas vezes negligenciados.

Palavras-chave: *Scorpaena plumieri*; veneno de peixe; hemaglutinação; lectinas tipo C.

ABSTRACT

Amongst a number of relevant biological activities, the *Scorpaena plumieri* fish venom (Sp-V) is known to promote hemagglutination. Although this activity is usually assigned to the presence of C-type lectins in the venom, it has not yet been characterized, neither chemically nor functionally. In the present work we sought to advance the characterization of the hemagglutinating fractions associated to this venom. In order to do so, Sp-V was fractionated by saline precipitation followed by size exclusion chromatography, resulting in the purification of two fractions – FH1 and FH3 – with specific and Ca²⁺-dependent agglutinating activity against rabbit erythrocytes, remaining stable upon storage at 4 or -80°C. Circular dichroism analysis revealed that both fractions had a high proportion of beta-sheets in their secondary structures. We found that FH1 and FH3 were bacteriostatic against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), displaying minimum inhibitory concentration (MIC) of 50 and 200 µg/mL, respectively. In addition, a resazurin-based viability assay revealed that both fractions, at doses up to 370 µg/mL, were cytotoxic against tumor and non-tumor cell lines. A tendency towards edema formation was detected when the active fractions – particularly FH1 – were injected into mice footpads. Finally, FH1 promoted a concentration-dependent (5, 10 e 50 µg/mL) vasodilator effect on rat isolated aortic rings in vitro. We believe our data contribute to a better understanding of the biological properties of the so often neglected fish venoms.

Keywords: *Scorpaena plumieri*; fish venom; hemagglutination; type C lectins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peçonhas animais

Animais venenosos estão amplamente difundidos nos diferentes ecossistemas, compreendendo mais de cem mil espécies (Calvete *et al.*, 2009). Esses animais produzem substâncias com ação repelente, paralisante ou com outras ações sobre sistemas biológicos, as quais são utilizadas quando o animal apresenta comportamento de ataque e defesa. Em todos os níveis de escala filogenética, os venenos têm evoluído como poderosos arsenais químicos constituídos de substâncias capazes de atordoar, paralisar ou matar outros organismos, sendo encontrados em animais terrestres como aranhas, serpentes e escorpiões e também em animais aquáticos como águas-vivas, anêmonas e peixes (McCormick e Meinwald, 1993; Lewis e Garcia, 2003).

Dentre os animais venenosos encontram-se os chamados peçonhentos, que apresentam glândulas ou tecidos especializados para a produção e secreção de substâncias tóxicas – a peçonha –, além de um aparato especial para a inoculação destas (Russell, 1996). As peçonhas desempenham papel essencial para o ataque, captura e digestão da presa e ainda contribuem para a defesa do animal contra predadores ou agressores (Russell, 1996). De maneira geral, as peçonhas animais consistem de uma mistura complexa de substâncias de composição química diversificada e variado espectro de ação farmacológica. A maior parte dos componentes de peçonhas são proteínas (toxinas, enzimas, peptídeos), neurotransmissores, ácidos nucléicos, sais, monoaminas, toxinas não-proteicas e outros compostos orgânicos ainda não identificados (Figueiredo, 1995; Mebs, 2002). A composição das peçonhas animais é espécie-específica, além de depender de outros fatores como o gênero, nutrição, habitat natural e condições climáticas (Russell, 1996; Vassilevski, 2009).

Inicialmente, os estudos de peçonhas animais apresentavam um enfoque na busca por meios – terapêuticos - de reduzir sua ação, devido à gravidade e ao grande número de acidentes. O envenenamento pode causar sérias perturbações em vários sistemas fisiológicos: nervoso central e periférico, cardiovascular, neuromuscular, e na coagulação sanguínea (Calvete *et al.*, 2009). Entretanto, nas três últimas décadas, a bioprospecção de peçonhas vem ganhando enorme interesse e destaque no meio

científico pelas potenciais ações farmacológicas e/ou terapêuticas de seus constituintes. Além disto, estes podem servir como instrumentos de investigação de mecanismos moleculares de sistemas fisiológicos e para o desenvolvimento de produtos com bases biotecnológicas.

Nesse sentido, moléculas que compõem venenos e peçonhas animais têm sido usadas como modelos para desenvolvimento de medicamentos, tendo grande destaque na farmacologia contemporânea. As pesquisas sobre a composição de peçonhas como fonte de produtos farmacêuticos avançaram, na segunda metade do século XX após a caracterização de um peptídeo potencializador da bradicinina, isolado a partir da peçonha da *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva, 1949), uma serpente brasileira. Esse peptídeo se tornou o protótipo do primeiro anti-hipertensivo comercial pertencente à classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina: o Captopril®. Um exemplo mais recente de utilização de peçonhas para a geração de fármacos é o analgésico Ziconotide (Prialt®), que possui ação bloqueadora de canais de cálcio (Ca^{2+}) tipo N e foi aprovado em 2004 pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA). Essa droga foi desenvolvida a partir da toxina ω -Conotoxina M-VII-A, isolada do molusco *Conus magus* (McIntosh *et al.*, 1982).

Em relação aos peixes venenosos, um estudo de análise filogenética realizado por Smith & Wheeler (2006) estimou que mais de 1.200 peixes distribuídos em 12 clados podem ser considerados venenosos e foi sugerido que estes animais compreendem mais da metade de todos os vertebrados venenosos. Apesar deste grande número de espécies de peixes venenosos, observa-se que seus venenos têm sido amplamente ignorados (Church e Hodgson, 2002a; Halstead, 1988; Tan *et al.*, 2003). O número de estudos com peçonhas de peixes é muito menor em comparação àqueles com peçonhas de animais terrestres (Figura 1). Esta discrepância pode ser justificada pelos desafios inerentes ao estudo dessas peçonhas, que vão desde a dificuldade da captura dos espécimes (Khoo, 2002), até a extração da peçonha (Schaeffer *et al.*, 1971; Carrijo *et al.*, 2005). Ainda, grande parte das toxinas bioativas destas peçonhas são proteínas termolábeis de alta massa molecular, o que dificulta sua purificação e seu estudo (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a).

Recentemente, alguns trabalhos demonstraram que o muco da pele dos peixes também apresenta moléculas com atividades de interesse farmacológico (Junqueira *et al.*, 2007; Evangelista *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2018). Entretanto,

considerando a carência de informações sobre peçonhas de peixes, estas constituem uma fonte pouco explorada de substâncias bioativas.

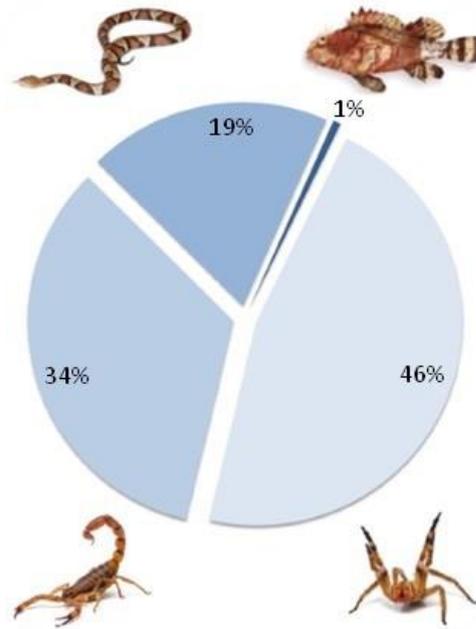


FIGURA 1. PROTEÍNAS ISOLADAS DE VENENOS ANIMAIS. Comparação entre o número de entradas (%) encontradas na base de dados UniProtKB, obtido através da pesquisa de sequências de proteínas de aranhas, escorpiões, serpentes e peixes. Fonte: Campos et al., 2016.

1.1.1 Peixes peçonhentos

Como descrito acima, estima-se que um grande número de peixes venenosos e peçonhentos é encontrado em ambientes de água doce e salgada em todo o mundo. Estes estão frequentemente envolvidos em acidentes humanos e podem causar ferimentos graves. Assim como os venenos de animais terrestres, os de peixes apresentam enorme diversidade e complexidade de componentes farmacologicamente ativos.

Os peixes marinhos mais comumente associados ao envenenamento humano pertencem às famílias: Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae e Rhinopterae (arraias), Ariidae (peixe-gato), Scorpaenidae (peixe-escorpião e peixe-leão), Synanceiidae (peixe-pedra) e Batrachoididae (peixe-sapo - estuarino). Já no ambiente de água doce, os peixes das famílias Pimelodidae e Potamotrygonidae são os mais importantes em relação ao envenenamento (Haddad, 2000). Estes peixes são classificados como peçonhentos, pois possuem estruturas glandulares produtoras de

venenos e aparatos capazes de inocula-los, que podem ser raios de barbatanas, espinhos e dentes (Haddad, 2000).

A espécie *Scorpaena plumieri* é uma das mais comuns da costa brasileira (Figueiredo e Menezes, 1980; Carvalho-Filho, 1999), ocorrendo também na Flórida, Golfo do México, Bahamas, Caribe e Bermudas (Humann, 1994). É considerada a mais venenosa da costa brasileira e é popularmente conhecida como mangangá, niquim-de-pedra e mamangava (Haddad *et al.*, 2003). Os animais desta espécie têm o hábito de permanecer imóveis e parcialmente escondidos por longos períodos de tempo e são comumente encontrados dentro ou perto de rochas, recifes de coral ou algas marinhas, nos quais costumam se camuflar de maneira muito eficaz (Russell, 1965; Schaeffer *et al.*, 1971; Khoo, 2002), o que facilita a ocorrência de acidentes (Haddad Jr., 2000).

Assim como os demais peixes peçonhentos, estes animais usam sua peçonha primariamente para propósitos defensivos (Church e Hodgson, 2002a). O aparato peçonhento destes animais é constituído por espinhos (Figura 2) encontrados nas nadadeiras dorsais (11-17), pélvicas (2), e anais (3) (Russell, 1965). O tecido produtor/secretor da peçonha é encontrado nas cavidades anterolaterais dos espinhos (Figura 2B), e são envolvidos por tegumento (Russell, 1965; Smith e Wheeler, 2006).

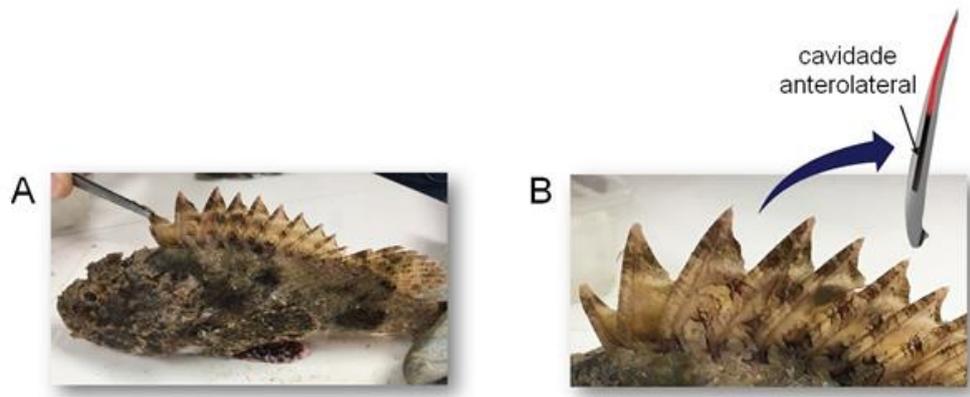


FIGURA 2. PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*. (A) Vista lateral do espécime. (B) Espinhos dorsais cobertos pela membrana tegumentar e, em evidencia, ilustração da cavidade anterolateral do espinho do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. Fonte: arquivo pessoal.

O envenenamento pelo *S. plumieri*, ocorre, em geral, por pressão mecânica quando a vítima pisa ou toca no peixe. Os espinhos tornam-se eretos, perfuram os tecidos da vítima e a bainha tegumentária é rompida e/ou deslocada para baixo,

permitindo que a peçonha penetre no ferimento (Russell, 1965; Shaeffer *et al.*, 1971; Gwee *et al.*, 1994; Haddad Jr. *et al.*, 2003). A maior parte dos acidentes ocorre em ambientes de águas calmas e/ou sombreadas (Haddad Jr. *et al.*, 2003), devido ao hábito destes animais de permanecerem imóveis e camuflados em rochas e em recifes de coral.

As manifestações clínicas dos acidentes com peixes peçonhentos são em sua grande maioria locais, incluindo dor, edema, eritema e, em alguns casos, necrose; entretanto, as manifestações sistêmicas como desordens cardio-respiratórias são também observadas, principalmente nos acidentes envolvendo peixes da família *Scorpaenidae* (Figueiredo *et al.*, 2009), não havendo relatos de casos de óbitos.

Em 2010, Gomes e colaboradores demonstraram que o veneno de *S. plumieri* induz vasoconstrição coronariana, efeito cronotrópico, lusitrópico e inotrópico positivo em corações isolados de rato. Em 2012, Menezes e colaboradores observaram que peçonha do *S. plumieri* também induz uma resposta inflamatória local intensa e sustentável, caracterizada por nocicepção, edema de intensidade e persistência dose-dependente, além de liberação de citocinas e quimiocinas. Além disso, outro estudo revelou que o soro contra o veneno do peixe-pedra (*Synanceia verrucosa*) neutraliza as respostas nociceptiva, edematogênica e cardiovasculares induzidas pela peçonha do peixe-escorpião, sugerindo que estas peçonhas compartilham componentes com propriedades antigênicas semelhantes (Gomes *et al.*, 2011).

Pescadores, mergulhadores e turistas praianos são as principais vítimas de envenenamento pelo *S. plumieri* (Haddad *et al.*, 2003). Geralmente, o tratamento é apenas paliativo e sintomático e os efeitos locais podem ser parcialmente revertidos por imersão do membro afetado em água quente. Às vezes é necessário o uso de infiltrações anestésicas ou mesmo de opiáceos (Haddad, 2000).

1.1.2 Caracterização química das peçonhas de peixes

Semelhantemente a peçonhas de animais terrestres, as de peixes consistem de uma complexa mistura de moléculas biologicamente ativas, incluindo proteínas enzimáticas e não-enzimáticas, peptídeos, aminas biogênicas e substâncias ainda desconhecidas. A presença de vários mediadores químicos e componentes de baixa massa molecular já foi descrita nestas peçonhas, incluindo catecolaminas (Church e Hodgson, 2000b), acetilcolina ou substâncias colinomiméticas (Cohen e Olek, 1989;

Church e Hodgson, 2000a), e histamina (Muhuri *et al.*, 2005). Estas pequenas moléculas parecem ter importantes implicações nas atividades farmacológicas de peçonhas de peixes.

Apesar das dificuldades descritas em relação à pesquisa dessas peçonhas, algumas toxinas já foram isoladas de peçonhas de peixes. O quadro 1 lista toxinas já purificadas, características químicas e atividades biológicas de toxinas isoladas de peçonhas de peixes. Esta quantidade é pequena quando considerado o número de peixes peçonhentos já descritos (Church e Hodgson, 2002a; Smith e Wheeler, 2006; Figueiredo *et al.*, 2009).

Estudos realizados no Laboratório de Química de Proteínas – LQP – da Universidade Federal do Espírito Santo tem explorado o potencial biotecnológico de componentes proteicos da peçonha do peixe *S. plumieri* (para revisão ver Campos *et al.*, 2016). O grupo já descreveu o isolamento e características de 4 moléculas ativas da peçonha do peixe-escorpião (Quadro 1), sendo elas: A Sp-GP (protease com atividade gelatinolítica), Sp-CTx (glicoproteína responsável pelos efeitos cardiovasculares, inflamatórios e citolíticos), Plumeribetina (lectina homóloga a lectinas do tipo B comumente encontradas em plantas, que reconhece carboidratos complexos contendo manose e inibe a ligação da integrina $\alpha 1\beta 1$ ao seu ligante da matriz extracelular, o colágeno tipo IV) e um grupo de cinco isolectinas (Sp-CL 1-5, homólogas a lectinas tipo C de outros peixes venenosos). Entretanto, até o presente momento, não existem estudos sobre as propriedades farmacológicas desse último grupo de lectinas (Campos *et al.*, 2016).

De fato, os estudos dedicados à identificação e compreensão do papel das lectinas em peçonhas de peixes estão limitados aos relatos pioneiros sobre essas moléculas. Desta forma, é clara a necessidade de estudos que correlacionem a estrutura e a função desta classe de proteínas de forma a melhor compreender seu papel nas peçonhas e no envenenamento causado por peixes, o que poderá concorrer para a exploração de seu potencial biotecnológico.

1.4 Lectinas

As lectinas representam uma classe de proteínas de origem não imune que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar complexos de hidratos de carbono – sem qualquer tipo de atividade

enzimática – que são alvo da sua ligação (Goldstein *et al.*, 1980). O termo lectina vem do latim “*legere*” que significa selecionar ou escolher (Boyd & Shapleigh, 1954), referindo-se a sua especificidade de ligação a carboidratos.

Essas proteínas são capazes de interagir com diversos glicoconjugados de fluidos biológicos e de receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações contidas nos códigos glicídicos trocadas entre moléculas, células e organismos (Misquith *et al.*, 1994). Vários processos bioquímicos/biológicos fundamentais como: comunicação celular, resposta imune, fertilização, infecções parasitárias, microbianas, viróticas e metástase de tumores são intermediados por interações lectina-glicoconjugados (Gabiuss, 1997). Além disso, foi demonstrado – *in vitro* e *in vivo* – que lectinas podem ser muito importantes na regulação da formação de novos vasos capilares, especialmente aqueles relacionados à angiogênese tumoral (Griffioen & Thijssen, 2014).

O interesse no estudo de lectinas aumentou muito com o reconhecimento de que carboidratos em glicoconjugados são portadores de informação biológica, e desde então, muitas novas lectinas foram isoladas e descritas na literatura. O marco inicial de purificação e caracterização destas moléculas se deu em 1887 com o trabalho de Dixon, que relatou a descoberta de uma proteína extraída da mamona (*Ricinus communis*) batizada em 1888 de Ricina por Stillmark, que descreveu que esta proteína purificada era capaz não apenas de aglutinar eritrócitos, mas também de precipitar proteínas do soro. A atividade aglutinante – inerente destas moléculas – é usada para acompanhar processos de isolamento de lectinas (Dubois *et al.*, 1998), sendo que a especificidade de uma lectina é determinada pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo capaz de inibir o fenômeno de aglutinação em eritrócitos (Kompella e Lee, 2001).

Esta classe de proteínas está amplamente distribuída na natureza, sendo encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microorganismos (Lis e Sharon, 1986; Mody *et al.*, 1995, Kennedy *et al.*, 1995). Uma busca no banco de

QUADRO 1. PROTEÍNAS PURIFICADAS DE PEÇONHAS DE PEIXES

FAMÍLIA	ESPÉCIE	PROTEÍNA	ASPECTOS ESTRUTURAIS	ATIVIDADES DESCRITAS	REFERÊNCIAS
Scorpaenidae	<i>Synanceja horrida</i> (Peixe-pedra Indiano)	SNTX	148kDa 2 subunidades α 79kDa (702aa) β 71kDa (699aa)	Letal em camundongo Vasorelaxante Hemolítica Neuromuscular Nociceptiva Edematogênica	Poh <i>et al.</i> (1991) Khoo <i>et al.</i> (1992) Low <i>et al.</i> (1993) Low <i>et al.</i> (1994) Khoo <i>et al.</i> (1995) Sung <i>et al.</i> (2002)
		SFHYA1	52kDa Glicosilada	Hialuronidásica	Poh <i>et al.</i> (1992) Ng <i>et al.</i> (2005)
	<i>Synanceja verrucosa</i> (Peixe-pedra de recifes)	VTX	322kDa Glicosilada 4 subunidades 2 α 83kDa 2 β 78kDa	Letal em camundongo Cardiovascular: Hipotensiva Hemolítica	Gamier <i>et al.</i> (1995) Gamier <i>et al.</i> (1997a,b)
		neoVTX	166kDa 2 subunidades α 75kDa (702aa) β 80kDa (699aa)	Hemolítica	Ueda <i>et al.</i> (2006)
	<i>Synanceja trachynis</i> (Peixe-pedra estuarino)	TLY	158kDa 2 subunidades α 76kDa β 83kDa	Cardiovascular Hemolítica Neuromuscular Edematogênica	Kreger (1991) Colasante <i>et al.</i> (1996) Sauviat <i>et al.</i> (2000)
	<i>Scorpaena plumieri</i> (Peixe-escorpião)	SP-GP	80kDa	Proteolítica	Carijo <i>et al.</i> (2005)
		Sp-H	77kDa Glicosilada	Hialuronidásica	Cassoli (2008)
Plumieribetin		14kDa	Inibe a ligação da integrina α 1 β 1 ao colágeno da membrana basal	Evangelista, K.S. <i>et al.</i> (2009)	
	Sp-CTx	121 kDa Glicosilada	Vascular Hemolítica Inflamatória Nociceptiva	Andrich <i>et al.</i> , 2010 Malacarne <i>et al.</i> , 2018	
<i>Pterois volitans</i> (Peixe-leão)	Peptídeo FV	7,6kDa	Inibe crescimento de células tumorais <i>in vitro</i> Apoptose em células tumorais	Sri Balasubashini <i>et al.</i> (2006a,b)	

Trachinidae	<i>Trachinus draco</i> (Peixe-aranha maior)	Dracotoxina	105kDa	Hemolítica: Neuromuscular	Chhatwal e Dreyer (1992a,b)
	<i>Trachinus vipera</i> (Peixe-aranha menor)	Trachinina	324kDa Glicosilada 4 subunidades	Letal em camundongo	Perriere <i>et al.</i> (1988)
Tetrarogidae	<i>Nothestes robusta</i>	Nocitoxina	170kDa	Nociceptiv	Hahn e O'Connor (2000)
Plotosidae	<i>Plotosus canius</i> (Peixe-gato Indiano)	Toxina-PC	15kDa	Letal em camundongo	Auddy <i>et al.</i> (1994) Auddy <i>et al.</i> (1995)
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i> (Peixe-pintado)	SA-HT	18kDa	Neuromuscular Hemorrágica (em estomago) Nociceptiva Edematogênica	Karmakar <i>et al.</i> , 2004 Muhuri <i>et al.</i> , 2005
Batrachoididae	<i>Thalassophryne maculosa</i> (Peixe-sapo)	TmC4-47.2	15.161Da	Neuromuscular Miotóxica	Sosa-Rosales <i>et al.</i> , (2005)
		Família Natterina (1, 2, 3)	≈35-38kDa	Proteolítica Edematogênica Nociceptiva	Magalhães <i>et al.</i> (2005) Lopes-Ferreira <i>et al.</i> (1998) Lopes-Ferreira <i>et al.</i> (2004)
	<i>Thalassophryne nattereri</i> (Peixe-sapo brasileiro)	Nattectina	15kDa	Hemaglutinação Indução da resposta inflamatória Agente imunomodulador	Lopes-Ferreira <i>et al.</i> (2011) Saraiva <i>et al.</i> , 2011

de dados Uniprot (NCBI-2019) mostrou que 168.727 lectinas já foram descritas em diversos organismos (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=lectin&sort=score>).

Lectinas encontradas em microrganismos apresentam importante papel nas interações patogênicas destes com tecidos/células de hospedeiros (Slifkin & Doyle, 1990), auxiliando no organotropismo de determinadas doenças infecciosas (Singh *et al.*, 1999). O mais antigo e talvez o mais bem caracterizado sistema de reconhecimento lectina-carboidrato é o que rege a interação do vírus Influenza com suas células-alvo (Paulson, 1985; Wiley e Skehel, 1987).

Nos vegetais, as lectinas desempenham importante papel protetor na defesa destes organismos contra insetos e microrganismos fitopatogênicos. Janzen e colaboradores (1976) demonstraram que a alimentação de besouros bruquídeos com dieta contendo lectina de feijão preto ocasiona a morte de suas larvas. A concanavalina A (Con A), membro da família das lectinas leguminosas, foi a primeira lectina a ser disponibilizada comercialmente, sendo amplamente usada em biologia e bioquímica para caracterizar glicoproteínas e outras moléculas dotadas de açúcares na superfície de diversas células. Esta lectina é um mitógeno de plantas.

1.4.1 Lectinas animais

Somente em 1974 foi descrita a primeira lectina de origem animal, encontrada no fígado de coelho e denominada “lectina hepática de mamíferos” (Stockert *et al.*, 1974). Provavelmente, o reconhecimento tardio da presença de lectinas em tecidos animais se deveu ao fato da expressão tecidual destas ser muito inferior em relação a de vegetais. Assim, para uma caracterização mais detalhada de lectinas animais, é necessário partir-se de uma quantidade de material bruto muito grande, o que pode tornar o trabalho inviável (Lam & Ng, 2011)

O desenvolvimento de processos cromatográficos, principalmente aqueles envolvendo interação específica (cromatografia de afinidade), levou ao isolamento de um grande número de lectinas de tecidos animais, permitindo a caracterização estrutural, a análise da especificidade de interações destas moléculas e o estudo de suas atividades biológicas. A ação depurante da “lectina hepática de mamíferos” foi a primeira função fisiológica descrita para lectinas em organismos animais. Essa molécula reconhece asialoglicoproteínas do sistema circulatório, desencadeando a endocitose e destruição dessas proteínas (Ashwell e Morell, 1974; Ashwell e Harford,

1982). Várias funções fisiológicas têm sido descritas para lectinas de tecidos animais, que estão envolvidas em mecanismos de endocitose e translocação intracelular de glicoproteínas (Yamashita *et al.*, 1999), apoptose (Rabinovich *et al.*, 1999), regulação de processos de migração e adesão celular (Rudiger *et al.*, 2000; Ponchel & Irache, 1998), dentre outros.

Não obstante a grande diversidade estrutural de lectinas encontradas em animais, estas podem ser agrupadas de acordo com os seus domínios de reconhecimento de carboidratos - CRDs, do inglês *Carbohydrate Recognition Domains* (Drickamer, 1993; Sharon, 1993; Cummings e McEver, 2009). Os CRDs são módulos proteicos de 110-140 resíduos de aminoácidos que estão associados à atividade de ligação a açúcares das lectinas animais. De acordo com a estrutura dos CRDs, as lectinas animais são classificadas em oito grupos bem estabelecidos (alguns estão representados na figura 3): a família calnexina, lectinas tipo M, tipo L, tipo P, tipo C, tipo R, tipo I ou singlecs, tipo S ou galectinas (Drickamer, 2006).

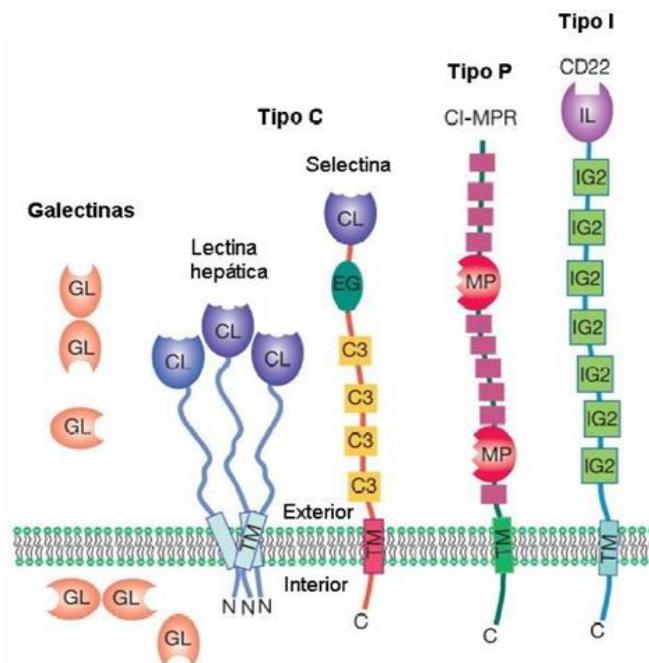


FIGURA 3. ALGUNS DOS PRINCIPAIS TIPOS DE LECTINAS ANIMAIS. Representação esquemática da estrutura e do(s) domínio(s) de um exemplo de cada tipo de lectina. Os CRDs mostrados são: (CL) lectina tipo C; (GL) lectina tipo S; (MP) lectina tipo P; (IL) lectina tipo I. Outros domínios são (EG) domínio semelhante à EGF (*Endothelium Growth Factor*); (IG2) domínio imunoglobulina C2-set; (TM) região transmembrana; e (C3) repetição regulatória do complemento. O número dos domínios diferentes do CRD pode variar entre os membros de uma mesma família. Fonte: Drickamer, 2006.

Grupos adicionais de lectinas animais que apresentam papéis complementares àqueles bem estabelecidos para outras famílias de lectinas têm sido descritos e incluem as F-box, Ficolinas semelhantes à quitinase, lectinas tipo F e intelectinas (Drickamer, 2006).

Um grande número de lectinas – das várias classes – tem sido isolado de peçonhas animais, incluindo as de peixes. Inúmeros efeitos biológicos têm sido descritos para lectinas de venenos de serpentes, dentre os quais pode-se citar: proliferação de linfócitos (Mastro *et al.*, 1986), indução de edema (Lomonte *et al.*, 1990; Panunto *et al.*, 2006), inibição da proliferação de células cancerígenas (Pereira-Bittencourt *et al.*, 1999), aglutinação de eritrócitos *in vitro* (Kassab *et al.*, 2004), redução do fluxo urinário e taxa de filtração glomerular (Havt *et al.*, 2005), indução de laminação de leucócitos (Evangelista *et al.*, 2007) e citotoxicidade para tumores e linhagens de células endoteliais (Carvalho *et al.*, 2001).

A natectina, uma lectina tipo C, foi purificada do veneno do peixe-sapo *Thalassophryne nattereri*, encontrado no litoral nordeste do Brasil. Esta molécula desempenha um papel importante na indução da resposta inflamatória (Lopes-Ferreira *et al.*, 2011), agindo também como um agente imunomodulador (Saraiva *et al.*, 2011; Ishizuka *et al.*, 2012) e aumentando a adesão celular mediada por integrinas, além de elevar a resistência a apoptose (Komegae *et al.*, 2011). Surpreendentemente, os efeitos aglutinantes da natectina se mostraram independentes da presença de Ca^{2+} (Lopes-Ferreira *et al.*, 2011).

Dois tipos de lectinas - tipo B e C - já foram identificadas na peçonha do *S. plumieri*. A plumieribetina com atividade inibitória de integrina (Evangelista *et al.*, 2009) foi encontrada no veneno e no muco do *S. plumieri*. E cinco isoformas de uma lectina tipo C denominadas Sp-LC 1–5 (Andrich *et al.*, 2015) foram purificadas a partir do extrato do aparato venenoso.

Lectinas tipo C são o grupo mais heterogêneo de lectinas animais, uma vez que seus CRDs podem estar associados com uma diversa gama de outros domínios proteicos (Drickamer, 1993); algumas consistem de proteínas solúveis e outras são proteínas transmembrana. Estas moléculas possuem inúmeras funções biológicas, como a constituição da matriz extracelular (proteoglicanos), adesão de moléculas e defesa humoral; muitas são consideradas receptores endocíticos (Drickamer, 1993).

As lectinas do tipo C apresentam como característica comum a dependência de íons Ca^{2+} para a ligação ao carboidrato (Sharon, 1993). Esta classe é subdividida

em 17 grupos, dentre os quais estão incluídos: as collectinas (grupo III), lectinas que possuem domínio semelhante ao colágeno próximo à região N-terminal, as quais são responsáveis pela aglutinação e aumento da depuração de patógenos invasores, constituindo uma valiosa ferramenta do sistema inato de defesa (Hakanson e Reid, 2000); o grupo IV (selectinas), moléculas envolvidas na adesão de leucócitos a células endoteliais e migração dos mesmos para tecidos linfóides ou inflamados (Drickamer, 1993; Sharon, 1993); e também o grupo VII, o qual consiste simplesmente de CRDs tipo C isolados. Lectinas deste último grupo são encontrados no pâncreas (de Caro *et al.*, 1987; Iovana *et al.*, 1991) e em peçonhas de serpentes (Chen e Tsai, 1995; Polgár *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 2005).

Como já descrito anteriormente, a propriedade de ligação das lectinas aos carboidratos está associada a domínios modulares, que no caso das lectinas C são chamados de CRDs dependentes de Ca^{2+} ou CRDs tipo C (Drickamer, 1993). Uma das características principais da classe, que a diferencia das demais, é o fato de seu CRD apresentar uma estrutura globular compacta (Weis *et al.*, 1991). Outro fator estrutural bastante relevante é o posicionamento da região ligante de cálcio em um duplo loop (Zelensky & Gready, 2005). Entretanto, algumas dessas proteínas apresentam o CRD incompleto ou ausente, mas a conservação estrutural é tão grande que as mantêm classificadas como lectinas tipo C. Estes CRDs, chamados *C Type Lectin-like Domains* ou CTLDs, possuem uma conformação proteica similar a outros domínios, mas não necessariamente se ligam a açúcares (Drickamer, 1999; Morita, 2005; Drickamer, 2006; Cummings e McEver, 2009). Alguns CTLDs se ligam a moléculas proteicas ou lipídicas e comumente estas interações são independentes de íons Ca^{2+} (Drickamer, 1999; Cummings e McEver, 2009). Lectinas que possuem CTLDs são frequentemente encontradas em venenos de serpentes (Zelensky; Gready, 2005) e, pelo fato de apresentarem características tão peculiares e também com o objetivo de se evitar confusões por nomenclatura na literatura, essas moléculas têm sido atualmente designadas como *Snaclecs* (Clementson, 2010). Atualmente, acredita-se que os CRDs tipo C são resultado da evolução dos CTLDs (Drickamer, 1999), a partir dos quais também se originaram as proteínas anticongelantes, as proteínas ligantes de fatores de coagulação e muitas outras moléculas com arquétipo estrutural similar (Drickamer, 1999).

As características mencionadas evidenciam a necessidade de estudos que correlacionem a estrutura e a função desta classe de proteínas de forma a melhor

compreender seus papéis nas peçonhas e no envenenamento causado por peixes, permitindo também, a exploração de seu potencial biotecnológico, evidenciado pela diversidade de atividades farmacológicas e imunológicas descritas para estas proteínas.

Recentemente nosso grupo de pesquisa, usando uma abordagem proteômica (Borges *et al.*, 2018), catalogou uma grande diversidade de proteínas na peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, dentre as quais se encontram lectinas de várias classes. Porém, até o momento, apesar de algumas terem sido purificadas, nem todas essas moléculas foram caracterizadas bioquímica e farmacologicamente. Dessa forma, considerando o potencial das lectinas como importantes ferramentas em pesquisas que englobam diversas áreas da ciência, em especial bioquímica, biologia molecular, imunologia, farmacologia e medicina, este estudo se propôs à purificação de frações hemaglutinantes contendo lectina presentes na peçonha do *S. plumieri*, visando tanto sua caracterização bioquímica, quanto a descrição de suas principais atividades biológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar frações proteicas com atividade hemaglutinante – Lectinas – presente(s) na peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* em quantidade suficiente para sua caracterização bioquímica e funcional.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer um protocolo de purificação robusto de frações com atividade hemaglutinante – lectinas – na peçonha do *S. plumieri*;

- ✓ Caracterizar bioquimicamente a(s) fração(ões) hemaglutinante(s) quanto à:
 - Estabilidade;
 - Perfil proteico;
 - Presença de estruturas secundárias regulares;

- ✓ Caracterizar fisio-farmacologicamente a(s) fração(ões) hemaglutinante(s) quanto às atividades:
 - Antimicrobiana in vitro;
 - Inflamatória;
 - Citotóxica em diferentes linhagens celulares;
 - Vasotônica em artéria isolada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e aspectos éticos

Exemplares de *S. plumieri* foram capturados em locais de águas rasas no litoral de Aracruz (ES) por mergulhador licenciado pelo IBAMA. Os peixes foram mantidos em aquário com água marinha e suprimento adequado de oxigênio até sua identificação, que foi realizada através da visualização de manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie (Figura 4A).

Camundongos Swiss e ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões adequadas em ambiente com iluminação (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura (22°C) e umidade (50%) controladas e livre acesso à água e ração (ração padrão para roedores, Purina Labina, SP–Brasil).

As carcaças dos animais utilizados foram descartadas como determinado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), acondicionadas em sacos brancos e congeladas até a coleta por empresa especializada.

A coleta de sangue de coelhos foi realizada pela artéria auricular de acordo com o método proposto pelo *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs). O sangue de camundongos foi cedido pelo grupo do laboratório de Neuroquímica e Comportamento (LABNEC). O sangue humano foi doado por voluntários previamente notificados sobre suas futuras aplicações.

As linhagens celulares utilizadas (HEK293, Neuro2A, C6, RKO, CHO, RAW e HELA) foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Alessandra Matavel, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte-MG.

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram gentilmente cedidas pelo serviço de “Doenças virais e de micro-organismos intracelulares” da FUNED.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica no cuidado e uso de animais de laboratório, como indicado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho

Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo sob os números 093/2015 e 031/2015.

3.2 Obtenção da peçonha

Para extração da peçonha, os peixes foram anestesiados por resfriamento (-20°C) e os espinhos dorsais e anais foram removidos para a obtenção do extrato venenoso, que consistiu na retirada do tegumento que reveste os espinhos assim como na raspagem da cavidade anterolateral (Figura 2) que contém o tecido glandular produtor do veneno. Esse material foi então macerado e solubilizado em tampão fosfato de sódio 100 mM com 150 mM de NaCl, pH 7,4 a 4°C, como mostrado na figura 4B-D. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 4°C/15.000 g para a remoção de partículas insolúveis e o sobrenadante obtido corresponde à fração solúvel da peçonha bruta, sendo denominado Sp-V (*Scorpaena plumieri* Venom).

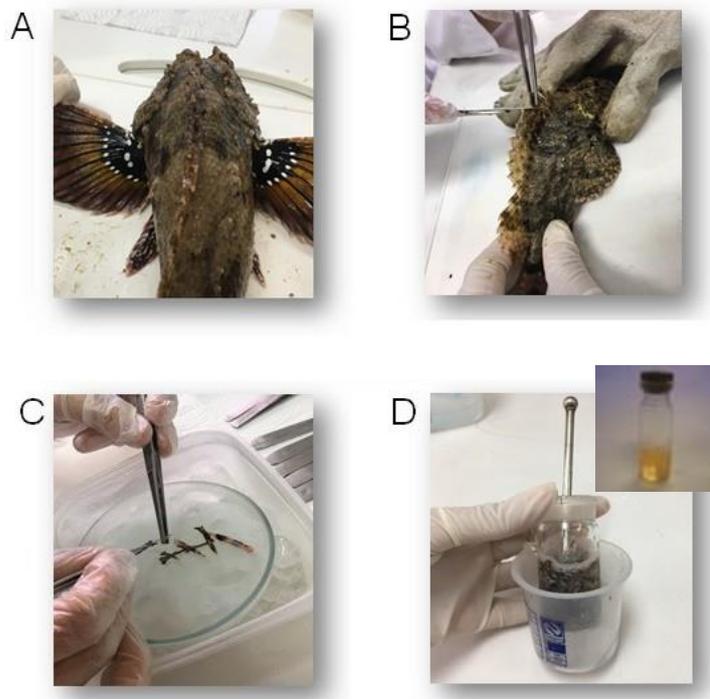


FIGURA 4. EXTRAÇÃO DA PEÇONHA. (A) Manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características da espécie. (B) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (C) Remoção do tegumento que reveste o espinho e raspagem do sulco que contém a glândula de veneno. (D) Homogeneização do material proveniente da retirada do tegumento e raspagem do sulco dos espinhos; em evidência: solução obtida após centrifugação (Sp-V). Fonte: arquivo pessoal.

3.3 Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico dos extratos e de frações obtidas nas etapas de purificação foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

3.4 Purificação de frações hemaglutinantes

O processo de purificação das frações aglutinantes – lectina(s) – envolveu 2 etapas: precipitação salina e cromatografia de filtração molecular. A atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho foi utilizada para o monitoramento do processo de purificação (conforme item 3.4.1).

3.4.1 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi avaliada em eritrócitos lavados, de acordo com Habermann *et al.* (1981), com algumas modificações.

Ao sangue coletado foi imediatamente adicionada (1:1 v/v) solução anticoagulante Alsever (glicose 2,05%, NaCl 0,42%, citrato tri-sódico 0,8%, ácido cítrico 0,055% em água destilada). A solução resultante foi diluída em tampão fosfato de sódio 100 mM com 150 mM de NaCl, pH 7,4 (1:10 v/v). Após centrifugação (3.000 g por 3 min), os eritrócitos sedimentados foram lavados com tampão fosfato até que o sobrenadante não apresentasse cor. Ao final, as células lavadas foram ressuspensas em tampão para obtenção de suspensão de 2% v/v.

Os ensaios de aglutinação foram realizados em placas de microtitulação contendo 96 poços com fundo cônico, o que possibilita a visualização da aglutinação dos eritrócitos. Os poços das placas foram preenchidos com 100 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM com 150 mM de NaCl, pH 7,4. Em seguida, ao primeiro poço de cada fileira, foram adicionadas as amostras contidas em 100 µL do mesmo tampão. Após diluição seriada da amostra (transferência de 100 µL para o poço seguinte até o último poço da fila), foram adicionados 50 µL da suspensão de eritrócitos à 2%. A hemaglutinação foi visualizada após 24h a 4°C. A concentração mínima que permite visualizar os eritrócitos aglutinados foi denominada Concentração Mínima Hemaglutinante (CMH).

Na maioria dos ensaios a atividade hemaglutinante foi avaliada em eritrócitos de coelho. Entretanto, em um ensaio realizado para determinar a especificidade quanto a espécies, foram utilizados além de eritrócitos de coelho os de camundongo e de humanos, dos tipos A, B, AB e O.

3.4.2 Primeira etapa de purificação: precipitação salina

Uma amostra de 121 mg de Sp-V foi submetida à precipitação salina realizada com duas concentrações sequenciadas. Inicialmente, adicionou-se 15% (p/v) de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) à Sp-V, sob agitação lenta por 5 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 30.000 g por 30 minutos (4 °C). O material precipitado foi separado do seu sobrenadante, dissolvido em PBS e denominado P15 (precipitado com 15% de (NH₄)₂SO₄). Em seguida, adicionou-se (NH₄)₂SO₄ ao sobrenadante para uma concentração final de 35% p/v. Após centrifugação a 30.000 g por 30 minutos a 4°C o material precipitado foi dissolvido em PBS e denominado P35 (precipitado com 35% de (NH₄)₂SO₄). Todo o processo foi realizado a 4°C. A atividade hemaglutinante (item 3.4.1) foi avaliada nas frações P15, P35 e no sobrenadante (SN) obtido após remoção do precipitado com 35% de (NH₄)₂SO₄.

3.4.3 Segunda etapa de purificação: cromatografia de filtração molecular

A fração com atividade hemaglutinante obtida na etapa anterior foi submetida à cromatografia de filtração molecular em sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com uma coluna Superose 12 (1 cm x 30 cm) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 100 mM com 150 mM de NaCl, pH 7,4. O fluxo foi de 0,3 mL/min e a eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância à 218 nm. As frações foram coletadas manualmente e mantidas a 4°C, e as que apresentaram atividade hemaglutinante (de acordo com o item 3.4.1) foram utilizadas para os testes descritos abaixo.

3.5 SDS-PAGE

A homogeneidade das frações obtidas nas várias etapas de purificação foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sistema SDS-TRICINA de acordo com Schagger & Von Jagow (1987).

O gel de separação foi preparado contendo 10% de poliacrilamida p/v, 13,3% de glicerol p/v, 0,033% de PSA p/v, 0,033% de temed v/v e 0,1% de SDS p/v, em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,45. Sobre o gel de separação, foi preparado o gel de concentração contendo 5% de poliacrilamida, e os mesmos reagentes do gel de separação, com exceção do glicerol. A eletroforese foi conduzida sob tensão de 100V a temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,9 (anodo) e Tris-HCl 0,1 M contendo 0,1 M de tricina e 0,1% de SDS p/v pH 8,25 (catodo). As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 12% de glicerol p/v, 0,01% de azul brilhante G p/v, e incubadas por 30 min a 40°C. Após a corrida, o gel permaneceu por 30 minutos em solução fixadora metanol: ácido acético: água (50:10:40). Em seguida, foi corado por 1 hora em solução 0,025% de azul brilhante G em ácido acético e água (1:9) e posteriormente descorado em solução de ácido acético 10%.

Foi utilizada uma mistura de proteínas (Bio-Rad) de 104kDa, 81kDa, 47kDa, 34kDa e 19kDa, como padrão de massa molecular.

3.6 Caracterização química

3.6.1 Dicroísmo circular

Para avaliar a presença de estruturas secundárias, as duas frações com atividade hemaglutinante obtidas na etapa de filtração molecular ($\approx 120 \mu\text{g}$) foram solubilizadas em 200 μL de tampão fosfato de sódio 10 mM e 0,4 M NaCl, pH 7,4 e analisadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 no Laboratório Multiusuário de Proteômica ICB/UFMG. Os espectros de dicroísmo circular foram adquiridos em temperaturas variando de 20 a 80°C com varredura de 190 a 260 nm de comprimento de onda. Cada espectro corresponde à diferença entre a média das cinco varreduras realizadas em cada temperatura e as cinco varreduras realizadas para o tampão em que a amostra estava diluída. Os dados de elipticidade molar foram deconvoluídos na

plataforma Dicroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) utilizando a base de dados Contin-LL (Povencher & Glockner Method).

3.6.2 Ensaio de estabilidade da atividade hemaglutinante

Para determinar as condições ideais para a manutenção da atividade, alíquotas de frações hemaglutinantes provenientes da 2^o etapa de purificação (10 µg) foram mantidas em diferentes temperaturas: ambiente, 4°C, -20°C, -80°C e submetidas à liofilização. O ensaio de hemaglutinação (item 3.4.1) foi realizado após 7, 30 e 60 dias de armazenamento e o resultado foi comparado com aquele obtido imediatamente após eluição destas frações na filtração molecular, o qual foi considerado 100% de atividade.

3.6.3 Ensaio de avaliação da atividade hemaglutinante na presença de carboidratos e EDTA

Para avaliar a especificidade de ligação a carboidratos, a atividade das amostras hemaglutinantes foi avaliada na presença de carboidratos (galactose, manose, frutose, sacarose e lactose) e EDTA.

Em placas de microtitulação, 10 µg das amostras com atividade hemaglutinante (2^o etapa de purificação) foram incubadas com 5, 15 e 30 mM dos carboidratos e 1, 5 mM de EDTA, em um volume final de 100 µL. Após incubação com agitação leve (4°C por 4h), foram adicionados 50 µL de eritrócitos de coelho e processado conforme item 3.4.1. Ensaios contendo os carboidratos e eritrócitos, EDTA e eritrócitos foram utilizados como controles negativos de aglutinação.

3.7 Caracterização funcional

3.7.1 Ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Este ensaio foi realizado em parceria com a Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Para avaliar a atividade antimicrobiana, amostras hemaglutinantes foram submetidas a ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) como descrito por Wiegand 2008. Para o ensaio foram utilizadas cepas de bactérias Gram-positivas

(*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). As cepas bacterianas foram cultivadas em ágar sangue (Fluka Analytical, EUA) e o inóculo inicial utilizado no ensaio foi ajustado para corresponder a 0,5 na escala de McFarland para obtenção de um crescimento confluyente.

A determinação da CIM foi feita pela diluição serial das amostras em microplacas de polipropileno de 96 poços, com fundo em “U”, esterilizadas. A maior concentração de frações hemaglutinantes utilizada foi de 20 µg em 90 µL (Caldo Mueller Hinton II - Fluka Analytical, EUA) mais 10 µL de suspensão bacteriana, totalizando 100 µL no ensaio. Para avaliar a viabilidade das bactérias testadas - controle positivo – 10 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 90 µL de Caldo Mueller Hinton II. Como controle negativo, foram utilizados 100 µL do Caldo Mueller Hinton II.

As microplacas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24h. Após a incubação, foi feita uma avaliação visual preliminar, na qual a ausência ou a turbidez nos poços, que indicam respectivamente, inibição e crescimento bacteriano foram observadas. Os resultados visuais foram confirmados pela leitura da absorbância a 620 nm em leitor de placa (Anthos).

Para avaliar se o efeito inibitório era bactericida ou bacteriostático, alíquotas de 10 uL de todas as misturas usadas no ensaio de CIM que não mostraram qualquer crescimento das bactérias após o período de incubação foram subcultivadas em caldo BHI a 37°C por 24h. Amostras que permitirem o crescimento visível de bactérias no caldo BHI após o período de incubação foram consideradas bacteriostáticas.

3.7.2 Ensaio de viabilidade celular

O potencial efeito citotóxico das amostras hemaglutinantes provenientes da segunda etapa de purificação foi avaliado através do ensaio de viabilidade celular realizado em parceria com a Dr^a Alessandra Matavel da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Para este ensaio foram utilizadas as linhagens celulares embrionárias de rim humano (HEK293), ovário de hamster chinês (CHO), macrófago murino (RAW), neuroblastoma de rato (Neuro2A), glioma de rato (C6), carcinoma de colón humano (RKO) e câncer cervical humano (HeLa). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de

Penicilina/Streptomicina (Sigma) e 1% de Glutamax (Gibco) e mantidas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico da resazurina. Em microplacas de 96 poços com fundo chato, foram adicionadas suspensões celulares de 2×10^5 células por poço (135 µL) e 25 µg ou 50 µg das amostras purificadas com atividade hemaglutinante, seguido de incubação em estufa à 37°C, com 5% de CO₂ por 48h. Ao final da incubação, 15 µL de resazurina foram adicionados aos poços para a concentração final de 100 µM e as placas foram novamente incubadas à 37°C, com 5% de CO₂ por 4-6 horas. Foram feitos controles contendo meio de cultura com as amostras e o meio de cultura com resazurina. As placas foram analisadas através de um leitor de microplacas com absorvância a 570 nm e 600 nm (Biotek, Winooski, Vermont, USA).

3.7.3 Ensaio de atividade edematogênica

Para avaliar um possível efeito inflamatório das frações hemaglutinantes, foi realizado um ensaio de atividade edematogênica, através do teste da pata do camundongo (Lima *et al.*, 2003). Para este ensaio foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 20 e 25g.

Amostras (100 µg) das frações hemaglutinantes contidas em 30 µL de PBS foram injetadas via intra-plantar (i.pl.) na região do coxim plantar da pata traseira direita de camundongos. Os animais do grupo controle receberam 30 µL de PBS. O edema foi avaliado pela diferença da espessura (aferida em milímetros) da pata antes (0 h) e 30 minutos após a injeção das amostras, utilizando um paquímetro digital (Zaas Precision). Foram utilizados 6 animais por grupo.

Os resultados foram expressos como a média da porcentagem do aumento da pata em relação a espessura inicial \pm EPM e comparados através da análise de variância (ANOVA) de uma via (*Prism Graph 6.0*). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.7.4 Ensaio de reatividade vascular

Para avaliar o efeito das frações hemaglutinantes sobre a reatividade vascular foi utilizado um ensaio in vitro com anéis isolados da aorta torácica de ratos. Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Leonardo dos Santos no Laboratório

de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Nesse experimento, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, adultos (10-12 semanas). Os ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/Kg) e, em seguida eutanasiados por essanguinação. A aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri com solução de Krebs-Henseleit contendo, em mM: NaCl 118, KCl 4,7; NaHCO₃ 23; CaCl₂-2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄-7H₂O 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01. Na placa de Petri o tecido conectivo e adiposo foi cuidadosamente removido e aorta foi dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento, e dois fios de aço em forma de triângulos foram colocados através do lúmen dos segmentos vasculares para que ficassem paralelos. Cada segmento vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, mantida aquecida a 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo o pH estável em 7,4. Um fio foi fixado na base da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (TSD125C, CA, USA) que por sua vez estava conectado a um sistema de aquisição de dados (MP100A, BIOPAC System, Inc., Santa Barbara, USA). Em seguida a montagem, os segmentos vasculares foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama. Sempre que necessário, a tensão era reajustada durante os 30 minutos de estabilização.

Após esse período de estabilização, foi verificada a viabilidade da preparação antes dos testes com as frações hemaglutinantes. Para tal, a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização foi avaliada utilizando o KCl 75 mM. Ao atingirem a variação de 1 grama de força a partir do valor basal os segmentos eram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para retornarem ao basal. Os segmentos que não atingiram tal contração foram descartados. Foi aguardado outro período de 30 minutos de estabilização e em seguida os mesmos anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. A integridade funcional do endotélio foi avaliada através da capacidade da acetilcolina (10⁻⁵ M), agonista muscarínico, induzir relaxamento nos anéis de aorta previamente contraídos com agonista α -adrenérgico fenilefrina (10⁻⁷ a 10⁻⁶ M), até atingir platô de contração mínimo de 50 a 70% da contração do KCl) A integridade funcional do endotélio era considerada por um relaxamento igual ou superior a 80%. A avaliação era realizada como garantia de integridade funcional do endotélio após manipulação dos vasos.

Em seguida, foram investigados os possíveis efeitos das frações hemaglutinantes em anéis pré-contraídos com as mesmas concentrações de fenilefrina para análise de possíveis efeitos vasodilatadores; ou sem qualquer intervenção para análise dos prováveis efeitos vasoconstrictores. Foram utilizadas concentrações de 5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ das frações hemaglutinantes obtidas na filtração molecular (item 3.4.3). As respostas vasoconstráteis foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração; e as respostas vasodilatadoras, expressas como porcentagem de relaxamento em relação à contração prévia com fenilefrina. Os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

4. RESULTADOS

4.1 Purificação de frações hemaglutinantes

Neste trabalho, utilizando um processo envolvendo duas etapas de purificação – precipitação salina sequenciada e cromatografia de filtração molecular – duas frações com atividades hemaglutinante foram purificadas. A figura 5 mostra o fluxograma das etapas de fracionamento.

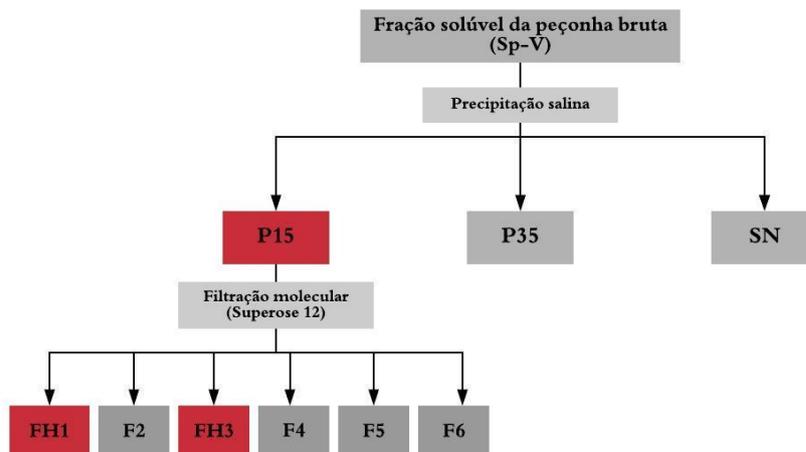


FIGURA 5. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES HEMAGLUTINANTES DA PEÇONHA BRUTA (Sp-V) DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*. As frações com atividade hemaglutinante estão destacadas em vermelho.

4.1.1 Primeira etapa de purificação: precipitação salina

A primeira etapa da purificação consistiu no fracionamento do Sp-V por precipitação salina com sulfato de amônio. Através desse procedimento, três frações proteicas foram obtidas: as precipitadas com 15% (denominada P15) e com 35% (P35) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o sobrenadante (SN) após remoção das proteínas precipitadas com 35%. A atividade hemaglutinante foi associada somente à fração mais hidrofóbica – P15 – (dados não mostrados), que representa 22% do material inicial (proteínas contidas no Sp-V).

4.1.2 Segunda etapa de purificação: cromatografia de filtração molecular

Amostras de P15 (≈ 1 mg) foram submetidas à cromatografia de filtração molecular em sistema HPLC (*High performance Liquid Chromatography*). Este processo separou o P15 em 6 frações proteicas principais (Figura 6), nomeadas F1 → 6. As frações F1 e F3 apresentaram atividade hemaglutinante, correspondendo respectivamente a um rendimento de 0,52% e 0,74% com relação à quantidade de proteína utilizada na primeira etapa de purificação, sendo, portanto, denominadas Fração Hemaglutinante 1 (FH1) e Fração Hemaglutinante 3 (FH3).

A Concentração mínima hemaglutinante (CMH) de P15, FH1 e FH3 corresponde a 0.40 $\mu\text{g/mL}$, 0.02 $\mu\text{g/mL}$, e 0.58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A CMH não pode ser determinada para Sp-V pois este apresenta intensa atividade hemolítica, o que impossibilita a avaliação da atividade hemaglutinante. A Tabela 1 mostra os dados do processo de purificação – rendimento e CMH.

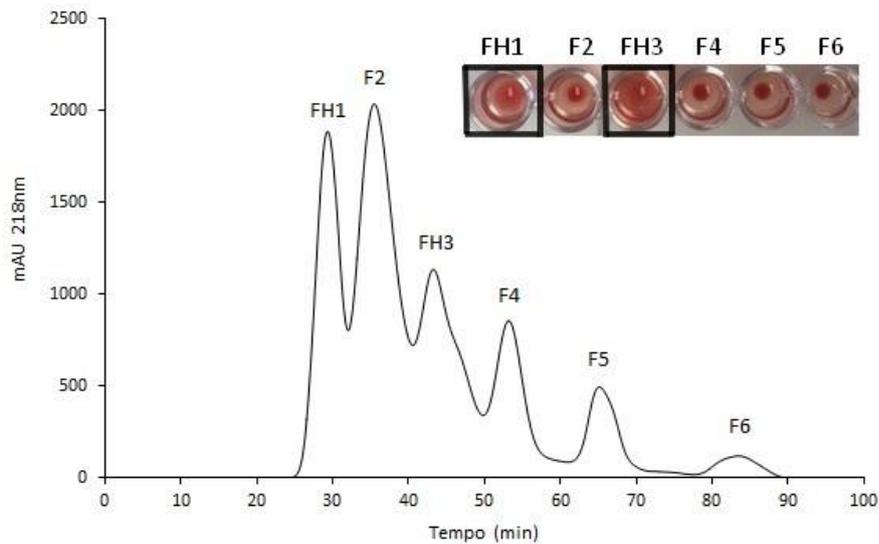


FIGURA 6. SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FILTRAÇÃO MOLECULAR DA FRAÇÃO P15. Coluna Superose 12 (1.0 × 30 cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 100 mM com 150 mM de NaCl, pH 7.4; Amostra: ≈ 1 mg de P15. O fluxo foi de 0.3 mL/min e a eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 218 nm. Em evidência: avaliação da atividade hemaglutinante das frações obtidas.

TABELA 1. RENDIMENTO E CMH DAS FRAÇÕES HEMAGLUTINANTES

	QUANTIDADE	RENDIMENTO	CMH*
Sp-V	121 mg	100%	Não determinado
P15	27 mg	22%	0.40 µg/mL
FH1	0.64 mg	0.52%	0.02 µg/mL
FH3	0.90 mg	0.74%	0.58 µg/mL

*CMH = Concentração Mínima Hemaglutinante.

A massa molecular aparente das bandas visualizadas no perfil proteico das frações obtidas durante o processo de purificação foram estimadas por comparação da migração relativa (Rf) das mesmas com a de proteínas com massa molecular conhecida, usadas como padrão. A figura 7 mostra a presença de quatro principais bandas proteicas em FH1 com migração relativa de 107kDa, 104kDa, 100kDa e 45kDa. As mesmas bandas proteicas de alto peso molecular presentes em FH1 (≥ 100 kDa) foram observadas em FH3, que também apresentou bandas de baixo peso molecular: 19kDa e 5kDa. Essas últimas também foram observadas em F4, uma das frações eluídas da cromatografia de filtração molecular (figura 6) que não apresentou atividade hemaglutinante, cujo perfil proteico em SDS-PAGE apresentou somente bandas proteicas de baixo peso molecular.

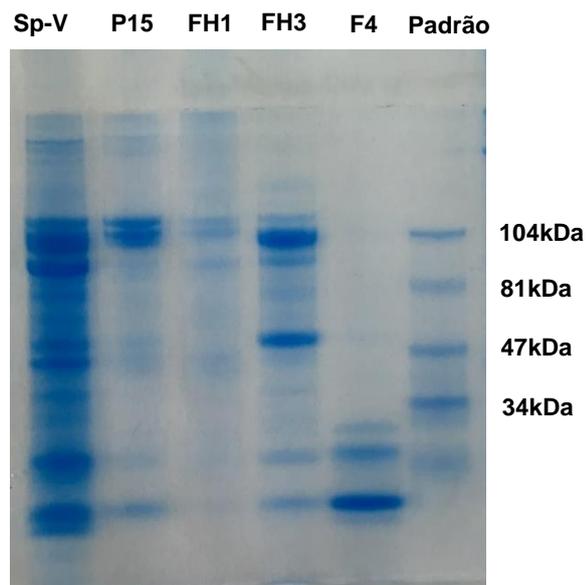


FIGURA 7. PERFIL ELETROFORÉTICO (SDS-PAGE) DA PEÇONHA BRUTA DE *Scorpaena plumieri* E DAS FRAÇÕES OBTIDAS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO. Gel: 10% de acrilamida. Amostras: Sp-V (51 µg), P15 (18 µg), FH1 (24 µg), FH3 (12 µg) e F4 (16 µg).

4.2 Caracterização química

4.2.1 Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de diferentes espécies

Considerando que é bem estabelecido na literatura que venenos de peixes apresentam atividade hemolítica espécie-específica para eritrócitos de coelho (Chhatwal e Dreyer, 1992; Poh et al., 1991), a atividade hemaglutinante foi avaliada sobre eritrócitos de diferentes espécies (humanos, camundongo e coelho) para verificar a especificidade do efeito hemaglutinante do Sp-V. Para esta análise foi utilizada a fração P15.

Como esperado, a atividade hemaglutinante de P15 foi maior em eritrócitos de coelhos (CMH = 40 $\mu\text{g/mL}$), sendo observada com menor intensidade em eritrócitos de camundongo (CMH = 167 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto esta fração não apresentou atividade aglutinante em qualquer tipo de sangue humano.

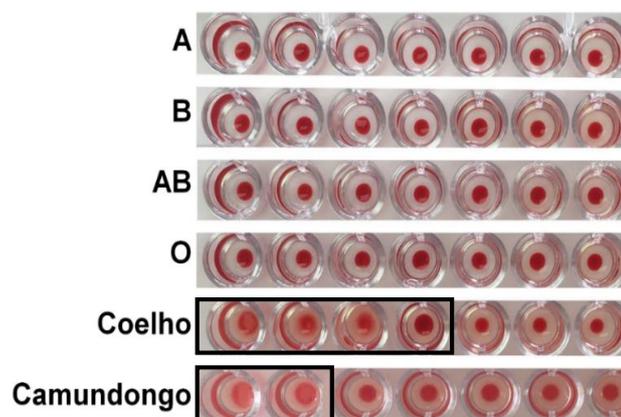


FIGURA 8. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA FRAÇÃO P15 EM ERITRÓCITOS DE DIFERENTES ESPÉCIES. Em placas de microtitulação com fundo cônico, alíquotas de P15 (100 μg) foram incubadas com suspensão de eritrócitos 2% (v/v) após diluição seriada. A hemaglutinação foi visualizada após 24h a 4°C.

4.2.2 Estabilidade da atividade hemaglutinante

Considerando que a estabilidade de uma proteína é um importante e útil critério para a sua caracterização, nós avaliamos a estabilidade da atividade hemaglutinante das frações purificadas quando armazenadas em diferentes temperaturas.

Os resultados mostraram que a atividade hemaglutinante de FH1 e FH3 em eritrócitos de coelho é mantida em 100% quando armazenadas a 4°C e -80°C por 30 dias. Entretanto, ocorre perda de 50% da atividade quando o armazenamento é prolongado por até 60 dias.

O armazenamento de FH1 à temperatura ambiente e à -20°C acarreta perda total de sua atividade. Entretanto nestas temperaturas a atividade de FH3 é mantida em 50% por 7 dias de armazenamento.

Além disto, verificamos que o processo de liofilização não acarreta perda significativa da atividade hemaglutinante dessas amostras (dados não mostrados).

TABELA 2. ESTABILIDADE DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DAS AMOSTRAS FH1 E FH3, APÓS ARMAZENAMENTO EM VÁRIAS TEMPERATURAS.

	7 DIAS		30 DIAS		60 DIAS	
	FH1	FH3	FH1	FH3	FH1	FH3
Temperatura ambiente	0%	50%	0%	0%	0%	0%
4°C	100%	100%	100%	100%	50%	50%
-20°C	0%	50%	0%	0%	0%	0%
-80°C	100%	100%	100%	100%	50%	50%

4.2.3 Dicroísmo circular

Os dados de dicroísmo circular mostraram a presença de estrutura secundária nas frações FH1 (660 µg/mL) e FH3 (550 µg/mL), pois os espectros obtidos a 20°C mostraram a presença de picos de elipticidade molar negativos na faixa entre 210 a 220 nm e positivo na região de 190 a 195 nm (Figura 9A e B) característico de proteínas enoveladas.

Após a deconvolução dos dados de elipticidade molar (insertos das figuras 9), foi possível observar que ambas as frações apresentam um maior conteúdo de folhas-β (≈ 40%). Além disso, esta análise mostrou também pouca alteração nas porcentagens de estruturas secundárias com a variação da temperatura, de 20 a 70°C, demonstrando, assim, grande estabilidade das estruturas secundárias dessa proteína presente nas frações

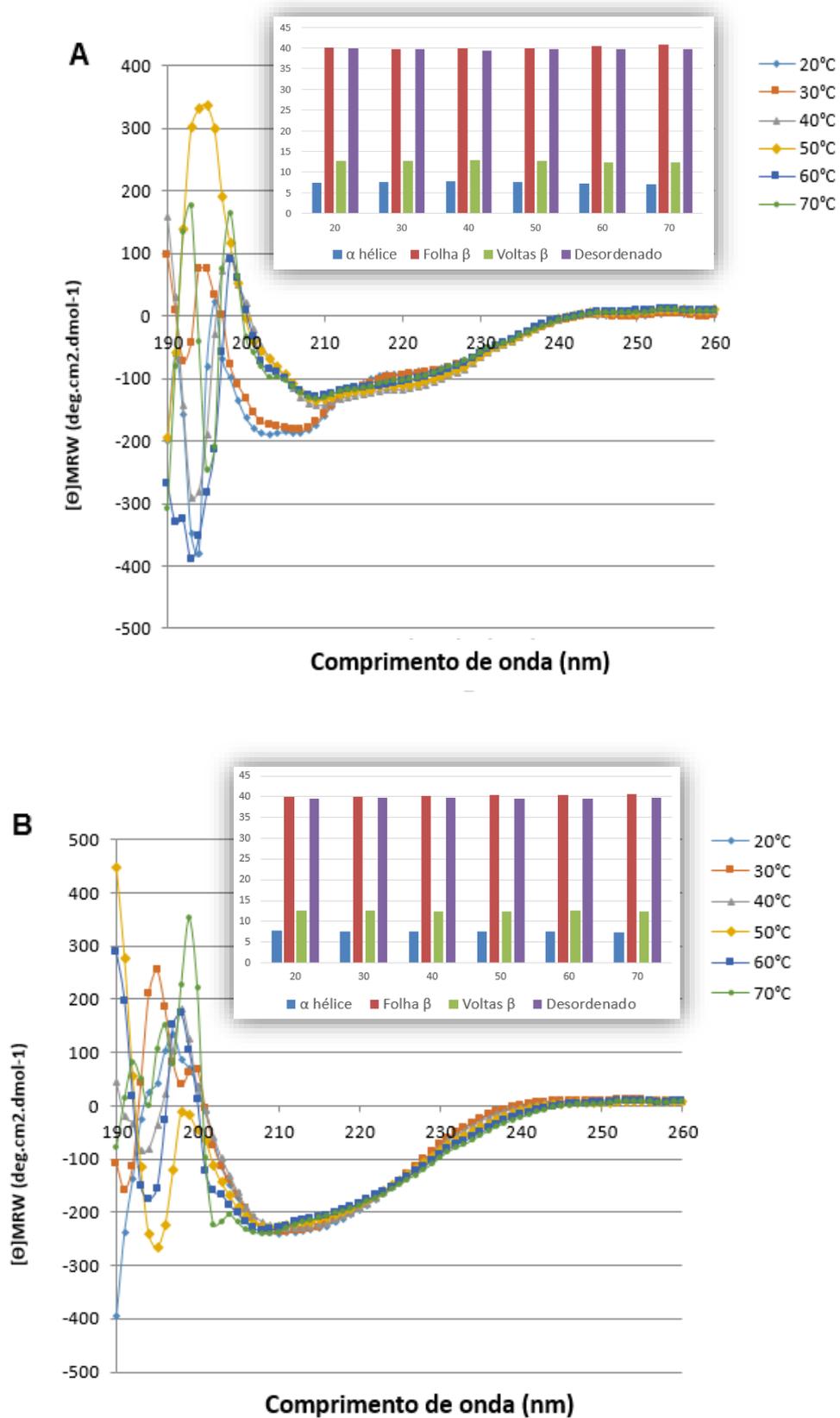


FIGURA 9. DICROÍSMO CIRCULAR DE FH1 E FH3. Espectro de dicróismo circular de FH1 (A) e FH3 (B) em temperaturas variando de 20 a 80°C com varredura de 190 a 260nm; inserto: deconvolução dos dados de elipticidade molar obtidos na plataforma Dicroweb.

4.2.4 Especificidade da atividade hemaglutinante

Para a avaliação da especificidade de ligação, a atividade hemaglutinante de FH1 e FH3 foi ensaiada na presença de carboidratos (galactose, manose, frutose, sacarose e lactose) e EDTA.

Nenhuma das concentrações dos carboidratos testados foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante das frações. Entretanto, a presença de EDTA reduziu $\approx 50\%$ da atividade das frações nas concentrações testadas.

TABELA 3. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR CARBOIDRATOS E EDTA.

	FH1	FH3
Galactose	Negativo	Negativo
Sacarose	Negativo	Negativo
Frutose	Negativo	Negativo
Manose	Negativo	Negativo
Lactose	Negativo	Negativo
EDTA	Inibição parcial	Inibição parcial

4.3 Caracterização funcional

4.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM) antimicrobiana

Considerando que atividade antimicrobiana foi descrita para lectinas (Takahashi et al., 2008; Riera, 2003; Kaws et al., 2011; Costa et al., 2010), foi analisado se FH1 e FH3 apresentam essa atividade.

Ambas as frações inibiram o crescimento de *S. aureus* após incubação a 37°C por 24h, sendo que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para FH1 foi de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e para FH3 foi de 0.20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabela 4). Entretanto, estas não inibiram o crescimento de *E. coli* após a incubação nas mesmas condições.

Também foi observado crescimento bacteriano, quando amostras do incubado das frações FH1 e FH3 no ponto da CIM para *S. aureus* foram transferidas para o

meio BHI. Estes resultados mostram que FH1 e FH3 apresentam efeito bacteriostático e não bactericida sobre *S. aureus*.

TABELA 4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FH1 E FH3 SOBRE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

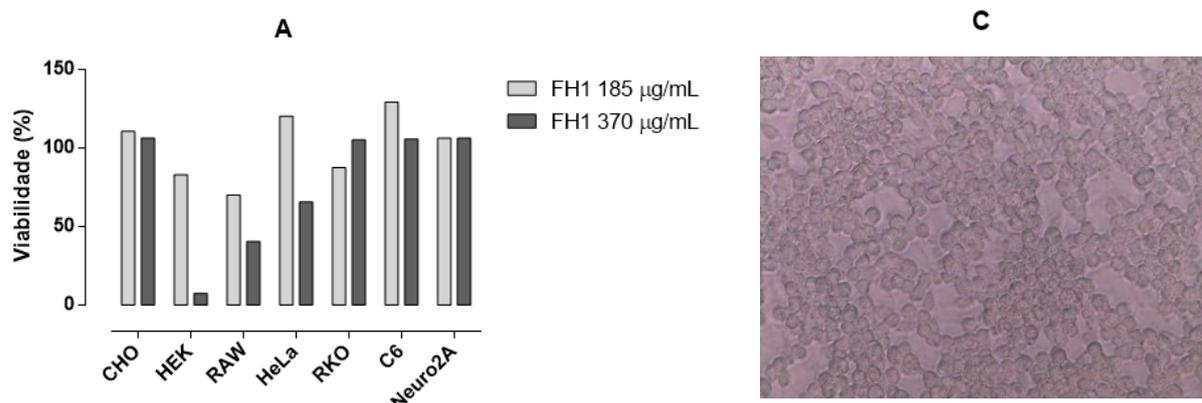
	CIM	
	FH1	FH3
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.05 µg/µL	0.20 µg/µL

4.3.2 Viabilidade celular

Amostras de FH1 e FH3 foram submetidas a um ensaio de viabilidade celular sobre sete linhagens celulares, normais: embrionárias de rim humano (HEK293), ovário de hamster chinês (CHO), macrófago murino (RAW); e neoplásicas: neuroblastoma de rato (Neuro2A), glioma de rato (C6), carcinoma de colón humano (RKO) e câncer cervical humano (HeLa).

FH3 se mostrou citotóxica para todas as linhagens utilizadas nas doses testadas (185 µg/mL e 370 µg/mL), com exceção da linhagem Neuro2A (Figura 10A).

Entretanto foi observado que FH1 somente foi citotóxica na maior dose (370 µg/mL) e somente para três das sete linhagens utilizadas no ensaio (HEK293, RAW e HeLa), (Figura 10-B). Estes dados demonstram que estas frações são citotóxicas para células em geral, sem especificidade para o câncer. Imagens representativas do crescimento celular - visualizadas por microscopia ótica - da linhagem C6 são mostradas na figura 10 C-D.



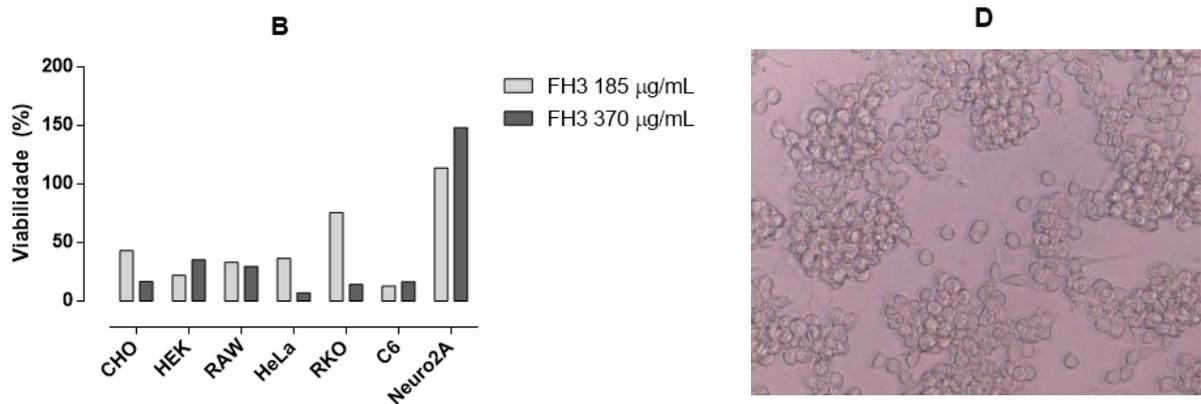


FIGURA 10. EFEITO DAS AMOSTRAS FH1 E FH3 NA VIABILIDADE CELULAR EM LINHAGENS DE CÉLULAS (CHO, HEK, RAW, HeLa, RKO, C6 E Neuro2A). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico da resazurina com leitura de densidade óptica a 570 e 600 nm. (A) Efeito na viabilidade celular provocado pela fração FH1. (B) Efeito na viabilidade celular provocado pela fração FH3. (C) Microscopia eletrônica de células da linhagem C6 - controle e (D) Microscopia eletrônica de células da linhagem C6 após aplicação de 370 µg/mL de FH3. Aumento: 40x.

4.3.3 Atividade edematogênica

O teste da pata de camundongo foi utilizado para avaliar a atividade/resposta edematogênica induzida por 100 µg das frações hemaglutinantes.

Apesar de, na dose utilizada FH1 e FH3 induzirem respectivamente um aumento na espessura da pata de $24.3 \pm 6.4\%$ e $15.8 \pm 4.8\%$, estes valores não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

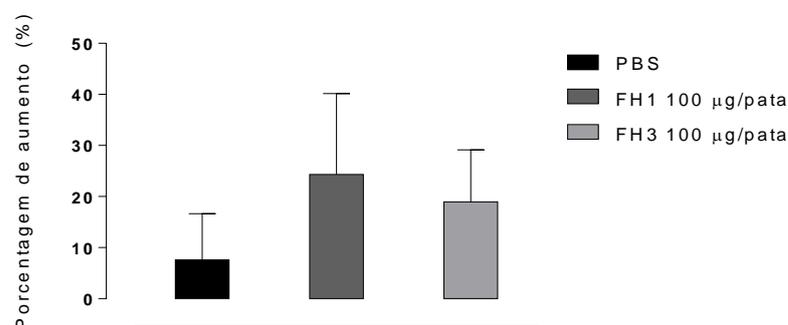


FIGURA 11. ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DAS FRAÇÕES HEMAGLUTINANTES FH1 E FH3. Doses de 100 µg de FH1 e FH3 em 30 µL de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. Controle: 30 µL de PBS. O edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata após 30min da injeção. Resultados expressos pela média \pm EPM.

4.3.4 Reatividade vascular

Em um ensaio preliminar, foi avaliado o efeito de FH1 e FH3 (5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) na reatividade vascular em anéis íntegros isolados de artéria aorta torácica de ratos. Como demonstrado na figura 12A, quando aplicados em anéis sem prévia modificação do tônus, nenhuma das frações isoladamente ou co-incubadas foi capaz de modificar a tensão nas artérias.

Entretanto, os resultados mostram que FH1 induz um efeito vasodilatador concentração-dependente sobre os anéis previamente contraídos (Figura 12B). Ademais, FH3, nas doses testadas, induziu efeito discreto e sem significância estatística. Finalmente, a co-incubação das duas frações evidenciou que o efeito vasodilatador de FH1 não é potencializado ou inibido.

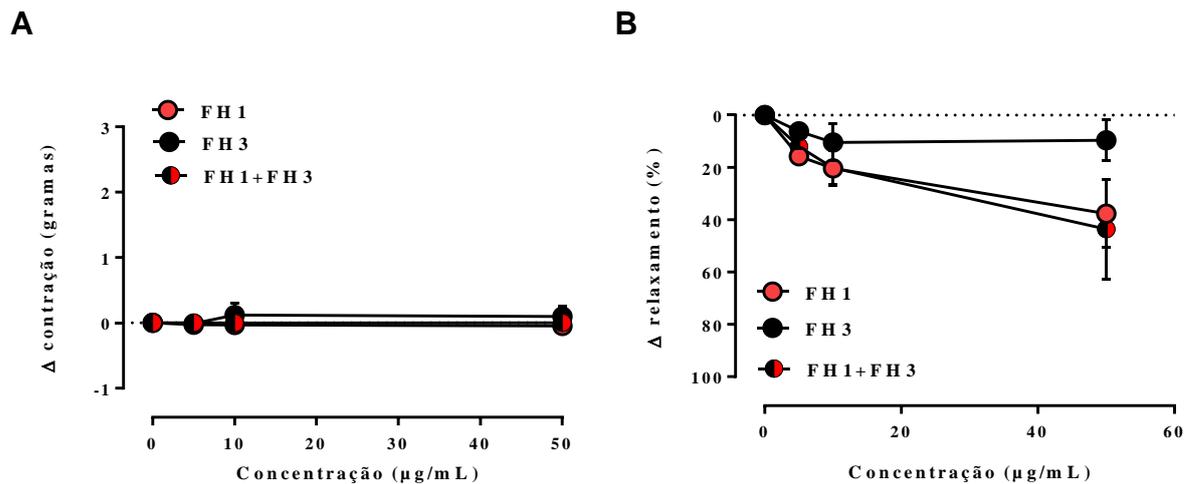


FIGURA 12. EFEITOS DE FH1 E FH3 NA REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA DE RATOS. Doses de 5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de FH1 e FH3 isoladamente ou co-incubadas foram testadas em anéis sem intervenção prévia (A) para análise de possível efeito vasoconstrictor, ou após pré-contracção com fenilefrina (B) para análise de possível efeito vasodilatador.

5. DISCUSSÃO

Como já descrito anteriormente, peçonhas animais são coquetéis altamente complexos de componentes bioativos que incluem proteínas, peptídeos e mediadores químicos. O estudo desses componentes pode contribuir para várias áreas biológicas como farmacologia, imunologia e também biologia molecular, pois são úteis para a investigação de mecanismos moleculares de processos fisiopatológicos. Nas últimas três décadas, foram obtidos grandes avanços na caracterização de toxinas de animais peçonhentos, os quais possibilitaram o desenvolvimento de novos fármacos com aplicações variadas (Grgic *et al.*, 2005; Smith e Wheeler, 2006).

Entretanto, devido a algumas dificuldades técnicas e características inerentes de peçonhas de peixes – como a labilidade de seus principais componentes ativos - estas permanecem pouco exploradas, quando comparada com as de animais terrestres (Schaeffer *et al.*, 1971; Church & Hodgson, 2002; Campos *et al.*, 2016).

No litoral do Brasil, o peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* é o mais venenoso (Haddad Jr. *et al.*, 2003). Os sintomas de envenenamento pelo *S. plumieri* envolvem severos efeitos locais como dor e edema. Efeitos sistêmicos como alterações cardiovasculares e respiratórias também já foram descritos para esta peçonha (Campos *et al.*, 2016). Estes efeitos têm sido associados a proteínas isoladas e caracterizadas a partir deste veneno - nas últimas duas décadas - pelo grupo de pesquisa LQP-UFES. Dentre estas proteínas foram identificadas duas hidrolases: uma com atividade proteolítica sobre gelatina – Sp-G – (Carrizo *et al.*, 2005) e a outra sobre o glicosaminoglicano hialuronato – Sp-H – (Cassoli *et al.*, 2008) e também uma potente toxina formadora de poro – Sp-CTx –, uma citolisina responsável pelos principais sintomas do envenenamento pelo *S. plumieri*. Citolisinas são responsáveis pela intensa atividade hemolítica e cardiovascular observada para peçonhas de peixes do gênero Scorpaenidae. Dois tipos de lectinas também foram descritas na peçonha de *S. plumieri*, (i) Plumieribetin, uma proteína homóloga a lectinas tipo B com atividade inibitória de ligação a integrinas (Evangelista *et al.*, 2009). Essa proteína inibe a ligação de integrinas ($\alpha 1\beta 1$) ao colágeno do tipo IV da membrana basal. Esse efeito inibidor da interação de integrinas com proteínas fibrilares na matriz extracelular adiciona uma nova função à família de lectinas tipo B, além do seu conhecido papel na defesa contra patógenos (Evangelista *et al.*, 2009). E também (ii) cinco isoformas de lectinas (Sp-Lec 1-5) homólogas a lectinas do tipo C de outros peixes (*Trachidermus fasciatus*, *Anguilla japonica*, *Thalassophryne nattereri*, *Epinephelus*

coioides, *Epinephelus bruneus*, *Pleurodeles waltl*) também foram isoladas da peçonha do *S. plumieri* (Andrich *et al.*, 2015).

Além destas duas lectinas descritas na peçonha do *S. plumieri*, somente mais uma foi isolada de peçonhas de peixe: a Nattectin, lectina tipo C da peçonha do peixe-sapo *Thalassophryne nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 2011). Provavelmente, essa escassez de dados sobre lectinas de venenos de peixes deve-se à intensa atividade hemolítica desses venenos, o que mascara a atividade aglutinante característica de lectinas, dificultando sua identificação pelo teste de hemaglutinação.

Como citado acima, o isolamento e algumas características bioquímicas de cinco isoformas de lectinas tipo C na peçonha do *S. plumieri* já foram descritos por Andrich e colaboradores em 2015. No isolamento destas isoformas foi utilizado como primeira etapa uma cromatografia de filtração molecular a qual foi efetiva em separar a fração hemolítica do veneno daquela hemaglutinante. Quando submetida a SDS-PAGE, a fração hemaglutinante apresentou uma banda intensa com massa molecular correspondente a ≈ 15 kDa e foi resolvida em cinco picos principais (RP1-5) com tempo de retenção muito similares e massas de 16,991, 16,982, 16,975, 16,841 e 16,842 m/z, por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). Considerando que as condições da última etapa de purificação utilizada por estes autores – fase reversa – podem acarretar em desnaturação proteica devido à acidez e polaridade dos eluentes, as isoformas foram obtidas na forma inativa, o que impossibilitou a caracterização biológica das mesmas.

Nossa motivação para o estudo de moléculas aglutinantes da peçonha do *S. plumieri* foi dada, em grande parte, pela grande variabilidade estrutural e funcional de lectinas tipo C, as quais são comuns em secreções produzidas por glândulas de veneno (Chen e Tsai, 1995; Polgár *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 2005). Em peçonhas animais, estas moléculas aglutinantes têm sido associadas a vários efeitos patofisiológicos gerados por esses venenos, tais como citotoxicidade para linhas de células tumorais (Aranda-Souza *et al.* 2014; Nunes *et al.* 2012; Hammouda *et al.* 2018), atividades pró-inflamatórias (Saraiva *et al.* 2011; Ishizuka *et al.* 2012; Dias-Netipanyj *et al.* 2016), atividade antibacteriana (Nunes *et al.* 2011), aglutinação de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Castanheira *et al.* 2013), dentre outros.

Neste trabalho nós purificamos duas frações hemaglutinantes da peçonha do *S. plumieri*, sendo o processo acompanhado pela indução de aglutinação em

eritrócitos de coelho, os quais foram experimentalmente comprovados como sendo os mais susceptíveis à aglutinação por estas frações. Também demonstramos que, além da atividade hemaglutinante, estas frações apresentaram atividade bacteriostática, citotóxica e cardiovascular.

O processo de purificação envolveu duas etapas de fracionamento: (1) precipitação salina e (2) cromatografia de filtração molecular em sistema HPLC. Uma fração hemaglutinante foi obtida por precipitação com 15% de sulfato de amônio e denominada P15. Essa fração, constituída pelas proteínas menos hidrofílicas do Sp-V, apresentou uma CMH de 0.40 µg/mL e representou 22% das proteínas totais do veneno. Esta etapa permitiu a detecção da atividade hemaglutinante, pois a atividade hemolítica presente no Sp-V está associada às proteínas mais hidrofílicas do veneno, que precipitam com 35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gomes *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que a atividade hemolítica é uma característica inerente de peçonhas de peixes e sabe-se que eritrócitos de coelho são particularmente sensíveis para essa atividade (Kreger, 1991; Shiomi *et al.*, 1989). Duhig e Jones (1928) e Kreger (1991) demonstraram que as peçonhas dos peixes-pedra *Synanceja horrida* e *Synanceja trachynis* apresentam uma baixa atividade sobre eritrócitos humanos, porém a maior susceptibilidade está de fato sobre os eritrócitos de coelho.

Como essa primeira etapa de purificação - além de ser econômica e fácil de executar - produziu grandes quantidades da fração hemaglutinante ativa, optamos por usar o P15 para rastrear a especificidade desta atividade em relação a diferentes espécies e tipos sanguíneos. P15 foi capaz de aglutinar principalmente eritrócitos de coelho e, em menor intensidade, eritrócitos de camundongo. Porém, nenhuma atividade foi observada nos tipos sanguíneos humanos utilizados. Assim, a exemplo do observado para a atividade hemolítica descrita para a peçonha do *S. plumieri* (Gomes *et al.*, 2013), foi demonstrado que eritrócitos de coelho são os mais susceptíveis à hemaglutinação, seguidos pelos de camundongo.

A especificidade da atividade hemaglutinante associada a venenos animais parece ser aleatória. Por exemplo, uma lectina tipo C isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus* – BIL –, foi capaz de aglutinar principalmente eritrócitos de coelho, assim como nos nossos resultados (Nunes *et al.*, 2011). No entanto, existem relatos de outras moléculas atuando em eritrócitos de diferentes espécies, como por exemplo, a Nettekín, uma lectina tipo C da peçonha do peixe *T. nattereri*, que apresentou aglutinação em humanos tipo A (Lopes-Ferreira *et al.* 2011); a BjuL, lectina da

peçonha da serpente *B. jararacussu*, que aglutinou eritrócitos de porco, humano e vaca (Carvalho *et al.* 1998); e a BpLec, lectina presente na peçonha da serpente *B. pauolensis*, que promoveu aglutinação de eritrócitos de gato e cachorro (Castanheira *et al.* 2013).

Até onde se sabe, a razão por trás dessa ampla especificidade quanto a espécies observada para a atividade hemaglutinante de venenos permanece desconhecida, embora seja provavelmente devida à expressão de tipos diferentes de glicoproteínas de membrana em cada célula. Como a atividade hemaglutinante do Sp-V se mostrou específica para eritrócitos de coelho, todos os demais ensaios hemaglutinantes foram realizados usando apenas essas células sanguíneas.

Como segunda etapa de purificação, a fração P15 foi resolvida em seis principais picos proteicos por cromatografia de filtração molecular em uma coluna Superose 12. A atividade hemaglutinante estava associada aos picos 1 e 3, denominados Fração Hemaglutinante 1 e 3 (FH1 e FH3), que representaram respectivamente 0,52% e 0,74% do Sp-V e com CMH de 0,02 e 0,50 µg/mL. Portanto, a atividade hemaglutinante associada ao FH1 foi 20 vezes maior que a do P15 (0,02 vs. 0,40 µg/mL), enquanto FH3 exibiu aproximadamente o mesmo nível de atividade que P15 (0,50 vs. 0,40 µg/mL). Embora a CMH não possa ser determinada no Sp-V – devido à forte atividade hemolítica presente no veneno –, os rendimentos obtidos com P15, FH1 e FH3 atestam a eficiência do protocolo de purificação empregado.

A análise do perfil proteico das frações hemaglutinantes por SDS-PAGE mostrou a presença de bandas de alto peso molecular (≈ 100 kDa) em FH1 juntamente com uma banda de ≈ 45 kDa. Enquanto FH3 apresentou – além das bandas de alto peso – bandas de ≈ 19 kDa e ≈ 5 kDa. Essas mesmas bandas de baixo peso molecular foram observadas em F4, uma fração que não mostrou atividade hemaglutinante.

Neste ponto é interessante mencionar que existem evidências que indicam que as lectinas do tipo C possuem estruturas oligoméricas que são ativas quando formam grandes arranjos supramoleculares (Eble 2019), e que, embora as isolectinas isoladas de Sp-V tenham apresentado homologia de sequência com lectinas do tipo C de outros peixes, elas não apresentaram atividade hemaglutinante (Andrich *et al.* 2015). Isso pode ter sido resultado do processo de purificação destas moléculas, na qual foi utilizada uma cromatografia de fase reversa, um método não-fisiológico que dificulta a formação de oligômeros, o que provavelmente resultou no isolamento de formas monoméricas inativas. Essa hipótese se torna ainda mais consistente pelo fato de que

a espectrometria de massas da fração que continha as isoformas monoméricas também revelou sinais de m/z múltiplos de 16-17 kDa, ou seja, 34, 51 e 68 kDa.

Considerando os dados do perfil proteico das frações hemaglutinantes obtidas neste trabalho, juntamente com os dados descritos por Andrich e colaboradores (2015), pode-se sugerir que FH1 e FH3 possuem, além de outras proteínas, formas oligoméricas de lectinas tipo C. Embora neste momento essas informações sejam apenas hipóteses, pode-se sugerir também que em FH1 os monômeros estariam totalmente agregados em hexâmetros e trímeros, correspondendo, respectivamente, às bandas de ≈ 100 e ≈ 45 kDa observadas no perfil proteico dessa fração, o que explicaria o fato de FH1 ser mais ativo que FH3 e também o motivo de F4 não apresentar atividade, o qual supomos conter somente formas monoméricas das Sp-LCs.

Tentativas utilizando cromatografias de troca aniônica (coluna HiTrap™ Q HP) e de interação hidrofóbica (coluna HiTrap™ Butyl HP) em condições pouco agressivas, foram realizadas para obtenção de lectinas de forma homogênea e ativa, mas infelizmente não obtivemos sucesso. Apesar de não isoladas, as frações obtidas neste trabalho apresentam atividade hemaglutinante potente e foram úteis para realização de ensaios para caracterização bioquímica e funcional das mesmas.

Primeiramente, considerando que a estabilidade de uma proteína é um importante e útil critério para a sua caracterização, a manutenção da estabilidade destas moléculas frente ao armazenamento possibilita estudos futuros sobre as atividades das mesmas. Algumas dessas atividades são extremamente sensíveis a variações físico-químicas do meio, tais como pH, concentração de sais, temperatura, liofilização, congelamentos e descongelamentos sucessivos (Schaeffer *et al.*, 1971).

Dessa forma, visando definir a melhor forma de armazenamento para a manutenção da atividade hemaglutinante das frações purificadas, nós avaliamos a estabilidade desta atividade frente ao armazenamento como também a estabilidade de estruturas secundárias em várias temperaturas.

Nossos resultados demonstraram que a atividade de soluções das frações hemaglutinantes em eritrócitos de coelho é totalmente preservada quando as mesmas são armazenadas a 4°C e -80°C, por até 30 dias, perdendo cerca de 50% de sua atividade quando armazenadas nestas mesmas condições por até 60 dias. Entretanto, o armazenamento de FH1 e FH3 a -20°C (temperatura normalmente usada para o

armazenamento de soluções proteicas) e a temperatura ambiente, acarretou perda significativa desta atividade em 7 dias de armazenamento.

A perda de atividade de proteínas em solução quando congeladas a -20°C é descrita para várias proteínas, e, de acordo com Bhatnagar e colaboradores, várias mudanças físicas acompanham o congelamento lento que ocorre nesta temperatura resultando em diversos tipos de estresse, como a formação de gelo, o aumento da concentração de soluto devido à cristalização da água, a cristalização eutética de solutos de tampão, além de modificações de pH, que são capazes de levar à desnaturação proteica (Bhatnagar et al., 2007). Ao contrário do congelamento lento, o congelamento que ocorre de forma rápida a -80°C não acarreta os estresses descritos acima e, portanto, não causa – ou causa em menor extensão –, danos à estrutura proteica (Shikama e Yamazaki, 1961).

Ainda para avaliar a estabilidade estrutural de FH1 e FH3, estas foram analisadas por dicroísmo circular e foi demonstrado que estas frações apresentam alta estabilidade de suas estruturas secundárias, uma vez que se mantiveram íntegras quando submetidas à uma variação temperatura de 20 a 70°C . Além disto, FH1 e FH3 mostraram perfil similar, com ambas possuindo maior conteúdo de folhas- β ($\approx 40\%$) e uma menor proporção das outras estruturas secundárias regulares (voltas β e α -hélices). Estes dados corroboram nossa hipótese de que essas frações aglutinantes consistem de agregados da mesma molécula – possivelmente as isolectinas (Sp-LCs) isoladas por Andrich *et al.* em 2015, visto que há evidências de que as estruturas de lectinas tipo C compreendem principalmente folhas- β (Eble, 2019)

Vários processos bioquímicos/biológicos fundamentais como comunicação celular, resposta imune, fertilização, infecções parasitárias, microbianas, viróticas e metástase de tumores são mediados por interações lectina-glicoconjugados (Gabiús, 1997). A capacidade e especificidade de ligação a açúcar de lectinas é extremamente importante para estes processos. À vista disso, as lectinas, por serem proteínas de ligação a carboidratos, podem ter sua atividade aglutinante em eritrócitos inibida pela presença de moléculas de açúcar específicas no ensaio de aglutinação (Nunes *et al.* 2011; Castanheira *et al.* 2013).

Como existe uma forte probabilidade de que a atividade hemaglutinante associada ao Sp-V esteja relacionada às isoformas de Sp-LCs que demonstraram se ligar muito fracamente à galactose (Andrich *et al.* 2015), nós avaliamos se essa atividade poderia ser inibida por este e alguns outros carboidratos (mono- e

dissacarídeos). A atividade hemaglutinante de FH1 e FH3 foi, portanto, avaliada na presença de galactose, manose, frutose, sacarose e lactose. Entretanto, estes carboidratos (5, 10 e 30 mM) não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante dessas frações.

Corroborando este dado, alguns estudos têm sugerido que a interação entre lectinas e carboidratos depende de arranjos de monossacarídeos em estruturas de oligossacarídeos. Por exemplo, a ligação da Plumieribetin (lectina tipo B presente na peçonha do *S. plumieri*) com resíduos de manose foi fraca, entretanto, ela foi capaz de se ligar fortemente a um tetramanosídeo linear (Evangelista *et al.*, 2009).

Juntamente com sua especificidade de ligação a carboidratos, sabe-se que as lectinas do tipo C geralmente dependem de Ca^{2+} para a efetividade de suas atividades biológicas (para revisão, ver Eble 2019). Neste trabalho demonstramos que tanto FH1 quanto FH3 tiveram sua atividade hemaglutinante reduzida em $\approx 50\%$ quando incubadas com EDTA, o que mostra sua dependência de cátions divalentes, corroborando o assumido acima de que essas frações contêm lectinas tipo C.

Vários estudos mostram que venenos animais possuem atividade antimicrobiana, a qual tem sido associada à presença de moléculas hemaglutinantes (Rádis-Baptista *et al.* 2006; Barbosa *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2011; Castanheira *et al.* 2013). O potencial antimicrobiano de moléculas de veneno tem atraído muita atenção nos últimos anos, (p. ex., um potente peptídeo antimicrobiano da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha* foi descrito e patenteado (Melo-Braga *et al.*, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, infecções bacterianas estão entre as 10 principais causas de mortes no mundo, especialmente devido à presença de cepas multirresistentes aos antibióticos convencionais, tais como penicilina, metilicina etc., o que tem aumentado os riscos dessas infecções e tornado o tratamento mais difícil (OMS, 2011). Devido a isso, o interesse na investigação de novos agentes antimicrobianos seguros e eficazes tem aumentado nos últimos anos (Pelgrift & Friedman, 2013; Costa *et al.*, 2015).

Em 2018, nosso grupo demonstrou que o Sp-V apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), enquanto as Gram-negativas (*E. coli*) foram consideravelmente menos afetadas pelo veneno (Borges *et al.* 2018). Uma análise proteômica de abordagem “Shot Gun” do veneno do *S. plumieri* revelou que este extrato contém fragmentos de proteínas homólogas a lectinas do tipo C (Borges *et al.*, 2018). Considerando o potencial antimicrobiano de lectinas, e o fato

de termos assumido que FH1 e FH3 consistem de agregados de monômeros de lectinas tipo C hemaglutinantes ativos, nós avaliamos se as frações purificadas eram capazes de reproduzir os efeitos antibacterianos associados ao extrato venenoso do *S. plumieri*. Neste trabalho foi demonstrado que FH1 e FH3 apresentaram um efeito bacteriostático para o *S. aureus*, com uma concentração inibitória mínima respectivamente de 0,05 µg/µL e 0,20 µg/µL. Entretanto, as frações não foram capazes de inibir o crescimento de *E coli*.

A atividade inibitória dessas frações sobre bactérias gram-positivas (*S. aureus*) pode sugerir que as moléculas contidas nas mesmas – provavelmente lectinas tipo C – são capazes de interagir com heteropolissacarídeos do peptidoglicano presente na parede celular dessas bactérias, conforme sugerido por Costa et al. (2010). Entretanto, a interação lectinas-parede celular não ocorre com bactérias gram-negativas, que apresentam baixas proporções de peptidoglicanos na parede celular, o que impossibilita ou dificulta a interação proteína-carboidrato.

Em adição ao efeito antimicrobiano de lectinas, o efeito antitumoral também tem sido explorado para estas moléculas (Aranda-Souza et al., 2014; Jebali et al., 2014; Hammouda et al., 2018). O efeito das frações FH1 e FH3 foi testado em quatro linhagens de células tumorais e em três linhagens de células normais.

Os resultados mostraram que ambas as doses de FH3 (185 µg/mL e 370 µg/mL) foram citotóxicas para todas as linhagens utilizadas, com exceção da Neuro2A. Entretanto, FH1 foi citotóxica somente na maior dose (370 µg/mL) para três das sete linhagens utilizadas (duas linhagens normais – HEK e RAW – e uma tumoral – HeLa). Portanto, apesar do potencial antitumoral de lectinas ser amplamente descrito na literatura, nossos dados demonstram que as frações hemaglutinantes da peçonha do *S. plumieri* são na verdade, citotóxicas, visto impediram o crescimento tanto de células tumorais quanto normais. De acordo com Mukherjee (2014), o efeito antimicrobiano de lectinas tipo C pode ser associado à capacidade destas moléculas em formar poros oligoméricos na membrana de microorganismos. Dessa forma, pode-se sugerir que esse mecanismo de ação também poderia responder pelo efeito citotóxico observado com as nossas frações, visto que um aumento na permeabilidade da membrana pode levar à lise. Todavia, não podemos descartar a possibilidade de que FH1 e FH3 possam conter, além das supostas lectinas tipo C, outras moléculas bioativas capazes de promover citotoxicidade.

A despeito de todas as atividades descritas acima, a maioria das pesquisas envolvendo venenos de peixes têm como foco os efeitos cardiovasculares e inflamatórios desses venenos, que respondem pelos principais sintomas observados no envenenamento (Junqueira *et al.*, 2007; Sivan *et al.*, 2007). Em relação ao envenenamento pelo *S. plumieri*, apesar destes efeitos serem atribuídos principalmente à Sp-CTx – toxina multifuncional da peçonha deste peixe (Malacarne *et al.*, 2018) – outras moléculas, como as lectinas, também podem estar envolvidas nestes efeitos induzidos por esta peçonha.

A lectina da alga *Bryothaminiun triquetrum* (Lima, *et al.*, 2004) e as lectinas das plantas da subtribo *Diocleinae Canavalia maritima* e ConA (Gadelha *et al.*, 2005), por exemplo, apresentaram efeito vasodilatador. Isso nos levou a indagar se as frações hemaglutinantes do *S. plumieri* seriam capazes de apresentar um efeito similar. Neste trabalho, em um experimento preliminar (N=2-4), nós demonstramos que, assim como as lectinas citadas acima, a fração FH1 induziu uma resposta vasodilatadora concentração-dependente sobre anéis isolados de aorta de ratos chegando a relaxar aproximadamente 40% da contração prévia. Entretanto, embora alguma queda no tônus vascular tenha sido notada com a incubação de FH3, nenhuma das concentrações testadas de FH3 apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a reatividade vascular. Ademais, a incubação com nenhuma das frações promoveu efeito inverso, ou seja, vasoconstrictor, em nenhuma das concentrações testadas. Finalmente, a administração conjunta de FH1 e FH3 não acarretou em potencialização ou inibição do efeito vasodilatador apresentado por FH1.

Entretanto, como já mencionado, este é um experimento preliminar cujo resultado precisa ser confirmado por novas tentativas, utilizando-se um N amostral maior, assim como diferentes concentrações das amostras e algumas incubações com inibidores de vias importantes de vasodilatação.

Ainda, considerando que existem evidências de que as lectinas do tipo C de venenos animais são capazes de atuar como moléculas pró-inflamatórias (Saraiva *et al.* 2011; Ishizuka *et al.* 2012; Dias-Netipanyj *et al.* 2016), é razoável supor que as frações hemaglutinantes do Sp-V também possam participar da resposta inflamatória observada no envenenamento. Dessa forma, em um experimento preliminar (N=6), nós avaliamos o potencial pro-inflamatório – resposta edematogênica – das frações FH1 e FH3 (100 µg) através do ensaio da pata de camundongo. Apesar de uma clara tendência de aumento na espessura da pata após a injeção das frações ter sido

observada, o edema produzido nos animais que receberam FH1 e FH3 não foi estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle. Isso pode ser resultado da grande variabilidade observada nas medidas pelo método utilizado. Esse experimento será repetido utilizando uma metodologia que mede com maior exatidão o edema (p. ex., uso de um pletismômetro), assim como, se possível, uma amostragem experimental maior.

Consideramos que o presente trabalho contribuiu para a caracterização bioquímica e farmacológica de frações hemaglutinantes presentes na peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, o que foi possível como resultado do estabelecimento de um protocolo de purificação robusto. Embora não tenhamos conseguido isolar a molécula hemaglutinante, este protocolo nos permitiu obter grandes quantidades de frações hemaglutinantes ativas. Demonstramos que esta atividade, que é específica para eritrócitos de coelho e Ca^{2+} -dependente, permanece estável quando as frações são armazenadas a 4°C e -80°C por até 30 dias. Também foi demonstrado que as atividades bacteriostática, citotóxica e cardiovascular estão associadas a essas frações. Além disso, sugerimos um papel pro-inflamatório para essas frações hemaglutinantes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho gerou conhecimentos sobre a atividade hemaglutinante da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* que excedem as investigações prévias descritas na literatura.

- ✓ Foram identificadas e semi-purificadas duas frações hemaglutinantes (FH1 e FH3) da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, utilizando-se duas etapas de purificação: precipitação salina e cromatografia de filtração molecular;
- ✓ Estas frações ativas provavelmente consistem de agregados da forma monomérica inativa de lectinas tipo C;
- ✓ Foram estabelecidas condições térmicas efetivas para a manutenção da atividade hemaglutinante destas frações;
- ✓ Foi identificada a presença de estruturas secundárias regulares (folhas β) em ambas as frações hemaglutinantes;
- ✓ As frações hemaglutinantes apresentaram efeito bacteriostático sobre bactérias Gram-positivas;
- ✓ As frações hemaglutinantes são citotóxicas para linhagens de células tumorais e normais;
- ✓ FH1 apresentou efeito vasodilatador sobre anéis de artérias de aorta torácica de ratos.

7. PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos neste trabalho, vislumbramos as seguintes perspectivas em um futuro próximo:

- Traçar novas estratégias para promover o isolamento de proteínas hemaglutinantes – lectinas na forma nativa – da peçonha do *S. plumieri*;
- Realizar os ensaios biológicos (hemaglutinante, antimicrobiano, edematogênico, citotóxico e cardiovascular) com a(s) proteína(s) isolada(s);
- Determinar características bioquímicas da(s) proteínas(s) isoladas(s):
 - Determinação do ponto isoelétrico;
 - Determinar a estrutura primária - sequência de aminoácidos;
 - Pesquisar homologia com proteínas depositadas em bancos de dados;
- Avaliar a especificidade de ligação para carboidratos;
- Confirmar se a forma funcional destas proteínas aglutinantes consistem de unidades oligoméricas (análise de espectrometria de massas MS-MS e/ou *crosslinking* químico da unidade monomérica).

8. REFERÊNCIAS

- ANDRICH, F. *et al.* A potent vasoactive cytolysin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon*, v. 56, p. 487–496, 2010.
- ANDRICH, F. *et al.* Identification of C-type isolectins in the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. *Toxicon*, v. 95, p. 67-71, 2015.
- ARANDA-SOUZA, M.A. *et al.* A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition, *Toxicon*, v. 82, p. 97-103, 2014.
- ASHWELL, G., HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Ver. Biochem.*, v. 51, 531-534, 1982.
- ASHWELL, G., MORELL, A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v.41, 99-128, 1974.
- AUDDY, B., ALAM, M.I., GOMES, A. Pharmacological actions of the venom of the Indian catfish (*Plotosus canius* Hamilton). *Indian J. Med. Res.*, v.99, 47–51, 1994.
- AUDDY, B., MUHURI, D.C., ALAM, M.I., GOMES, A. A lethal protein toxin (toxin-PC) from the Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. *Nat. Toxins*, v. 3, p. 363–368, 1995.
- BARBOSA P.S.F. *et al.* Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. *J. Venomous. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 16, p. 493-504, 2010.
- BHATNAGAR, B.S.; BOGNER, R.H.; PIKAL, M.J. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.*, v. 12, p. 505-523, 2007.
- BORGES MH, ANDRICH F, LEMOS PH, SOARES TG, MENEZES TN, CAMPOS FV, NEVES LX, CASTRO-BORGES W, FIGUEIREDO SG. Combined proteomic and functional analysis reveals rich sources of protein diversity in skin mucus and venom from the *Scorpaena plumieri* fish. *J. Proteomics*, v. 187, p. 200-211, 2018.
- BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, v. 119, p. 419, 1954.
- CALVETE, J.J. *et al.* Venomn, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.*, v. 583, p. 1736-1743, 2009.
- CAMPOS, F.V. *et al.*, A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 22, p. 35, 2016.
- CARRIJO, L.C. *et al.* Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, v.45, p. 843-850, 2005.
- CARVALHO DD, MARANGONI S, OLIVEIRA B, NOVELLO JC. Purification and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem. Bio.l Mol. Inter.*, v. 44: 933-938, 1998.
- CARVALHO, D. D. *et al.* Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon*, v. 39, p. 1471-1476, 2001.
- CARVALHO-FILHO, A. Peixes: Costa Brasileira. São Paulo: Melro, p. 92-94, 1999.
- CASSOLI, J.S. Purificação e caracterização bioquímica parcial de uma hialuronidase presente da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- CASTANHEIRA LE, NUNES DC, CARDOSO TM, SANTOS P, GOULART LR, RODRIGUES RS, RICHARDSON M, BORGES MH, YONEYAMA KA, RODRIGUES VM. Biochemical and functional

- characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 54, p. 57-64, 2013.
- CHHATWAL, I., DREYER, F. Biological properties of a crude venom extract from the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon*, v. 30, p. 77-85, 1992a.
- CHHATWAL, I.; DREYER, F. Isolation and characterization of dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon*, v. 30, p. 87-93, 1992.
- CHURCH, J.E., HODGSON, W.C. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon* v. 40, p. 787-796, 2002a.
- CHURCH, J.E., HODGSON, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, v. 40, p. 1083-1093, 2002b.
- CLEMETSON, K.J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon*, v. 56, p. 1236-1246, 2010.
- COHEN, A.S., OLEK, A.J. An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. *Toxicon*, v.27, p. 1367-1376, 1989.
- COLASANTE, C. *et al.* Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.*, v.8, p. 2149-2156, 1996.
- COSTA, R.M.P.B. *et al.* A new mistletoe *Phthiirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 526-533, 2010.
- COSTA, T.R. *et al.* Evaluating The Microbicidal, Antiparasitic And Antitumor Effects Of CR-LAAO From *Calloselasma rhodostoma* Venom. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 80, p. 489-497, 2015.
- CUMMINGS, R.D., McEVER, R.P. C-type lectins. In: *Essentials of Glycobiology*, 3.ed., 2009.
- DeCARO, A.M. *et al.*, Complete amino acid sequence of an immunoreactive form of human pancreatic stone protein isolated from pancreatic juice. *Eur. J. Biochem.*, v.168, p. 201-207, 1987.
- DIAS-NETIPANYJ M.F. *et al.* Bjcul, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro. *Toxicol In Vitro*, v. 33, p. 118-124, 2016.
- DIXSON, T. On the active principle of castor oil. *Med. Chir. Trans.*, v. 70, p. 108-116, 1887.
- DRICKAMER, K. A genomics resource for animal lectins. Disponível em: <http://www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/default.html>. Última atualização: Janeiro de 2014.
- DRICKAMER, K. Ca²⁺ dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.3, p. 393-400, 1993.
- DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 9, p. 585-590, 1999.
- DUBOIS, B. *et al.* Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. *FEBS Lett.*, v. 427, p. 275-278, 1998.
- DUHIG, J.V.; JONES, G. Haemotoxin of the venom of *Synanceja horrida*. *Aust. J. E. B. med. Sci.*, v. 5, p. 173-179, 1928.
- EBLE, J.A. Structurally Robust and Functionally Highly Versatile-C-Type Lectin (Related) Proteins in Snake Venoms. *Toxins (Basel)* 1: 11(3), 2019.
- EVANGELISTA, S. *et al.* Plumieribetin, a Fish Lectin Homologous to Mannose-binding B-type Lectins, Inhibits the Collagen-binding $\alpha 1\beta 1$ Integrin. *Int. J. Biol. Chem.*, vol. 284, p. 34747–34759, 2009.

FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 14-18, 1980.

FIGUEIREDO, S.G. Tx4(6-1): Toxina com atividade inseticida da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Purificação e caracterização química. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

FIGUEIREDO, S.G., ANDRICH, F., LIMA, C. et al. Venomous fish: a brief overview. In: De LIMA, M.E., PIMENTA, A.M.C., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., ZINGALI R., ROCHAT, H. (Orgs.), Animal toxins: State of the art. Perspectives on health and biotechnology, Editora UFMG, Belo Horizonte - MG, p. 73-95, 2009.

GABIUS, H. J. Animal lectins. Eur. J. Biochem., v. 243, p.543- 76, 1997.

GADELHA C.A. *et al.* Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. J. Struct. Biol., v. 152, n.3, p.185-194, 2005.

GARNIER, P. *et al.* Cardiotoxicity of verrucotoxin, a protein isolated from the venom of *Synanceia verrucosa*. Toxicon, v.35, p.47–55, 1997a.

GARNIER, P. *et al.* Complete amino-acid sequence of the beta-subunit of VTX from venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) as identified from cDNA cloning experiments. Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol., v. 1337, p. 1-5, 1997b.

GARNIER, P. *et al.* Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synanseja verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. Toxicon, v.33, p. 143-155, 1995.

GOLDSTEIN, I.J. *et al.* What should be called a lectin? Nature, v. 285, p.60, 1980.

GOMES, H.L. *et al.* Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. Toxicon, v. 55, p. 580-589, 2010.

GOMES, H.L. *et al.* Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. Toxicon v. 57, p. 992–999, 2011.

GRGIC, I. *et al.* Selective blockade of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., v. 25, 704-709, 2005.

GRIFFIOEN, A.W., THIJSSSEN, V.L. Galectins in tumor angiogenesis, Ann. Transl. Med, v. 2, p. 1-8, 2014.

GRIFFIOEN, AW; THIJSSSEN, VL. Galectins in tumor angiogenesis. Ann Transl Med. V, 2(9), p. 90, 2014.

GWEE, M.C.E. *et al.* A review of stonefish venoms and toxins. Pharmacology and Therapeutics, v. 64, p. 509-528, 1994.

HABERMANN, E. *et al.* Delayed haemolytic action of Palytoxin. *Biochim Biophys Acta.*, v. 649, p. 481-486, 1981.

HADDAD Jr. V. Atlas de Animais Aquáticos Perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento (Atlas of Dangerous Aquatic Animals of Brazil: a medical guide of identification and treatment). São Paulo: Roca; 2000.

HADDAD Jr., V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 36, p. 591-597, 2003.

- HADDAD Jr.; MARTINS, I.A.; MAKYAMA, H.M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, v. 42, p. 79–83, 2003.
- HAHN, S.T., O'CONNOR, J.M. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. *Toxicon*, v. 38, p. 79-89, 2000.
- HALSTEAD B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. Ed. Princeton, NJ: The Darwin Press, Inc., 2nd. 1988.
- HAMMOUDA, M.B. *et al.* Macrovipecetin, a C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits proliferation migration and invasion of SK-MEL-28 human melanoma cells and enhances their sensitivity to cisplatin. v. 1862, p. 600-614, 2018.
- HATANO, Y *et al.* The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. *Anesthesiology*, v. 71, p. 80-86, 1989.
- HAVT, A. *et al.* A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 37, p. 130-141, 2005.
- HUMANN, P. Reef Fish Identification: Florida, Caribbean, Bahamas. New World Publications, Florida, p. 303–307, 1994.
- IOVANNA, J., ORELLE, B., KEIM, V., DAGORN, J.C. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J. Biol. Chem.*, v. 266, 24664- 24669, 1991.
- ISHIZUKA E.K. *et al.* Role of interplay between IL-4 and IFN-gamma in the in regulating M1 macrophage polarization induced by Nattectin. *Int. Immunopharmacol.*, v.14, p. 513-522, 2012.
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.B., LIENER, I.E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, v. 192, p. 795-796, 1976.
- JEBALI, J. *et al.* Lebecin, a new C-type lectin like protein from *Macrovipera lebetina* venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. *Toxicon*, v. 86, p. 16-27. 2014.
- JUNQUEIRA, M.E.P. *et al.*, Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon*, v. 49, p. 909-919, 2007.
- KARMAKAR, S. *et al.* Isolation of a haemorrhagic protein toxin (SA-HT) from the Indian venomous butterflyfish (*Scatophagus argus*, Linn) sting extract. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 42, p. 452-460, 2004.
- KASSAB, B. H. *et al.* Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a c-type lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Protein Expres. Purif.*, v. 35, p. 67-74, 2004.
- KENNEDY, J.F. *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr. Polym.*, v. 26, p. 219-230, 1995.
- KHOO, H. E. Bioactive proteins from stonefish venom. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 29, p. 802-806, 2002.
- KHOO, H.E. *et al.* Biological activities of *Synanceja horrida* (Stonefish) venom. *Nat. Toxins*, v.1, p. 54–60, 1992.
- KHOO, H.E. *et al.* Effects of stonustoxin (lethal factor from *Synanceja horrida* venom) on platelet aggregation. *Toxicon*, v. 33, p. 1033-1041, 1995.

- KOMEGAE E.M. et al. Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: role of natterins and natectin in the disruption of cell cell and cell-extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. *Toxicon*, v. 58(6–7), p. 509–517, 2011.
- KOMPELLA, U. B.; LEE, V. H. L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Adv. Drug. Deliv. Re.*, v. 46, p. 211-245, 2001.
- KREGGER, A.S. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Toxicon*, v. 29, p.733-743, 1991.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 89, p. 45–55, 2011.
- LEWIS, R.J., GARCIA, M.X. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Review*, v. 2, p. 790-802. 2003.
- LIMA, C. et al. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model tissue injury. *Toxicon*. 42, 499-507, 2003.
- LIMA, R.F. et al. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectina induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. *Pharm. Pharmacol.*, v. 56,, p. 1415-1421, 2004.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectin as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 55, p. 35-67, 1986.
- LOMONTE, B. et al. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). *Toxicon*, v. 28, p. 75–81, 1990.
- LOPES-FERREIRA, M. et al. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem. Pharmacol.*, v.68, p. 2151-2157, 2004.
- LOPES-FERREIRA, M. et al. Structural and biological characterization of Natectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie.*, v. 93, p. 971–980, 2011.
- LOPES-FERREIRA, M. et al. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, v. 36, p. 405-410, 1998.
- LOW, K.S. et al. Stonustoxin: effects on neuromuscular function *in vitro* and *in vivo*. *Toxicon*, v. 32, p. 573-581, 1994.
- LOW, K.S.Y. et al. Stonustoxin: a highly potent endotheliumdependent vasorelaxant in the rat. *Toxicon*, v. 31, p. 1471–1478, 1993.
- LOWRY O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193(1), p. 265-275, 1951.
- MAGALHÃES, G.S. et al. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie.*, v. 87, p. 687-699, 2005.
- MALACARNE, P.F., et al. Advances in the characterization of the *Scorpaena plumieri* cytolytic toxin (Sp-CTx). *Toxicon*, v. 150, p. 220-227, 2018.
- MASTRO, A.M. et al. Mitogenic activity of snake venom lectins. *Cell Tissue Kinet.*, v. 19(5), p. 557–566, 1986.
- McCORMICK, K.D., MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *J. Chem. Ecology*, vol. 19(10), p. 2411-2451, 1993.
- McINTOSH, M. et al. B.M. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 454, p. 428-435, 1982.

- MEBS, D. Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, toxinologists, physicians and pharmacists. Medpharm Scientific Publ., Stuttgart, 2002.
- MELO-BRAGA, M. N. *et al.* Antimicrobial Peptides From *Lycosidae* (Sundevall, 1833) Spiders. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, , 2020.
- MENEZES, T.N. *et al.* Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon*, v. 60, p. 4–11, 2012.
- MISQUITH, S.; RANI, P.G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 30393-30401, 1994.
- MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 33, p. 1-10, 1995.
- MUHURI, D., DASGUPTA, S.C., GOMES, A. Lethal, oedema, haemorrhagic activity of spotted butterflyfish (*Scatophagus argus*, Linn) sting extract and its neutralization by antiserum and pharmacological antagonists. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 43, p. 493-497, 2005.
- MUKHERJEE, S., ZHENG, H., DEREBE, M. *et al.* Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, v. 505, p. 103–107, 2014.
- MULVANY, M J & HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Cir. Res.*, v. 41, p. 19-26, 1977.
- Ng, H.C., RANGANATHAN, S., CHUA, K.L., KHOO, H.E. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). *Gene.*, v. 346, 71-81, 2005.
- NUNES E.S. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*, v. 59(7-8), p. 667-671, 2012.
- PANUNTO, P.C. *et al.* Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, v. 47, p. 21–31, 2006.
- PAULSON, J.C. In: CONN, P.M. (Ed.): *The Receptors*, Academy Press, New York, v. 2, p. 131-219, 1985.
- PELGRIFT, R.Y.; FRIEDMAN, A.J. Nanotechnology As A Therapeutic Tool To Combat Microbial Resistance. *Adv. Drug Deliv Rev.*, v. 65, p. 1803-1815, 2013.
- PEREIRA-BITTENCOURT, M. *et al.* The effect of a lectin from the venom of the snake. *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Reserch*. v. 19, p. 4023-4025, 1999.
- PERRIÈRE, C., GOUDEY-PERRIÈRE, F., PETEK, F. Purification of a lethal fraction from the venom of the weever fish, *Trachinus vipera* C.V. *Toxicon*, v. 26, 1222-1227, 1988.
- POH, C.H. *et al.* Purification and parcial characterization of Stonustoxin (lethal factor) from *Synanseja horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 99, p. 793-798, 1991.
- POH, C.H. *et al.* Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, v. 101, p. 159-163, 1992.
- PONCHEL, G; IRACHE, JM., Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 34, p. 191-219, 1998.
- RABINOVICH, GA; RIERA, CM; SOTOMAYOR, CE. Galectin-1, an alternative signal for cell death, is increased in activated macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, p. 557-67, 1999.

- RÁDIS-BAPTISTA G. *et al.* Crotaacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell biochem. Biophys.*, v. 44, p. 412-423, 2006.
- RIERA, A.Á. *et al.* Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *Biocell*, v. 27, p. 37-46, 2003.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth stimulant factor released from plasma globulin by snake venoms by trypsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 156, p. 261-273, 1949.
- RUDIGER, H. *et al.* Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr. Med. Chem.*, v. 7, p. 389-416, 2000.
- RUSSELL, F. E. *The Venomous and Poisonous Marine Invertebrates of the Indian Ocean.* Enfield, NH: Science Publishers, v. 28, p. 1-14, 1996.
- RUSSELL, F.E; *Advances in Marine Biology. Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals*, vol. 2. Academic Press, London, p. 137–151, 1965.
- SARAIVA, T.C. *et al.* Nattectin a fish C-type lectin drives Th1 responses in vivo: licenses macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function. *Int. Immunopharmacol.*, v. 11(10), p. 1546-1556, 2011.
- SAUVIAT, M.P. *et al.* Effects of trachynilysin, a protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, on frog atrial heart muscle. *Toxicon*, v. 38, p. 945–959, 2000.
- SCHAEFFER, R.C., CARLSON, R.W., RUSSELL, F.E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon*, v. 9, p. 69-78, 1971.
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, v. 166(2), p. 368-379, 1987.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends. Biochem. Sci.*, v.18, p. 221-226, 1993.
- SHIKAMA, K.; YAMAZAKI, I. Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature*, v. 190, p. 83–84, 1961.
- SHIOMI, K. *et al.* Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. *Mar. Biol.*, v. 103, p. 285–289, 1989.
- SINGH, R.S.; TIWARY, A.K.; KENNEDY, J.F. Lectins: Sources, Activities, and Applications. *Crit.Rev. Biotechnol.*, v. 19(2), p. 145–178, 1999.
- SIVAN, G., VENKETESVARAN, K., RADHAKRISHNAN, C.K. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon.*, v. 50, p. 563–571, 2007.
- SLIFKIN, M., DOYLE, R.J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 197-218, 1990.
- SMITH, W.L., WHEELER, W.C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J. Hered.*, v. 97, p. 206–217, 2006.
- SOSA-ROSALES, J.I. *et al.* Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*, v. 45, p.155-161, 2005.

SOSA-ROSALES, J.I. *et al.* Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Günther) venom. *Toxicon*, v. 45, p. 147-153, 2005b.

SRI BALASUBASHINI, M. *et al.* Fish venom (*Pterois volitans*) peptide reduces tumor burden and ameliorates oxidative stress in Ehrlich's ascites carcinoma xenografted mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 16, p. 6219-6225, 2006a.

SRI BALASUBASHINI, M. *et al.* FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *J. Carcinog.*, v. 5, p. 27, 2006b.

STILLMARK, H. *Über Ricin, eines giftigen Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und anderen Euphorbiaceen.* Dorpat: Facultat der Kaiserlichen Universität, 1988.

STOCKERT, R. J.; MORELL, A. G.; SCHEINBERG, I. H. Mammalian hepatic lectin, *Science*, v. 186, p. 365– 366, 1974.

SUNG, J.M.L., LOW, K.S.Y., KHOO, H.E. Characterization of the mechanism underlying stonustoxin-mediated relaxation response in the rat aorta *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, v.63, p. 1113-1118, 2002.

TAKAHASHI, K.G., KURODA, T., MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* , Part B v. 150, p. 45–52, 2008.

TAN, P.T.J, KHANAM, BRUSIC, V. Bioinformatics for venom and toxin sciences. *Brief Bioinform.*, v. 4, p. 53–62, 2003.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge *Nucleic Acids Res.*, 2019.

UEDA, A. *et al.* Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1760, p. 1713-1722, 2006.

VASSILEVSKI, A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular Diversity of Spider Venom. *Biochem.*, v. 74, p. 1505-1534, 2009.

WEIS, W.I., KAHN, R., FOURME, R., DRICKAMER, K., HENDRICKSON, W.A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science*, v. 254, 1608-1615, 1991.

WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014, 257p.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat.Protoc.*, v. 3, p. 163-175, 2008.

WILEY, D.C., SKEHEL, J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 56, p. 365-394, 1987.

YAMASHITA, K; HARA-KUGE, S; OHKURA, T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1473, p. 147-60, 1999.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*. v. 272, p. 6179-217, 2005.

9. ANEXOS

Anexo I – Resumos apresentados no “X Simpósio da Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan”

- Resumo relacionado à dissertação:

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE FRAÇÕES
HEMAGLUTINANTES DA PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena
plumieri***

Fiorotti, HB¹; Coitinho, JB¹; Campos, FV¹; Figueiredo, SG¹

¹Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Ciências Fisiológicas,
Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29040-090,
Vitória-ES, Brazil.

Introdução: Venenos extraídos de peçonhas de peixes constituem uma fonte relativamente pouco explorada de substâncias bioativas com grande potencial terapêutico e biotecnológico. A maior parte dos estudos se concentra na caracterização de toxinas citolíticas de alto peso molecular presentes nestes venenos, que respondem pela maioria dos sintomas do envenenamento. No entanto, os outros componentes têm sido relativamente negligenciados. Dentre estes destacamos as lectinas, moléculas que, devido à sua capacidade de se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos, possuem função aglutinante, agindo como decodificadores das informações contidas nos códigos glicídicos trocadas entre moléculas, células e organismos. Nosso grupo de pesquisa purificou 5 isoformas de uma lectina tipo C da peçonha do peixe-escorpião brasileiro *Scorpaena plumieri* com massa molecular de aproximadamente 17 kDa.

Objetivos: O objetivo deste trabalho é a caracterização bioquímica e funcional de frações hemaglutinantes do veneno do *S. plumieri*, que acreditamos corresponderem às lectinas tipo C presentes no veneno.

Materiais e métodos: As frações hemaglutinantes foram purificadas em duas etapas: precipitação salina e cromatografia de filtração em gel (Superose 12 - HPLC). O processo foi monitorado pela atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho. A homogeneidade das frações foi avaliada por SDS-PAGE e a presença de estruturas secundárias regulares por dicróismo circular. A formação de agregados foi avaliada por "cross-linking" químico com BS3. O potencial antimicrobiano foi avaliado pela determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima em

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli*. A atividade citotóxica foi avaliada pela viabilidade celular de linhagens embrionárias de rim humano, neuroblastoma de rato, glioma de rato e carcinoma de colón humano.

Conclusão: Duas frações com atividade hemaglutinante – denominadas P1 e P3 – foram purificadas da peçonha do *S. plumieri*, constituídas por agregados oligoméricos ativos múltiplos de 17 kDa, com alta proporção de alfa-hélices. As frações purificadas exibiram efeito bacteriostático contra *S. aureus* e uma análise preliminar sugere que ambas apresentam atividade citotóxica nas linhagens avaliadas. Esses resultados podem contribuir para a elucidação do papel das lectinas no envenenamento, além de fornecerem dados para futuras investigações a respeito da estrutura e função dessas moléculas.

- Resumo não relacionado à dissertação

AVANÇOS NA CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA HIALURONIDASE – Sp-H – DA PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*

Vargas, TS¹; Fiorotti, HB¹; Coitinho, JB¹; Campos, FV¹; Figueiredo, SG¹

¹Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29040-090, Vitória-ES, Brazil.

Introdução: O peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* é considerado o mais venenoso da costa brasileira. Embora diversas moléculas bioativas tenham sido identificadas na peçonha desta espécie, os efeitos tóxicos são causados quase que em sua totalidade por uma proteína/toxina citolítica. Entretanto, outras moléculas – proteases, lectinas e hialuronidases – foram identificadas neste veneno. Hialuronidases de peçonhas animais não são tóxicas, no entanto, contribuem para efeitos locais e sistêmicos do envenenamento por atuarem como fatores de dispersão, degradando o ácido hialurônico (AH) da matriz extracelular. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo efetivo de purificação da hialuronidase da peçonha do *S. plumieri* – Sp-H, viabilizando sua caracterização química e funcional.

Materiais e métodos: O processo de purificação da Sp-H envolveu três etapas: precipitação salina, cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S200-HR) e troca aniônica (Hi-Trap QHP - HPLC), sendo monitorado por método turbidimétrico usando AH como substrato. Este método também foi utilizado para a avaliação da estabilidade e do pH ótimo da Sp-H. A homogeneidade e o peso molecular aparente da enzima foram avaliados por SDS-PAGE e a presença de estruturas secundárias regulares foi determinada por dicroísmo circular. O efeito dispersor da Sp-H foi avaliado pela ampliação da atividade hemorrágica induzida pela leucurolisina β de *Bothrops jararaca* em dorso de camundongos.

Resultados: A Sp-H foi obtida de forma homogênea, migrando como uma única banda de massa molecular de aproximadamente 92 kDa. Apresenta estruturas secundárias regulares e atividade ótima na faixa de pH 5.4 a 6.4. Demonstramos que a atividade pode ser preservada por até 60 dias quando a enzima em solução é armazenada a -25 e -80°C. A Sp-H aumentou o halo hemorrágico induzido pela leucurolisina β .

Conclusão: A purificação da Sp-H e as características descritas poderão concorrer para a elucidação do seu papel fisio-farmacológico no envenenamento, além de permitir a avaliação do seu potencial biotecnológico.

Anexo II – Artigo submetido à revista Toxicon

10/03/2020

Email – Helena Bulhões Fiorotti – Outlook

Track your recent Co-Authored submission to TOXCON

eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Ter, 10/03/2020 16:52

Para: hbfiorotti@hotmail.com <hbfiorotti@hotmail.com>

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Helena Fiorotti,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Toxicon

Title: On the hemagglutinating activity of the Scorpaena plumieri fish venom: partial characterization and perspectives for the future

Corresponding Author: Suely Figueiredo

Co-Authors: Helena B Fiorotti; Thiago G Soares; Márcia H Borges; Alessandra Matavel; Fabiana V Campos;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/toxcon/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Helena&lname=Fiorotti&email=hbfiorotti@hotmail.com>Or log in: <https://ees.elsevier.com/toxcon/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=hbfiorotti@hotmail.com>If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at suelygf@gmail.com; suelygf@cbm.ufes.br.

Thank you,

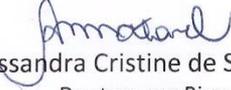
Toxicon

Anexo III – Estágio realizado na Fundação Ezequiel Dias – Belo Horizonte, MG

FUNED
Fundação
Ezequiel Dias**DECLARAÇÃO**

Declaro que Helena Bulhões Fiorotti esteve no Laboratório de Eletrofisiologia da Fundação Ezequiel Dias por um período de 15 dias aprendendo técnicas de cultivo celular e fazendo ensaio de viabilidade celular, que serão usados em sua dissertação de mestrado.

Atenciosamente,


Alessandra Cristine de Souza Matavel
Doutora em Bioquímica
Laboratório de Eletrofisiologia
Serviço de Biotecnologia e Saúde
Divisão de Ciência e Inovação
Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento

Alessandra Cristine de Souza Matavel
MASP 12582003
Analista e Pesquisador de Saúde
e Tecnologia -
Fundação Ezequiel Dias