

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DO PEIXE-
ESCORPIÃO (*Scorpaena plumieri*), ESTUDOS *IN VITRO***

Helena Lima Gomes

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Março de 2009

Helena Lima Gomes

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA PEÇONHA DO PEIXE-
ESCORPIÃO (*Scorpaena plumieri*), ESTUDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA

Profa^a Dr^a Margareth Ribeiro Moysés

CO-ORIENTADORA

Profa^a Dr^a Suely Gomes de Figueiredo

**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, Março de 2009

Gomes, Helena Lima.

Efeitos cardiovasculares da peçonha do peixe-escorpião (*scorpaena plumieri*), estudos *in vitro*.

Helena Lima Gomes – Vitória, 2009, 65p.

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora: Profa Dra Margareth Ribeiro Moysés

1. Scorpaena plumieri 2. Cardiovascular 3. Artérias coronárias 4. Receptores adrenérgicos

AGRADEÇO A DEUS

Por ter me colocado na estrada da Prof^a Margareth e da Prof^a Suely, tornando possível esse trabalho.

AGRADEÇO A DEUS

Por ter me dado excelentes professores com os quais muito aprendi e cresci.

AGRADEÇO A DEUS

Que me fez nascer de uma fada e um guerreiro, os quais nunca mediram esforços para me fazer sorrir.

AGRADEÇO A DEUS

Por ter me dado irmãos, e assim três grandes exemplos de vida.

AGRADEÇO A DEUS

Que colocou Vitor em minha vida, e dessa forma pude experimentar do mais nobre dos sentimentos, o amor. Amor verdadeiro, amor eterno. Amor que me abraçou sempre que precisei, e quando eu não precisei também. Amor que fez tudo ter sentido, graça, gosto e cor.

AGRADEÇO A DEUS

Por ter me dado amigos. Poucos, porém fiéis, cuja falta tornaria tudo impossível.

Sumário

Página

Lista de figuras-----	06
Resumo -----	07
Abstract-----	08
1. Introdução-----	09
2. Objetivos-----	25
3. Materiais e métodos-----	26
3.1 – Animais -----	26
3.2- Extração da peçonha -----	26
3.4 – Dosagem de proteína -----	28
3.5 - Fracionamento da peçonha do peixe-escorpião -----	29
<i>Scorpaena plumieri</i>	
3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Tricina-----	26
3.7 - Coração isolado-----	28
3.8 – Drogas -----	29
3.9 - Análises estatísticas-----	21
4. Resultados-----	32
4.1 - Extração do peçonha-----	32
4.2 - Efeitos do peçonha bruto sobre coração isolado de rato	
4.3 - Purificação da fração cardiovascular do -----	35
peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i> .	
4.4 - Efeito da fração cardiovascular em coração isolado de rato -----	36
5. Discussão-----	42
6. Referencias -----	54

Lista de figuras

	Página
Figura 1: Peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i> -----	11
Figura 2: Aparato peçonheto do <i>Scorpaena plumieri</i> -----	12
Figura 3: Extração da peçonha do <i>Scorpaena plumieri</i> -----	27
Figura 4: Efeito da peçonha bruta do <i>Scorpaena plumieri</i> sobre coração isolado de rato -----	34
Figura 5: Perfil cromatográfico da filtração em gel da peçonha bruta do <i>Scorpaena plumieri</i> -----	35
Figura 6: Comparação entre a intensidade das atividades cardiovasculares da peçonha bruta do <i>S. plumieri</i> e da fração cardiovascular -----	37
Figura 7: Efeito da fração cardiovascular sobre coração isolado de rato -----	38
Figura 8: Participação do endotélio nos efeitos da fração cardiovascular em corações isolados de ratos -----	40

Resumo

O peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* é um dos peixes mais venenosos do Oceano Atlântico. Seu veneno causa sérios danos gerando efeitos locais e sistêmicos como intensa dor, edema, necrose, distúrbios cardiovasculares e respiratórios. O objetivo do presente trabalho foi investigar as atividades cardiovasculares *in vitro* do veneno do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Os efeitos da peçonha bruta (PB), sobre a pressão ventricular esquerda máxima (PVE_{max}), sobre sua primeira derivada positiva e primeira derivada negativa (+dP/dT e -dP/dt) e sobre a pressão de perfusão coronariana (PPC), foram avaliados em corações isolados de ratos segundo a técnica de Langendorff. A PB (5 - 80 µg de proteína) causou, de forma transiente e dose-dependente, efeito inotrópico positivo significativo (15% - 117%), lusitrópico positivo (17% - 161 %) e vasoconstritor (24%), N=8. Uma fração cardiovascular (FC) foi parcialmente purificada por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 HR. Amostras de 1 a 7 µg de proteína da FC reproduziram os efeitos gerados pelo veneno bruto. A FC causou efeito inotrópico positivo (4,8% - 36,0%), lusitrópico (8,2% - 37%) e vasoconstritor sobre o leito coronariano (25%). N=7. Antagonistas de receptores α-adrenérgico (prazosin) e β-adrenergico (propranolol) atenuaram significativamente todas as respostas. O efeito vasoconstritor, e não os demais efeitos, foi reduzido pela remoção química do endotélio. Os dados obtidos demonstram que o veneno bruto do *S. plumieri*, assim como a FC induzem efeitos cardiovascular *in vitro* e sugerem que estes são mediados pelo menos parcialmente, por receptores adrenérgicos.

Abstract

The scorpionfish *Scorpaena plumieri* is one of the most venomous fishes in the Atlantic Ocean. Its venoms cause severe injuries leading to local and systemic effects, such as intense pain, edema, necrosis and cardiovascular and respiratory disturbing. The aim of the present study was to investigate the cardiovascular activity of *Scorpaena plumieri* venom *in vitro*. The studies were performed on whole rat hearts using a "Langendorff" preparation for perfused isolated hearts. The crude venom (5 - 80 µg protein) produced significant dose-dependent positive inotropic (15% - 117%), lusitropic (16,9% - 161,4 %) and vasoconstriction responses (24%). N=8. Partial purification of a cardiovascular active fraction from the venom extract was achieved by gel filtration on a Sephacryl S-200 HR column. Samples of 1 to 7 µg protein of CF reproduced the cardiovascular effects induced by crude venom on isolated hearts. CF produced dose-dependent positive inotropic (4,8% - 36,0%), lusitropic (8,2% - 37%) and vasoconstriction responses (25%). N=7. Prazosin and propranolol significantly attenuated these responses. The coronary vasoconstriction response to CF was also attenuated by chemical endothelium denudation. Data presented suggests that *Scorpaena plumieri* venom acts, at least partially, via adrenergic receptors and so do the cardiovascular fraction.

1 – INTRODUÇÃO

Os peixes constituem quase metade do número de vertebrados da terra (Nelson, 1984); aproximadamente vinte duas mil espécies estão contidas em 50 ordens e 445 famílias (Russel, 1965). Ao longo do processo evolutivo das espécies, diversos peixes peçonhentos, desenvolveram táticas eficazes, incluindo as poderosas peçonhas. A produção de veneno pelos animais aquáticos é uma importante estratégia que os garante sobreviver em ecossistemas tão competitivos, pois o veneno faz desses animais exímios caçadores ou defensores muito bem sucedidos. Isso porque as peçonhas são capazes de atordoar, paralisar e matar suas presas ou maiores predadores.

Dentre as espécies de peixes encontradas em ecossistemas de água doce e marinha um grande número é venenoso. De acordo com Russel (1965) dentre estas, apenas 200 eram reconhecidas como peçonhentas. Entretanto, em um trabalho recente de análise filogenética acredita-se que esse número possa ultrapassar 1200 e exceder o número de serpentes peçonhentas (Smith e Wheeler, 2006).

Os peixes venenosos marinhos estão classificados na ordem dos peixes-gato (Siluriformes) e em seis ordens de peixes com espinhos raiados: Batrachoidiformes (*batrachoididae*), Scorpaeniformes (*Scorpaenoidei*) e Perciformes (*Acanthuroidei*, *Blennioidei*, *Percoidei*, *Trachinoidei*) (Halstead, 1966; Nelson, 1984; Church Hodgson, 2002). Os espécimes da subordem *scorpaenoidei* é o grupo dominante dentre os peixes venenosos e possuem uma das histórias naturais melhor documentadas, no que se concerne à venomologia de peixes. Esta subordem é dividida em dois grupos: os “sirobins” (inclui duas famílias, *triglidae* e *peristediidae*) e os peixes-escorpião e seus parentes.

Os peixes-escorpião e seus parentes estão classificados em doze famílias: Apstidae, Aploactinidae, Caracanthidae, Conggiopodidae, Gnathanacanthidae, Neosebastidae, Pataecidae, Scorpaenidae, Sebastidae, Setarchidae, Synanceiidae e

Tetrarogidae. Os indivíduos dessas famílias possuem numerosos espinhos e tamanhos corporais variados, que vão de 2 a 100 cm. Eles podem apresentar colorações exuberantes e colorações que tendem a mimetizar o ambiente em que vivem, como recifes de corais (Smith, 2003). Dentre essas doze famílias, os representantes das famílias Scorpaenidae e Synanceiidae são os mais estudados.

Nessas famílias, o peixe-pedra (*Synanceja*), o peixe-leão (*Pterois*) e o verdadeiro peixe-escorpião (*Scorpaena*) provocam a maioria dos envenenamentos severos em humanos. O peixe-pedra do oceano Pacífico e do oceano Índico estão relacionados com uma série de mortes humanas devido às complicações causadas pelos venenos. Os peixes-escorpião são os peixes mais venenosos do Atlântico e freqüentemente estão envolvidos em acidentes com humanos no Brasil (Haddad et al, 2003; 2004). Segundo o Catálogo das Espécies de Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil (Buckup e Menezes, 2003) vinte espécies da família Scorpaenidae são encontradas na costa brasileira.

Em meio às espécies pertencentes à família Scorpaenidae, as mais ocorrentes no litoral brasileiro são: *Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 (peixe-escorpião preto) e *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829 (peixe-escorpião vermelho) (Figueiredo e Menezes, 1980; Carvalho-Filho, 1999). Essas duas espécies são distinguidas pela coloração da região axilar das nadadeiras peitorais. O *S. brasiliensis* apresenta pontos negros sobre fundo branco já a espécie *S. plumieri*, cuja peçonha é objeto de nosso estudo, possui pontos brancos sobre fundo negro (figura 1).

Essas espécies são características de águas tropicais, costeiras e rasas, com fundo coralino ou rochoso. Apresentam hábitos bentônicos, vivendo junto ao fundo das costas, são solitários e territorialistas, nadam pouco e costumam ficar parados mimetizando o ambiente. O aparato de veneno dos peixes-escorpião *Scorpaena* consiste de treze espinhos dorsais, dois pélvicos e três anais (Moyle e Cech, 1996) Os espinhos são grandes, fortes e pontudos e cobertos por uma bainha tegumentar moderadamente grossa. As glândulas veneníferas são encontradas nas cavidades

antero-laterais destes espinhos, em uma camada alongada e fusiforme de tecido acinzentado (Haddad, 2000; Russel, 1965). (Figura 2)

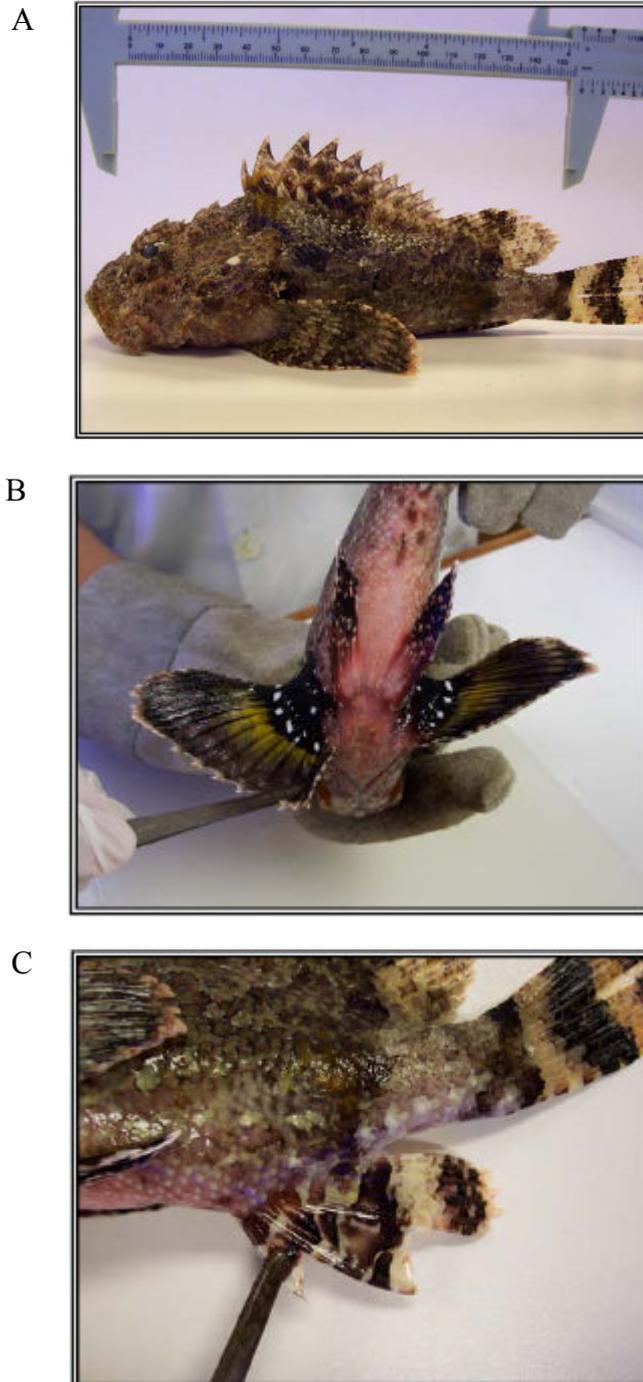


Figura 1. Peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. (a) vista lateral de um exemplar coletado na ilha de Vitória – ES, com espinhos dorsais eretos, (b) apomorfia da espécie: manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, (c) nadadeira anal e espinhos anais. manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie. Figuras cedidas pelo Ms. Filipe Andrich.

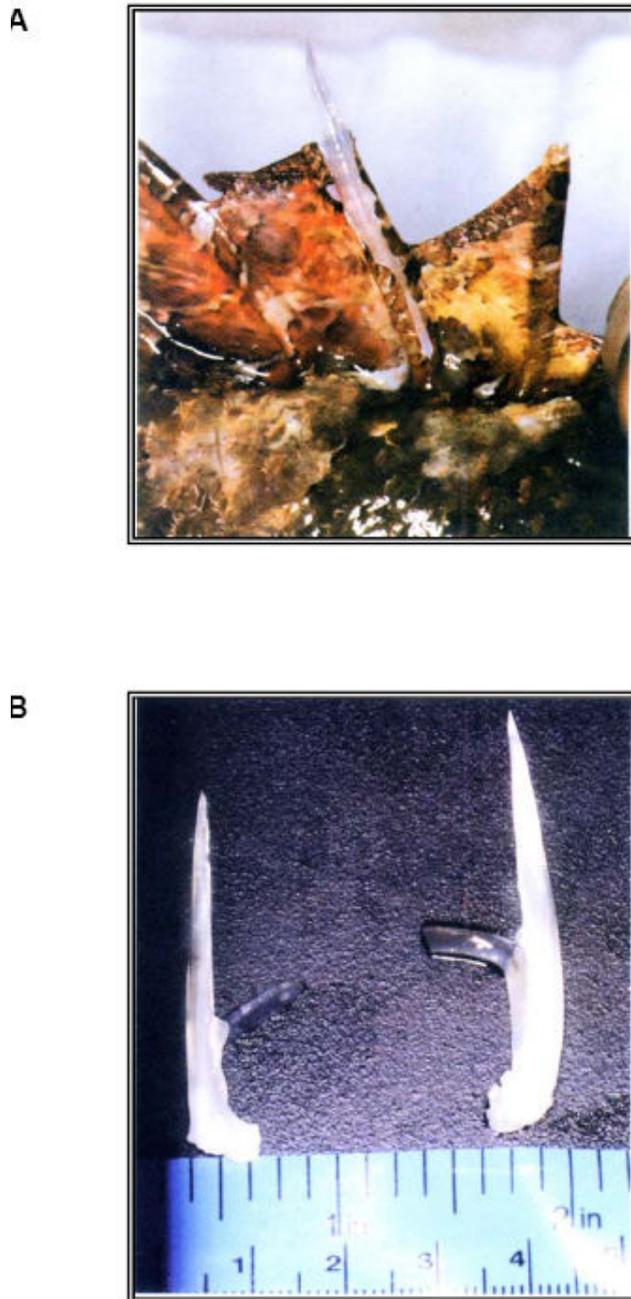


Figura 2 Aparato peçonhento do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. a) espinhos dorsais envolvidos por membranas tegumentares. (b) espinhos dissecados mostrando o tecido cinzento no qual se encontram as glândulas produtoras da peçonha. Fonte: Haddad jr., 2000.

Os peixes-escorpião utilizam sua peçonha com o propósito de defesa (Gwee et al, 1994; Church e Hodgson, 2002) e o envenenamento ocorre por pressão mecânica ao pisar ou tocar o peixe.

Os espinhos tornam-se eretos, perfuram os tecidos da vítima e a bainha tegumentada é rompida ou deslocada para baixo, permitindo que a peçonha penetre

no ferimento (Gwee *et al* , 1994; Haddad *et al* 2003, Halstead, 1951; Roche and Halstead, 1972; Russel, 1965; Schaeffer *et al* 1971). Os sintomas do envenenamento provocado por esses peixes incluem, em geral, manifestações locais e sistêmicas, com dor, edema, eritema e necrose, febre, sudorese, agitação, diarreia e distúrbios respiratórios (Haddad *et al*, 2003; Kizer *et al*, 1985). Entretanto, o principal efeito destas peçonhas é sobre o sistema cardiovascular e neuromuscular, levando a alterações eletrocardiográficas e profundas alterações *in vivo* e *in vitro* (Calrson *et al*, 1971; Church and Hodgson, 2002b; Carrijo *et al.*, 2005; Gwee *et al*, 1994;).

O tratamento mais efetivo no alívio dos sintomas de envenenamento por peixes peçonhentos da família Scorpaenidae é a imersão do membro afetado em água quente (aproximadamente 45°C) por trinta a noventa minutos (Church e Hodgson, 2002a; Haddad *et al* 2003). As vezes, faz-se necessário o uso de infiltrações anestésicas ou mesmo opiáceos. Apesar do calor amenizar os sintomas promovendo vasodilatação e dissipação do veneno do local afetado, o alívio é também um forte indício da labilidade destas peçonhas às mudanças de temperatura (Haddad, 2000).

Assim como as peçonhas dos animais terrestres, as de peixes apresentam uma enorme diversidade estrutural quanto farmacológica incluindo enzimas, peptídeos, proteínas, aminas biogênicas e outras substâncias desconhecidas. (Conceição *et al*, 2006; Magalhães *et al*, 2006; Russell, 1971; Smith e Wheeler, 2006).

A identificação e purificação de novos compostos presentes em peçonhas, apresentam grande interesse, pois, além de possibilitar o estudo da sintomatologia decorrente de acidentes por esses animais, também auxilia na compreensão dos mecanismos de ação envolvidos em seus efeitos e das respostas fisiológicas relacionadas, abrindo perspectiva na terapêutica dos acidentes. Além disso, a determinação da estrutura e função destas moléculas pode originar modelos de novos compostos com possibilidade de patenteamento, o que tem sido amplamente utilizado por companhias de bioprospecção.

Enquanto que as propriedades dos venenos produzidos por animais terrestres são extensamente investigadas, poucas pesquisas estão sendo realizadas com peçonhas de peixes marinhos. Isso se deve, comumente, à grande dificuldade de obtenção do animal, estocagem do veneno e principalmente à sua extrema labilidade (Schaeffer et al., 1971; Church and Hodgson, 2002a).

Fatores como pH, temperatura, congelamento/descongelamento, liofilização e diluições afetam as propriedades biológicas dos venenos durante seu armazenamento. A instabilidade pode ser associada à presença de um grande número de enzimas proteolíticas nestas peçonhas, que podem hidrolisar outras proteínas bioativas. A presença de proteínas de alta massa molecular, as quais são mais suscetíveis à desnaturação, também parece estar relacionada com a volubilidade dos venenos de peixes (Carrijo et al, 2005; Church e Hodgson, 2002a).

Entretanto alguns trabalhos descrevem que a estabilidade de atividades farmacológicas de peçonhas de peixes pode ser conseguida pela adição de glicerol (10%), armazenamento a baixas temperaturas -70 ou a -196° C ou por precipitação com sulfato de amônio (Carrijo et al, 2005; Chhatwal et al, 1992; Church e Hodgson, 2002b; Saunders et al, 1962).

A maioria dos estudos descrevendo as propriedades biológicas e químicas dos venenos de peixes são essencialmente focados no peixe-pedra (*Synanceja trachynis*; *Synanceja horrida*; *Synanceja vessucoa*) (Saunders, 1959; Austin et al., 1961; Saunders et al., 1962; Low et al., 1990; Kreger, 1991; Poh et al., 1991; Kreger et al., 1993; Hopkins et al., 1994; Garnier et al., 1995; Church and Hodgson, 2000a,b, Liew et al, 2007, Wang et al, 2007) e no peixe-leão (*Pterois volitans*) (Saunders, 1959; Choromansky et al., 1984; Nair et al., 1985; Cohen and Olek, 1989; Church and Hodgson, 2002b).

Devido à instabilidade, não se tem obtido êxito nas tentativas de purificação de toxinas/proteínas de peçonhas de peixes, somente poucas tem sido isoladas. A tabela

1 mostra as proteínas já isoladas de peixes, como também informações estruturais e farmacológicas destas proteínas.

Toxinas multifuncionais de alta massa molecular (≈ 150 kDa) foram purificadas de venenos de peixes-pedra (Tabela 1). Atividades letais, citolíticas, neurotóxicas, cardiopáticas, edematogênicas, e hemolíticas tem sido descritas para estas toxinas (Chhatwal e Dreyer, 1992; Hanh e O'Connor, 2000; Colassante et al, 1996; Garnier et al, 1995; Poh et al, 1991). A stonustoxina (SNTX – Stonefish National University of Singapore), a traquinilisina (TLY), a verrucotoxina (VTX) e a neoverrucotoxina (NeoVTX) foram isoladas da peçonha dos peixes-pedra *S. horrida*, *S. trachynis* e *S. verrucosa*. Estas são as toxinas mais estudadas de peçonhas de peixes e poucas características estruturais e propriedades farmacológicas foram descritas (Kreger, 1991; Poh et al, 1991; Garnier et al, 1995; Ghadessy et al, 1996; Colassante et al, 1996; Garnier et al, 1997)

A primeira toxina purificada de peçonha de peixe e melhor caracterizada em nível molecular foi a SNTX. Essa toxina letal (DL_{50} 17 ng/g i.v em camundongo) é constituída de duas subunidades, uma de 71 kDa (α subunidade) e uma de 79 kDa (subunidade β) associadas por interações não covalentes (Poh et al 1991, Ghadessy et al 1996) e possui implicações cardiovasculares, hemolíticas, neuromuscular, nociceptiva e edematogênica. A intensa hipotensão é considerada a causa primária da morte atribuída a essa toxina (Khoo et al 1992, Low et al 1993, 1994). Esse efeito parece estar relacionado com as células endoteliais vasculares e liberação de óxido nítrico, juntamente com ativação de canais de potássio que causam vasorelaxamento (Sung et al 2002).

A TLY também é composta por duas subunidades (α de 76 KDa e β de 83 KDa) e possui massa molecular semelhante à SNTX. TLY possui atividade cardiovascular, hemolítica, neuromuscular e edematogênica. A atividade hemolítica da SNTX e TLY é atribuída à formação de poros na membrana dos eritrócitos (Chen et al,

1997). A neoVTX também é uma proteína dimérica (Ueda et al, 2006), entretanto, a VTX é uma glicoproteína tetramérica formada por duas subunidades α (83000 Da) e duas subunidades β (78000 Da). A NeoVTX e a VTX exercem efeitos cardiovasculares, hemolíticos e também são letais (Garnier et al, 1995, 1997).

Toxinas com atividades cardiovascular e hemolítica foram isoladas também de outros peixes (tabela 1). A dracotoxina, isolada da peçonha de *Trachinus draco*, a trachinina, isolado do *Trachinus vipera*, afetam o sistema neuromuscular, e são altamente hemolíticas para eritrócitos de coelho (Chhatwal e Dreyer 1992). A toxina P-C, isolada do *Plotosus canius*, além de afetar o sistema neuromuscular, atua sobre o sistema cardiovascular e também possui ação hemolítica (Auddy et al, 1994, 1995).

Como mostrado na tabela 1, toxinas com outras atividades também tem sido isoladas de peçonhas de peixes. Um peptídeo, o FV (7,6 kDa), com atividade anti-tumoral, anti-metastática e hepatoprotetiva foi purificado da peçonha do *Pterois volitans* (Sri Balasubashini et al, 2006). Duas miotoxinas, a TmC4 - 7.2 e a AS-HT de 18 KDa, foram purificadas de *T. maculosa* (Sosa-Rosales et al, 2005a) e do *Scatophagus canius*, respectivamente. Essas toxinas possuem, além da atividade muscular, atividade hemorrágica e nociceptiva (Karmakar et al, 2004).

Adicionalmente às toxinas listadas acima, algumas atividades enzimáticas são encontradas nas peçonhas de peixes. A enzima proteolítica Sp-GP, (80 KDa) e a hialuronidase SP-H, (76 KDa) já foram purificadas do veneno do peixe-escorpião *S. plumieri* (Carrijo et al, 2005, Cassoli, 2008). A presença de proteases e hialuronidases, como observada no veneno do peixe-escorpião, podem estar relacionadas com alguns dos efeitos locais observados nas vítimas de envenenamento, como dor intensa, edema, eritema e necrose. Essas enzimas são consideradas importantes fatores de dispersão, capazes de hidrolisar constituintes da matriz extracelular de tecidos conectivos.

Família	Espécie	LD ₅₀ da peçonha em camundogo	Toxina purificada	Aspectos estruturais	Atividade	Referencias
Synanceiidae	<i>Synanceja horrida</i>	300 ng/kg (i.v.)	Stonustoxina (SNTX)	148 kDa composta por duas subunidades α (71 kDa) e β (79 kDa), pl 6.9	Toxina letal Cardiovascular, hemolítica, neuromuscular, nociceptiva, edematogênica.	Khoo et al, 1991 Low et al, 1994; 1993. Poh et al, 1991
		0.36 μ g/kg (i.v.)				
	1.6 μ g/g (i.p.)	SFHYA1	52 kDa Glicoproteína, pl 9.2	Hialuronidásica	Poh et al, 1992, Ng et al, 1995	
	<i>Synanceja trachynis</i>	1.6 mg/kg (i.p.)	Trachynilixina (TLY)	158 kDa composta por duas subunidades α (76 kDa) e β (83 kDa), pl 5.7	Toxina letal Cardiovascular, hemolytic, neuromuscular, edematogenic.	Kregeer, 1991; et al, 1997. Colassante et al 1996
	<i>Synanceja verrucosa</i>	2.5 μ g/g (i.v.)	Verrucotoxina (VTX)	322 kDa composta por duas subunidades 2 α (83 kDa) e 2 β (78 kDa) Glycoprotein	Toxina letal - LD50 < 40 ng/g (i.v. mouse). Cardiovascular, hemolítica.	Garnier et al, 1995
			Neoverruco toxina (neoVTX)	166 kDa composta por duas subunidades α (75 kDa) e β (80 kDa)	Toxina letal hemolítica	Ueda et al, 2006
Scorpaenidae	<i>Pterois volitans</i>	42.5 μ g/kg (i.p.)	peptídeo FV	7.6 kDa	Indutor seletivo de apoptose em células neo-plásicas.	Balasubashin et al, 2006.
	<i>Scorpaena plumieri</i>	0.28 mg/kg (i.v.)	Sp-GP	80 kDa	Proteolítica (Gelatinolítica).	Carrijo et al, 2005
			Sp-H	76.92 kDa, Glicoproteína	Hialuronidásica	Cassoli, 2008
Trachinidae	<i>Trachinus draco</i>	1.8 μ g/g (i.v.)	Dracotoxina	105 kDa	Toxina letal hemolítica, neuromuscular	Chhatwal, I., Dreyer; 1992
				Trachinine	324 kDa composta por duas subunidades (81 kDa) cada	Toxina letal
Tetrarogidae	<i>Notesthes robusta</i>	-	Nocitoxina	170 kDa	Nociceptiva.	Hahn e O'Connor, 200
Plotosidae	<i>Plotosus canius</i>	3.9 mg/kg (i.p.)	Toxina-PC	15 kDa	Toxina letal Cardiotóxica, hemolítica, neuromuscular.	Auddy et al, 1995; 1998
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i>	9.3 mg/kg (i.v.) 9.8 mg/kg (i.p.)	SA-HT	18 kDa	Neuromuscular, hemorrágica, nociceptiva, edematogênica	Karmakar et al, 2004; Muhuri et al 2005
Batrachoididae	<i>Thalassophryne maculosa</i>	4.93 mg/kg (i.p.)	TmC4-47.2	15,161 Da 15,154 Da	Neuromuscular, miotóxica	Sosa-Rosales et al, 2005b
	<i>Thalassophryne nattereri</i>	4.54 mg/kg (i.p.)	Família Natterin 1, 2, 3, 4	~ 35 - 38kDa	Proteolítica Edematogênica, Nociceptiva	Magalhães et al, 2005; Lopes-Ferreira 1998; 2004.

Tabela do capítulo "Fish venoms a brief overview" (do livro Toxins:State of the art. Perspectives on Health and Biotechnology) cedida pela Prof^a Suely Gomes de Figueiredo.

O número de diferentes componentes encontrados nos venenos de peixes e aqui listados evidencia a grande complexidade associada às suas atividades farmacológicas. Os resultados de estudos clínicos, farmacológicos e bioquímicos indicam que os venenos de peixes causam além dos efeitos locais, liberação de neurotransmissores, despolarização de células neurais, perda do controle motor, hipotensão, parada cardíaca e respiratória, evidenciando o efeito letal dos venenos.

Estudos sobre a letalidade e toxicidade do veneno bruto de diversos peixes demonstram uma intensa variedade entre os espécimes. Os venenos dos peixes-pedra são altamente potentes quando comparados aos venenos do peixe-escorpião e peixe-leão Tabela 1, (Ohsaka, 1979).

Outra atividade significativa induzida por venenos de peixes é a resposta inflamatória. Lopes-Ferreira et al, 2004, demonstraram que a peçonha *Thalassophryne nattereri* induz uma resposta inflamatória local aguda com liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Esta resposta foi resistente a anti-inflamatórios convencionais (indometacina e a dexametasona). Entretanto os sintomas inflamatórios (dor e edema) foram reduzidos por inibidor da calicreína tecidual, demonstrando o envolvimento da atividade semelhante a calicreína nesta resposta. Estes autores sugerem que esta última observação deve ser considerada para tratamentos efetivos em acidentes com humanos (Lopes-Ferreira, et al, 2004).

Estudos histológicos realizados utilizando o músculo gastrocnêmico de camundongos demonstraram que as peçonhas dos peixes *Thalassophryne nattereri* e *maculosa* acarretam alterações locais como necrose, presença de trombina, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Depósitos de fibrina e formação de trombos, seguido de estase venular e arteriolar também foram observados pela administração destes venenos (Lopes-Ferreira et al, 2002; Pareja-Santos et al 2008; Sosa-Rosales et al 2005a).

Resposta inflamatória semelhante à induzida pelo *T. nattereri* foi descrita no envenenamento pelo peixe-gato *Cathorops spixii* (Junqueira et al, 2007). Esses

autores demonstram que a resposta inflamatória induz infiltração de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos.

A atividade inflamatória dos venenos dos peixes *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi* foi descrita por Magalhães e colaboradores (2006). Esses autores descrevem que o envenenamento por esses peixes induz também respostas edematogênica e nociceptiva, os quais apresentaram um aumento da infiltração leucocitária e de células aderentes ao endotélio do músculo cremaster após a aplicação do veneno. A necrose induzida por ambos os venenos é mais vigorosa quando seus respectivos mucos também são inoculados. Esse fato indica que as proteínas presentes no muco epitelial sinergizam o efeito da toxina presente no veneno.

Respostas inflamatórias sistêmicas foram recentemente descritas no envenenamento pelo peixe-escorpião *S. plumieri*. O veneno desse peixe induz resposta sistêmica acompanhada de edema alveolar e inflamação neutrofílica. (Boletini-Santos et al, 2008).

Algumas proteínas algínicas envolvidas na resposta inflamatória já foram purificadas de venenos de determinados peixes (tabela 1). A nocitoxina, purificada do *Notesthas robusta*, é a toxina responsável por grande parte da dor induzida por esse veneno. Ela é uma proteína monomérica com 169.8-174.5 KDa e possui potencial para uso em pesquisas clínicas sobre a dor (Hahn e O'connor, 2000; O'connor e Hahn, 2004). A AS-HT, uma toxina hemorrágica de 18KDa, também apresenta atividade nociceptiva e edematogênica. Essa toxina foi isolada do peixe *Scatophagus argos* da família Scatofagidae (Karmaka et al, 2004).

Adicionalmente às respostas inflamatórias, alguns sintomas clínicos observados após o envenenamento por peixes demonstram evidências de atividade neurotóxica destes venenos. Muitos sintomas neurotóxicos, incluindo paralisia dos membros, fraqueza muscular, cessação respiratória, piloereção, movimentos rotacionais e convulsões violentas são observados quando os venenos dos peixes *P. volitans*, *S. plumieri*, *T. nattereri*, *G. marmoratus*, *P. lineatus*, *S. traxynis* e *S. verrucosa*

são administrados em animais experimentais (Schaeffer *et al*, 1971; Nair *et al*, 1985; Carrijo *et al*, 2005; Lopes-Ferreira *et al*, 1998; Breton *et al*, 2002).

O veneno do peixe *T. draco* causa despolarização da membrana celular no córtex cerebral de ratos. Essa ação é exacerbada na presença de cálcio extracelular, entretanto, esse efeito não é afetado pela elevação de potássio extracelular e parece ser resistente ao bloqueio do canal de K⁺ e de Na⁺.

A atividade neuromuscular do veneno de *S. trachynis* foi caracterizada por microscopia eletrônica e por estudos eletrofisiológicos em músculo isolado de rã. Baixas concentrações do veneno atuam pré-sinápticamente causando a liberação e depleção dos neurotransmissores do terminal nervoso. Essa resposta, além de requerer a presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺, é resistente à tetrodoxina e à neurotoxina botulínica, indicando que a liberação de acetilcolina é através de um mecanismo que não envolve exocitose. Contudo, altas concentrações do veneno atuam pós- e pré-sinápticamente causando despolarização irreversível da membrana muscular e mudanças patológicas acompanhadas de prejuízo aos terminais nervosos e às fibras musculares (Kreger *et al*, 1993).

A atividade neuromuscular também foi demonstrada na peçonha de peixes-pedras. Hopkins e colaboradores (1994) usando o veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) sugeriram que esta peçonha induz a liberação de acetilcolina, substância P e produtos da ciclo-oxigenase ou contém componentes que atuam diretamente nos receptores dessas moléculas. Foi demonstrado, também que o veneno do *S. horrida* pode estimular a liberação de acetilcolina no cérebro de ratos além de afetar a síntese de neurotransmissores inibindo a recaptação dos precursores dessas substâncias (Khoo *et al*, 1992).

Entretanto, grande parte dos efeitos neurotóxicos observados em camundongos após a injeção intracraniana do veneno do peixe-pedra *S. verrucosa* parece não envolver as vias adrenérgicas ou colinérgicas. Além disso, os autores

mostram que a VTX, purificada dessa peçonha, não participa desses efeitos neurotóxicos (Breton *et al*, 2002).

Estudos com a peçonha dos peixes *G. marmoratus*, *P. volitans* e *S. trachynis* revelam atividades neuromusculares pronunciadas. A atividade neuromuscular do veneno do *G. marmoratus* envolve a participação dos receptores muscarínicos e o veneno do peixe-leão *P. volitans* e do peixe-pedra *S. trachynis* bloqueiam a transmissão neuromuscular. Esses resultados sugerem que a atividade neuromuscular seja mediada pela presença ou pela capacidade de liberação de neurotransmissores desses venenos (Cohen e Olek, 1989; Kreger *et al*, 1993; Colasante *et al*, 1996; Church *et al*, 2003).

A despolarização da membrana celular é atribuída aos efeitos do veneno bruto do peixe *T. maculosa*. A tmc4-47.2, uma toxina purificada desse veneno, parece apresentar seletividade pelo músculo esquelético e promover ativação de canais de cálcio também em terminações nervosas (Sosa-Rosales *et al*, 2005a).

Outra propriedade, além dos efeitos neuromusculares, induzido por venenos de peixes é a marcante atividade hemolítica *in vitro*, comum a quase todos os venenos. Um potente efeito citolítico sobre eritrócitos já foi demonstrado para o veneno dos peixes *S. verrucosa*, *T. draco*, *S. plumieri*, *T. nattereri*, *P. volitans*. (Chhatwal e Dreyer, 1992; Kreger, 1991; Poh *et al*, 1991; Carrijo *et al*, 2005). Essa atividade hemolítica parece ser específica para eritrócitos de coelho. Os eritrócitos humanos, de porco e frango são totalmente resistentes, e sobre eritrócitos de camundongos fraca ação hemolítica é observada (Chhatwal e Dreyer, 1992; Kreger, 1991). Devido à ausência de atividade fosfolipásica (A2) nesses venenos, a atividade hemolítica pode ser devida a uma hemólise direta (Khoo *et al*, 1992). É sugerido para ação hemolítica do veneno do *T. draco* a ligação do componente hemolítico a uma proteína receptora na superfície dos eritrócitos (Chhatwal e Dreyer, 1992)

Alguns trabalhos demonstram que os venenos de peixes possuem ação citolítica também em outros tipos celulares. O veneno do peixe-gato *P. lineatus*, é

citotóxico para vários tipos celulares, incluindo as células tumorais Ehrlich ascitis, que são modelo comum de crescimento tumoral (Fahim *et al*, 1996). Os venenos do peixe-escorpião *Hypodytes rubripinnis* e do peixe-pedra *S. verrusa* apresentam atividade mitogênica e citotóxica sobre células esplênicas e leucêmicas P388 de murinos (Sato *et al*, 2002). O efeito anti-câncer *in vivo* foi demonstrado pela primeira vez por Sri Balasubashini *et al* (2006a). Esses autores demonstraram efeitos antitumorais hepatoprotetivo e antimetastático do veneno do peixe-leão (*P. volitans*). Esse veneno induz a apoptose no carcinoma de Ehrlich ascitis, ativando a caspase-3 a qual foi evidenciada por fragmentação nuclear. Um peptídeo purificado a partir desse veneno apresenta atividade anti-proliferativa em cultura de células HEP2 e HELA (Sri Balasubashini *et al*, 2006b)

Recentemente foi demonstrado que o veneno do peixe-escorpião *S. plumieri* também possui um potente efeito antitumoral em cultura de células de glioblastoma e de carcinoma de Ehrlich ascitis de forma dose dependente. O veneno reduz significativamente o metabolismo induzindo distúrbios morfológicos como a redução do volume citoplasmático e arredondamento da forma celular. Em altas concentrações o veneno também inibe a adesão e proliferação celular. Esses resultados sugerem que o efeito antitumoral induzido por esse veneno deve estar associado à capacidade de induzir apoptose. Esses dados indicam o potencial biotecnológico de venenos de peixes como fontes de protótipos farmacológicos (Soprani, 2008).

A atividade cardiovascular certamente é o efeito dominante e mais potente das peçonhas de peixes e historicamente tem sido o objeto de estudo da maioria dos trabalhos. Estudos *in vivo* revelam que os venenos dos peixes produzem, em sua maioria, efeito bifásico consistindo de resposta depressora seguida de resposta pressora. Geralmente a resposta depressora é atribuída à vasodilatação periférica e a pressora atribuída a diferentes mecanismos (Church e Hosgson, 2002a).

O veneno do peixe-gato *H. fossilis* produz resposta hipotensiva, a qual não foi afetada por bloqueio dos receptores muscarínicos e histamínicos (Datta *et al*, 1982). O

mesmo efeito é gerado pelo veneno do peixe *P. motoro*, entretanto, esse efeito é atribuído à ativação de receptores muscarínicos e intensa vasodilatação periférica (Rodrigues et al, 1972). O veneno do peixe-leão *P. volitans* também produz resposta hipotensiva, relacionada com a formação de NO e ativação de receptores muscarínicos, em coelhos (Church e Hodgson, 2000c).

Entretanto o veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) produz hipertensão em coelhos e ratos anestesiados. Essa resposta é bifásica, constituída de uma resposta pressora menor, seguida de outra resposta maior e sustentada. A primeira fase da resposta é atenuada por bloqueadores dos receptores adrenérgicos, mas os mecanismos envolvidos na segunda fase da resposta ainda não foram esclarecidos (Hopkins et al, 1996). Entretanto, esses resultados foram atribuídos à utilização do veneno degradado, e experimentos posteriores com o veneno “in natura” do peixe *S. trachynis* demonstraram que a primeira fase da resposta é constituída de resposta hipotensora (Hopkins et al, 1996, Church e Hodgson, 2000a). Contudo, em cachorros anestesiados o veneno do *S. trachynis* induziu primeiro uma resposta hipertensora para depois induzir a resposta hipotensora (Weiner, 1959). Estudos com veneno do peixe-pedra de outra espécie (*S. horrida*) também demonstram resposta hipertensora seguida de resposta hipotensora (Austin et al, 1961). Entretanto, um efeito hipotensor sozinho também já foi documentado *in vivo* (Saunders, 1959). As toxinas SNTX e VNTX também produzem hipotensão *in vivo* (Garnier et al, 1995).

O veneno do peixe *T. draco* também produz hipotensão dose-dependente em ratos anestesiados (Saunders, 1959; Russell e Emery, 1960). Entretanto, doses subletais do veneno desse peixe produzem resposta bifásica consistindo de uma resposta transiente hipertensora seguida de resposta hipotensora sustentada em gatos anestesiados (Russell e Emery, 1960).

Uma resposta bifásica também é vista em estudos que utilizam o veneno do peixe *G. marmoratus* (Hopkins e Hodgson, 1998). A fase hipotensora não foi alterada pela atropina, entretanto, foi atenuada pelo bloqueio da produção de NO e da ação da

ciclooxigenase, evidenciando a participação da vasodilatação periférica na resposta. Por outro lado, os mecanismos envolvidos na fase hipertensora não foram elucidados (Hopins e Hogson, 1998).

O veneno do peixe-escorpião (*S. guttata*) também gera resposta bifásica em coelhos, gatos, e cachorros. Porém, a atropina é eficiente no bloqueio da fase hipotensora (Carlson et al, 1973). Resultados preliminares do Laboratório de Química de Proteínas demonstraram que o envenenamento pelo peixe-escorpião *S. plumieri* induz uma queda abrupta na pressão sanguínea e diminui a frequência cardíaca em ratos. Sendo que altas doses levam à parada respiratória e à parada cardíaca (Carrijo et al, 2005).

Existem poucos estudos sobre a peçonha de peixes-escorpião na literatura. Os trabalhos existentes demonstram algumas propriedades químicas, farmacológicas, efeitos inflamatórios, cardiovasculares e a letalidade desses venenos (Boletini-Santos et al, 2008; Carlson et al., 1971, 1973; Carrijo et al, 2005; Schaeffer et al., 1971). Assim, ainda não se sabe se os efeitos cardiovasculares observados *in vivo* atribuídos ao veneno do *S. plumieri* são gerados apenas pela ação direta do veneno sobre o sistema cardiovascular, ou se o impacto da extrema dor e sofrimento, após o envenenamento contribui para os sintomas cardiovasculares apresentados pelas vítimas.

O presente estudo, portanto, objetiva caracterizar e documentar, pela primeira vez, os efeitos da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* diretamente sobre o coração, bem como purificar parcialmente a fração protéica responsável pela atividade cardiovascular desta peçonha.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

- Estudar e caracterizar os efeitos cardíacos “*in vitro*” induzidos pelo veneno do peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*), sobre corações isolados de ratos.

2.2 – Objetivos específicos

- Investigar e caracterizar os efeitos da peçonha bruta do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* sobre corações isolados de ratos.
- Purificar parcialmente a fração protéica com atividade cardiovascular da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*
- Verificar a participação dos receptores adrenérgicos na ação da peçonha bruta *S. plumieri* e da fração purificada sobre corações isolados de ratos
- Avaliar a participação do endotélio na atividade da fração protéica do veneno *S. plumieri* sobre o leito vascular coronariano de ratos
- Avaliar a participação dos produtos da ciclooxigenase na ação do veneno *S. plumieri*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Peixes

Foram utilizados exemplares de peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) capturados por mergulhadores licenciados pelo IBAMA com auxílio de puçá manual. A captura foi realizada em locais de águas rasas, próximos de rochas e recifes de coral no litoral de Aracruz do estado do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em aquário com água marinha e suprimento adequado de oxigênio até sua identificação. A identificação foi realizada pela observação de manchas brancas sobre a coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, que são características desta espécie (Figueiredo e Menezes, 1980).

Ratos

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente três meses de idade (250-300g) obtidos do Biotério de Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o recomendado pelo COBEA e certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFES). Os animais foram mantidos sob temperatura e umidade controladas, em uma sala iluminada 12h por dia, sendo que o acesso à ração e água foi livre.

3.2. Extração da peçonha

A peçonha foi extraída de espécimes selvagens de *S. plumieri*, de acordo com o método de batch previamente descrito por Schaeffer et al. (1971). Os espinhos dorsais e anais foram removidos dos peixes previamente anestesiados por resfriamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), triturados e seus conteúdos foram solubilizados em água destilada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a $4^{\circ}\text{C}/15.000\text{ g}$ com o

objetivo de remover o material insolúvel. O extrato (veneno bruto) foi congelado em nitrogênio líquido, por não mais que 20 dias e utilizado nos experimentos. Três ou quatro peixes foram utilizados em cada extração. Os passos do processo de extração da peçonha de *Scorpaena plumieri* estão mostrados na figura 3.

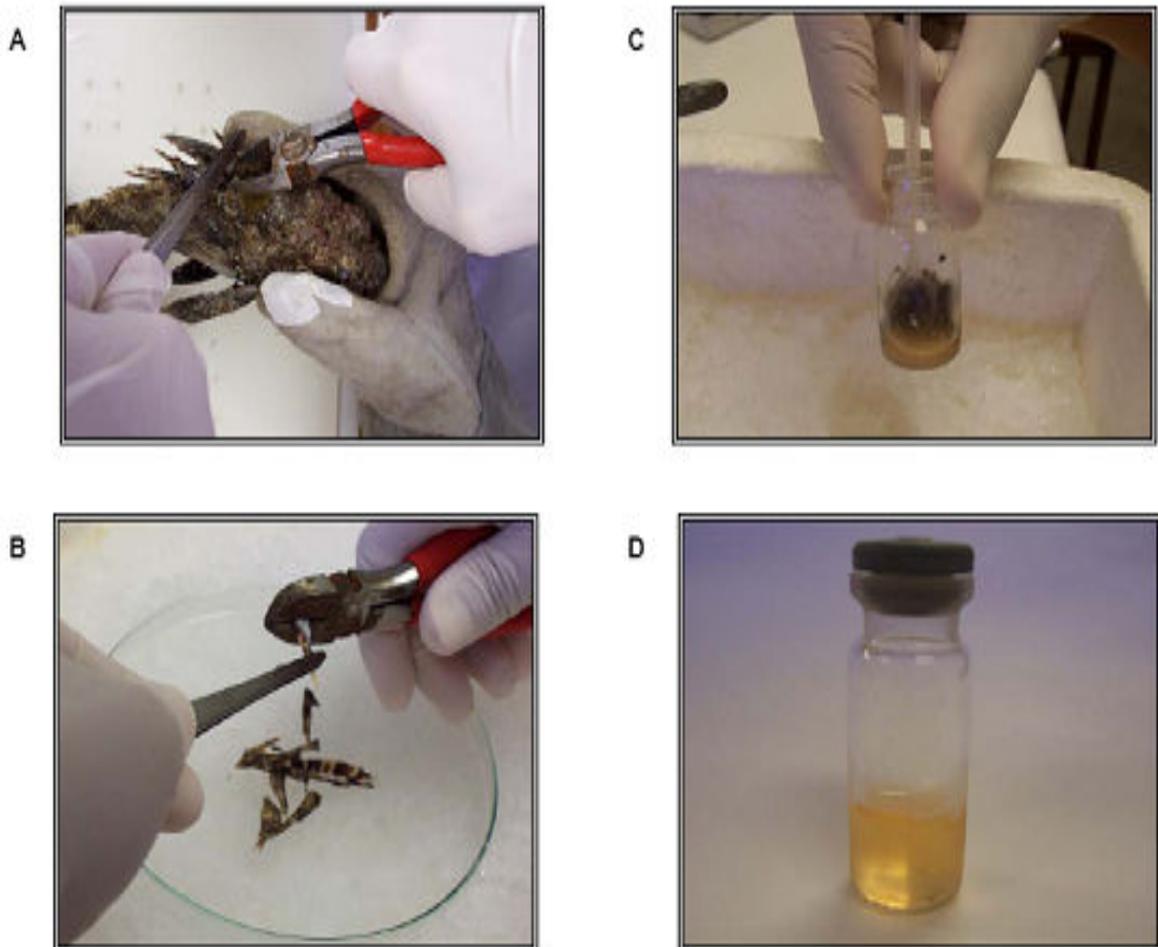


Figura 3 – Extração da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Trituração dos espinhos. (C) Homogeneização dos espinhos fatiados em água purificada. (D) Fração solúvel da peçonha bruta após a remoção das partículas insolúveis por centrifugação

3.3. Dosagem de proteína

O conteúdo protéico da peçonha bruta, da fração cardiovascular e das amostras obtidas nas etapas de fracionamento foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

3.4. Fracionamento da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

A peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri* foi fracionado por filtração em gel em Sephacryl S-200 HR (Merk) como previamente descrito por Carrijo *et al.*, 2005. Amostra do veneno bruto recém-extraído, 83 mg em 10mL de tampão fosfato (10mM), pH 7,6 com 0,4M NaCl, foi aplicada na coluna (2.0 x 120cm) equilibrada e eluída com o mesmo tampão. A cromatografia foi realizada a 4° C com fluxo de 6,4mL/h, e as frações, de 1,6mL, foram coletadas automaticamente utilizando-se um coletor RedFrac (Amersham, Uppsala, Suécia). A eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 280nm (espectrofotômetro UV/visível Ultrospec 1000, Amersham, Uppsala, Suécia).

Uma amostra (10 µg de proteína) de cada fração eluída foi testada para detecção da atividade cardiovascular. As frações ativas foram agrupadas e adicionadas de glicerol, para uma concentração final de 10% v/v de acordo com Church and Hodgson, 2000a, Church and Hodgson, 2001, a qual foi mantida a 5° C. Essa solução foi utilizada para os ensaios até quatro semanas após seu preparo.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Tricina

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Tricina, que proporciona alta resolução para mistura de proteínas de 1 a 100 kDa, foi realizada conforme descrito por Schagger e Von Jagow (1987). A partir de solução de acrilamida-bisacrilamida na relação 48: 1,5% em água, preparou-se o gel de separação a 10%, contendo 13,3% de glicerol p/v, 0,033% de persulfato de amônio p/v, 0,033% temed v/v, 0,1% de SDS p/v e Tris-HCl 1M pH 8,45.

Sobre o gel de separação foi preparado gel de concentração a 4%, a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de todos os reagentes citados acima, com exceção do glicerol. Para polimerização do gel foram utilizadas placas de vidro de 8,5 cm de comprimento, 10 cm de largura e 75mm de espessura. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 12% de glicerol p/v, 0,01% de azul brilhante G p/v. Como padrão de massa molecular foi utilizado ~10µg de uma mistura de proteínas (6,5 a 200kDa). A eletroforese foi conduzida sob tensão de 100V à temperatura ambiente. Foi utilizado como tampão do anodo Tris-HCl 0,2M pH 8,9 e como tampão do catodo Tris-HCl 0,1M contendo 0,1M de tricina e 0,1% de SDS pH 8,25. Decorrido o tempo adequado da eletroforese (~2 horas, indicado pelo corante azul brilhante G), o gel foi retirado da placa e mergulhado durante 30 minutos na solução fixadora (metanol: ácido acético: água; 50: 10: 40 /v/v/v) e em seguida corado em solução 0,025% azul brilhante G em ácido acético e água (1:9) durante 1 hora. O descoramento foi feito em solução de ácido acético 10% em água. Todo o processo de coloração foi realizado sob agitação lenta.

3.6. Coração isolado

Os estudos da ação cardiovascular foram realizados com corações isolados de ratos Wistar (250-300 g) utilizando o método de Langendorff (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Germany), de acordo com o descrito por Doring, 1990. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (65 mg/kg, *ip*) e heparinizados (100 units/kg) a fim de evitar coagulação sanguínea no leito vascular coronariano. Quinze minutos após a injeção de heparina, o tórax foi aberto e o coração foi rapidamente dissecado de suas conexões e imediatamente transferido para o aparelho de perfusão através da canulação da aorta. A canulação da aorta foi realizada ao nível de sua curvatura por onde o coração foi perfundido retrogradamente com solução de Krebs modificada (contendo, em mM: NaCl - 120, CaCl₂·2H₂O - 1.26, KCl - 5.4, MgSO₄·7H₂O -

2.5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ - 2, NaHCO_3 - 27 ; Na_2SO_4 - 1.2; EDTA - 0.03 e glicose 11mM) e continuamente mantida a 37° C e saturada com mistura Carbogênica contendo 95% O_2 e 5% CO_2 (pH mantido a 7,4). O fluxo foi mantido constante (10 ml/min) por meio de uma bomba de rolete (Hugo Sachs, Germany), assim, as alterações na pressão de perfusão foram diretamente relacionadas às mudanças na resistência vascular. Um balão de látex preenchido com água foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor (TPS-2 Statham, Incor, São Paulo, SP, Brasil), através de uma cânula de aço. Posteriormente o balão foi pressurizado até atingir a pré-carga de 10 mmHg. O cateter de perfusão da aorta também foi conectado a um transdutor (TPS-2 Statham). Para evitar o acúmulo de líquido na cavidade ventricular, realizou-se uma leve perfuração no ventrículo esquerdo. Para a aquisição de dados foi utilizado o PowerLab, Ad Instruments, Austrália, sendo que a taxa de amostragem foi de 1KZ.

Foram monitorados os seguintes parâmetros cardiovasculares: frequência intrínseca de marcapasso, pressão de perfusão coronariana (PPC) e pressão ventricular esquerda máxima (PVE_{max}). Para obter índices da contratilidade cardíaca foram calculadas a primeira derivada positiva e a primeira derivada negativa da pressão ventricular (+dP/dt e -dP/dt , respectivamente). Dessa forma, possíveis efeitos cronotrópicos (alterações na frequência de marcapasso), inotrópicos (alterações na pressão ventricular) e lusitropico (alteração na velocidade de relaxamento) foram analisados.

Após 30 minutos de estabilização da preparação, os parâmetros basais foram medidos e as amostras do veneno do peixe *S. plumieri* foram administradas *in bolus*. Os experimentos foram realizados de forma a se acessar os efeitos do veneno bruto (5 a 80 µg de proteína), das frações cromatográficas (10 µg) e da fração cardiovascular (FC) (1 a 7 µg de proteína). Algumas análises foram realizadas na presença de antagonistas de receptores adrenérgicos (propranolol 10µM ou prazosin 10 µM) os quais foram adicionados à solução de perfusão.

As doses dos antagonistas foram determinadas experimentalmente (dados não mostrados) e de acordo com trabalhos da literatura (Obata and Yamanaka, 1999; Kurosawa et al, 2003, Clements-Jewery et al, 2002). A participação do endotélio vascular na resposta da fração cardiovascular também foi avaliada.

A remoção endotelial foi procedida quimicamente através da infusão de ácido deoxicólico (0.25 μ M). A efetividade da remoção endotelial foi acessada através da ausência de resposta à adenosina. A integridade do músculo liso vascular foi detectada através da resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio.

Todas as respostas foram expressas como porcentagem de mudança a partir do valor basal da pressão de perfusão coronariana, da pressão ventricular esquerda máxima e da $+dP/dt$ e $-dP/dt$.

3.7. Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: propranolol hydrochloride (Sigma), prazosin hydrochloride (Sigma) indometacina (Sigma), ácido deoxicólico (Sigma). As soluções estoques foram feitas em água destilada, com exceção da indometacina que foi diluída em tampão tris-HCl, com subsequente diluição em solução modificada de Krebs.

3.8. Análise estatística.

Todos os valores foram expressos como média \pm SEM. Os dados foram avaliados usando-se análise de variância (ANOVA) duas vias, seguido de teste *post hoc* de Bonferroni. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferença significativa entre os grupos.

4 - RESULTADOS

4.1 - Extração da peçonha bruta do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

Usando o método de batch para a extração da peçonha, do aparato venenoso (13 espinhos dorsais e 3 espinhos anais) provenientes de um único exemplar *S.plumieri* (15cm de comprimento e pesando 350g, aproximadamente) obtivemos em média ≈ 16 mg de proteína.

4.2 - Efeitos do veneno bruto sobre coração isolado de rato.

A figura 4 mostra os resultados da avaliação do efeito da peçonha bruta (5 - 80 μ g de proteína) sobre o coração isolado de ratos. A peçonha bruta induziu um aumento drástico da pressão ventricular esquerda máxima variando de $15 \pm 2\%$ a $117,5 \pm 5,8\%$ (Fig. 4-A) e da $+dP/dt$ (de $16 \pm 4\%$ a $200,2 \pm 20,7\%$; Fig. 4-B). A resposta lusitrópica foi observada com o aumento da $-dP/dt$ (resposta variou de $15 \pm 2\%$ a $117,5 \pm 5,8\%$; Fig. 4-C) e a resposta vasoconstritora foi observada com o aumento da pressão de perfusão coronariana (de $1,0 \pm 0,1\%$, a $24,2 \pm 1,7\%$; Fig 4-D). A peçonha bruta também induziu aumento da frequência intrínseca de marca-passo (de $5,9 \pm 1,4\%$ a $58,6 \pm 6,4\%$. Fig 4-E) sendo que em doses maiores a 80 μ g levou à parada cardíaca.

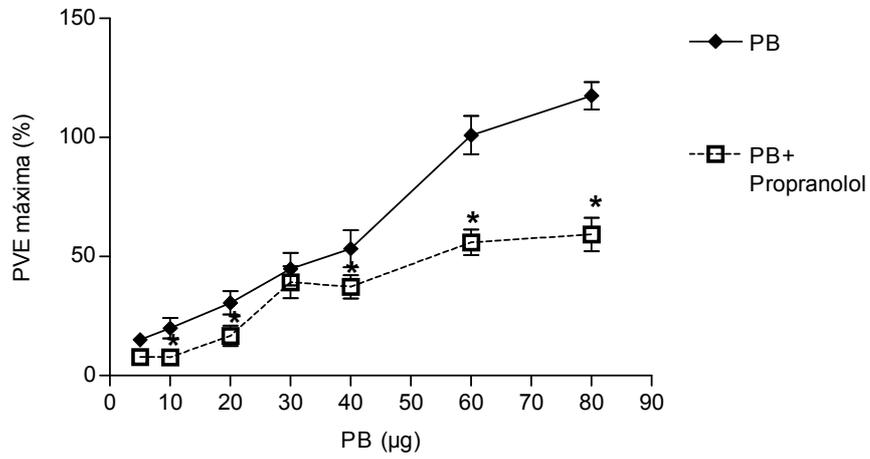
A atividade específica da peçonha bruta considerando a PVE_{max} , $+dP/dt$, a $-dP/dt$, PPC e frequência de marca-passo foi de em média $\approx 1,7$; $3,3$; $3,5$; $0,47$ e $1,3\%$ / μ g; respectivamente.

O efeito inotrópico positivo, lusitrópico positivo e cronotrópico positivo, assim como o efeito vasoconstritor, foram observados de forma transiente, com duração de aproximadamente 2 minutos.

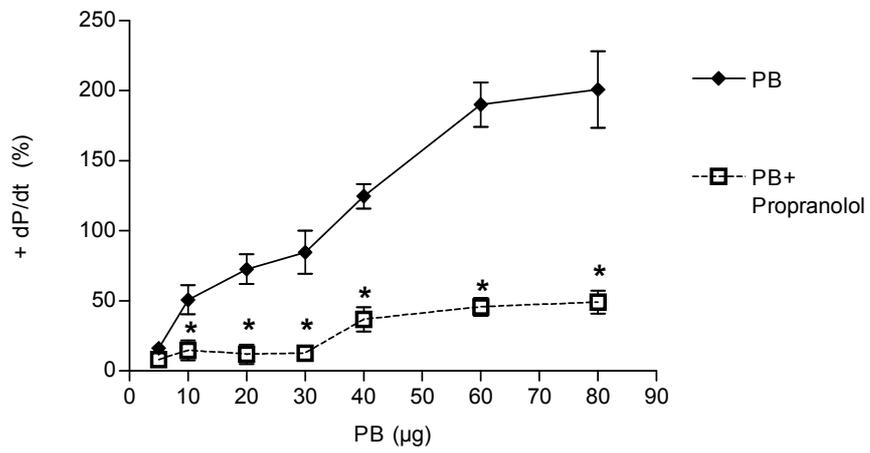
A presença do propranolol (10 μ M), antagonista dos receptores β -adrenérgicos, na solução de perfusão atenuou significativamente todas as respostas induzidas pelo

veneno. O propranolol (10 μ M) reduziu, portanto, em média 43, 72, 81 e 55 e 43% para a PVE_{max}, +dP/dt, -dP/dt, PPC e frequência de marcapasso, respectivamente.

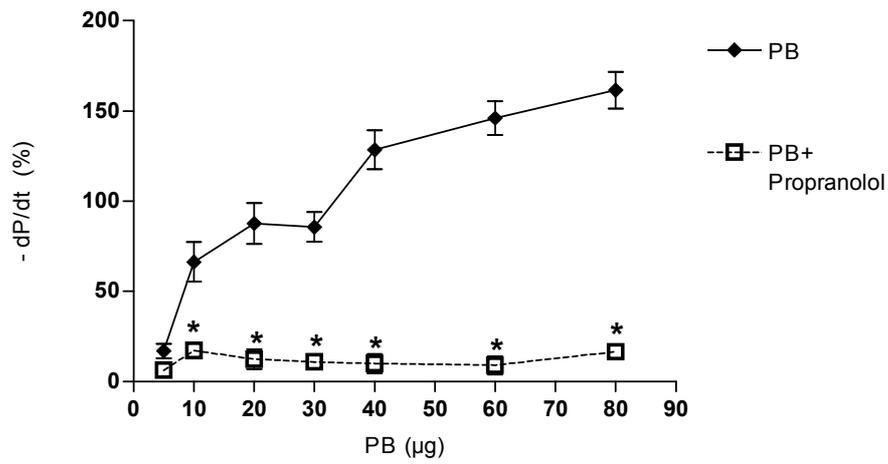
A



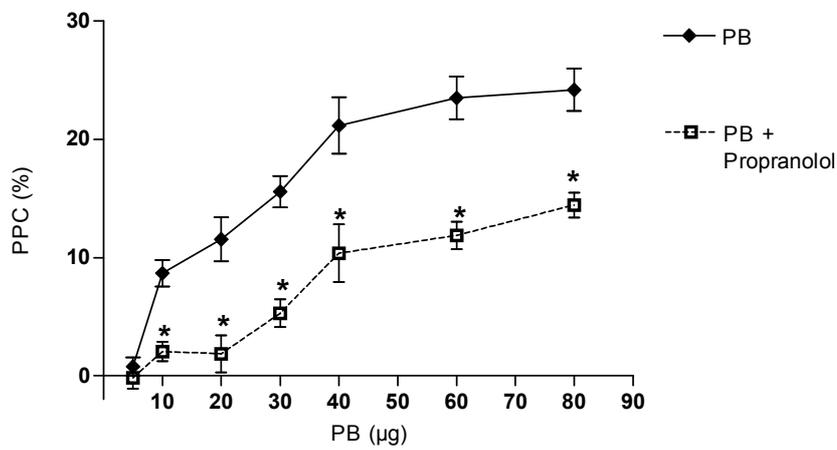
B



C



D



E

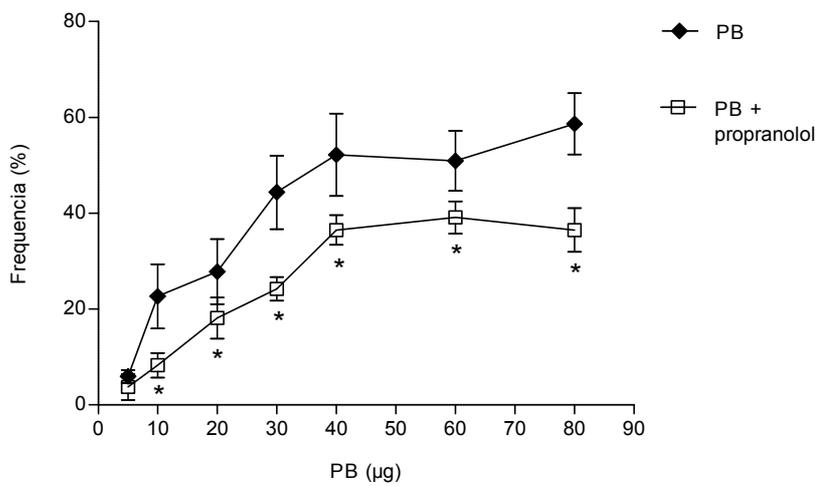


Figura 4 – Efeito da peçonha bruta (PB), 5-80 µg de proteínas, do peixe-escorpião *S. plumieri* sobre coração isolado de rato na presença e ausência de propranolol (10µM). (A) Pressão

ventricular esquerda máxima, (B) +dP/dt, (C) -dP/dT (D) e pressão de perfusão coronariana. N=8 para cada grupo. *p<0,05 quando comparado ao veneno bruto apenas.

4.3 – Purificação da fração cardiovascular da peçonha do peixe-escorpião

Scorpaena plumieri

A purificação parcial de uma fração protéica cardiovascular a partir do extrato bruto da peçonha foi realizada por cromatografia convencional em gel Sephacryl S-200. O processo cromatográfico separou o veneno em seis picos protéicos principais, sendo que a atividade cardiovascular estava associada ao segundo pico (fig. 5). Esse material foi agrupado e referido como fração cardiovascular – FC e correspondeu a aproximadamente 15% do material protéico inicial. A análise protéica por eletroforese da FC revelou a presença de uma banda forte de massa molecular aparente de 90kDa e outras bandas mais fracas.

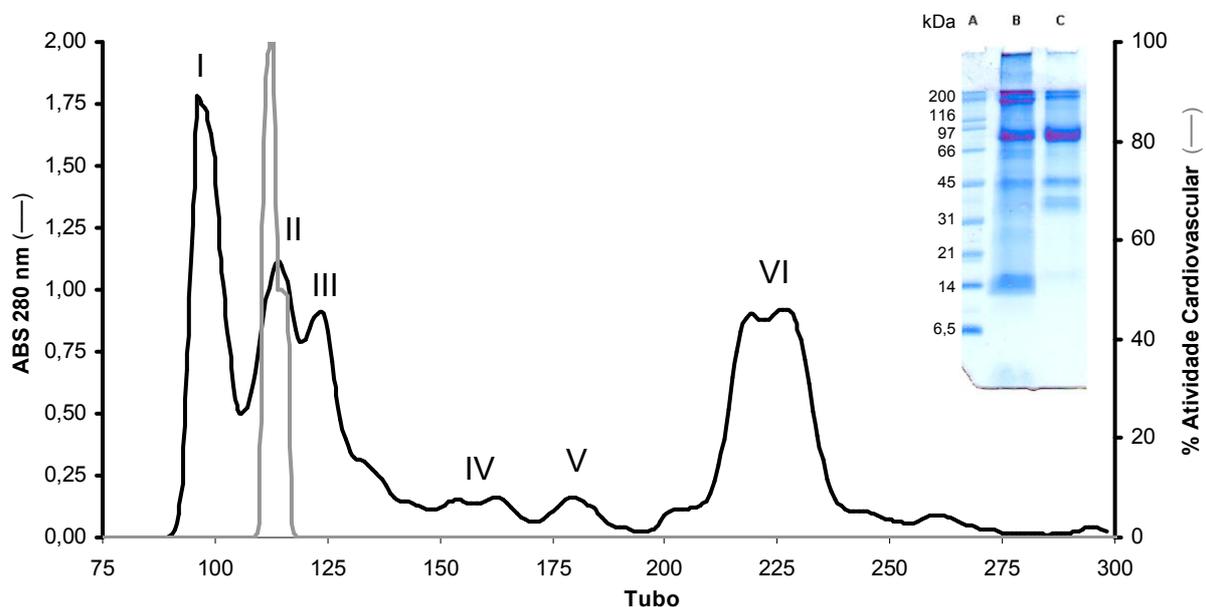


Figura 5 – Perfil cromatográfico da filtração em gel (Sephacryl S-200HR) do veneno bruto *S. plumieri*. A ação cardiovascular foi testada em coração isolado de rato e as frações ativas (em cinza) foram reunidas e denominadas de FC (fração cardiovascular). No alto à direita: Perfil eletroforético (Tricine-SDS-PAGE): linha (A) Marcadores de massa molecular; (B) 30 µg do veneno bruto do *S. plumieri* (C) 20 µg da FC. As bandas foram reveladas com azul brilhante G.

4.4 - Efeitos da fração cardiovascular em coração isolado de rato.

A administração das doses da FC (1-7 µg) reproduziu os efeitos induzidos pela peçonha bruta sobre coração isolado de rato. Assim como ocorreu com o extrato bruto, a FC produziu efeito inotrópico positivo, lusitrópico, vasoconstritor e cronotrópico positivo (fig. 6 e fig. 7). O efeito inotrópico positivo, lusitrópico positivo e cronotrópico positivo, assim como o efeito vasoconstritor, foram observados de forma transiente, com duração de aproximadamente 2 minutos.

A fração aumentou significativamente a pressão ventricular esquerda máxima (a resposta variou de $4,8 \pm 1,6\%$ a $36,0 \pm 4,1\%$), a $+dP/dt$ (a resposta variou de $6,5 \pm 2,3\%$ a $47,3 \pm 3,2\%$), a $-dP/dt$ (a resposta variou de $8,2 \pm 1,7$ a $32,4 \pm 2,3\%$) e aumentou a pressão de perfusão coronariana (resposta máxima: $25,8 \pm 2,3\%$). Fig 7-A, B e C, respectivamente. Além disso, a FC induziu aumento a frequência de marcapasso (Fig 7-E), sendo que a resposta variou de $4,7 \pm 1,2\%$ a $25,9 \pm 2,8\%$. Em média, 1µg da FC induz na PVE_{max}, $+dP/dt$, $-dP/dt$, PPC e na frequência um aumento de $\approx 4,3$; $6,6$; $6,4$; $1,67$ e $4,1\%$, respectivamente (Fig 6– A, B, C, D e E).

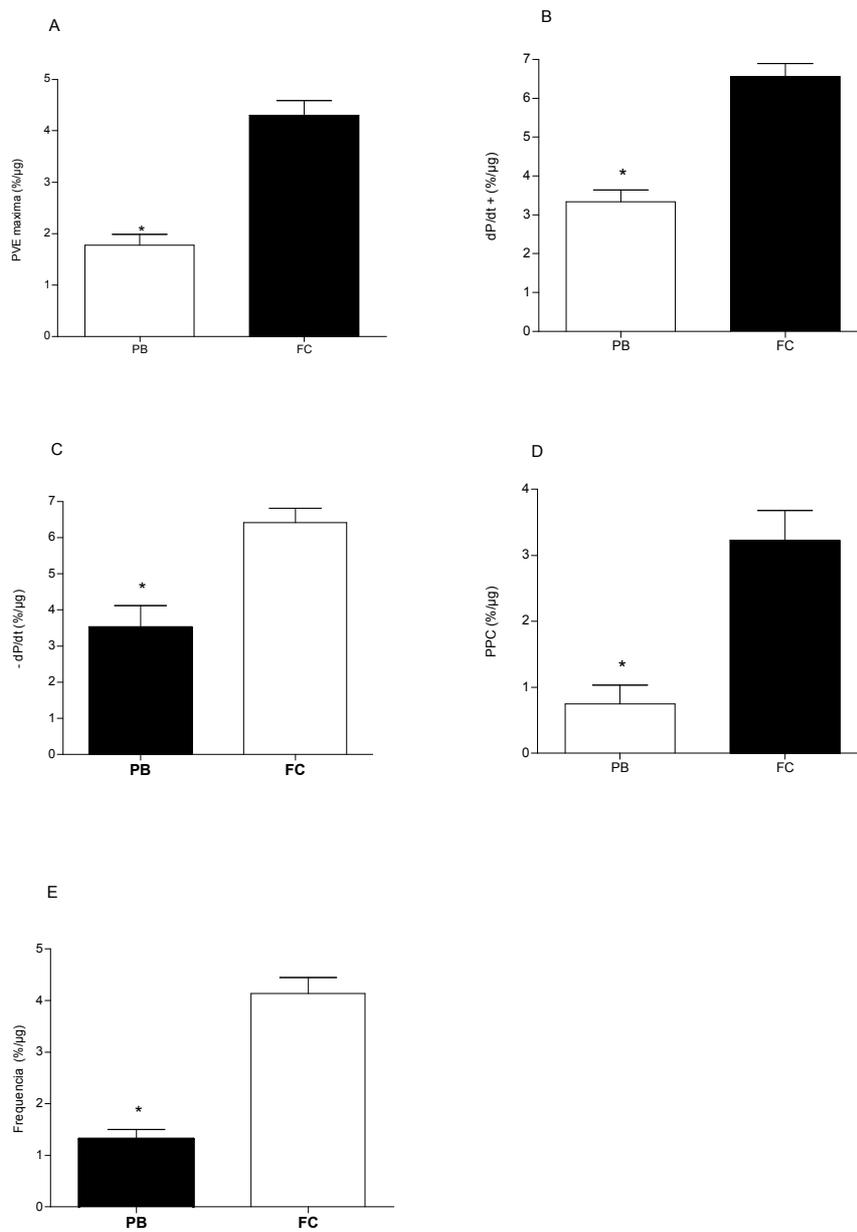


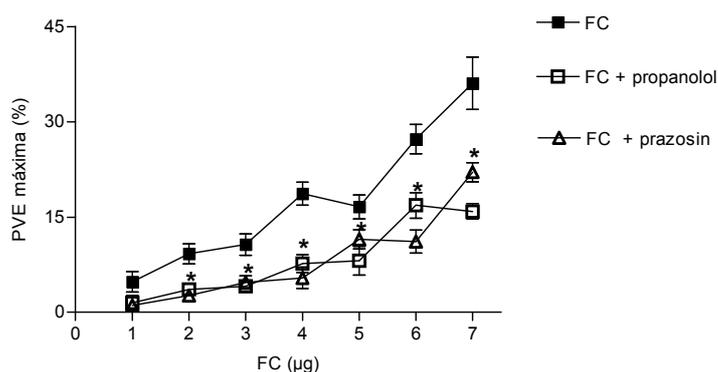
Figura 6 – Comparação da intensidade das atividades cardiovasculares da peçonha bruta (PB) do *S. plumieri* e da fração cardiovascular (FC) expresso em atividade/μg de proteína. (A) Aumento da Pressão ventricular esquerda máxima, (B) Aumento da + dP/dt, (C) Aumento da - dP/dt, (D) pressão de perfusão coronariana, (E) frequência cardíaca.

A fim de testar o possível envolvimento dos receptores adrenérgicos nos efeitos causados pela FC, propranolol (10 μ M) e prazosin (10 μ M) foram adicionados à solução de perfusão.

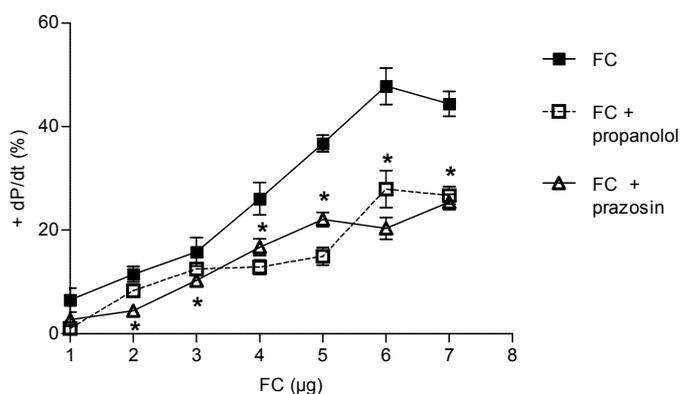
Na presença de propranolol, o aumento da PVE máxima, +dP/dt, -dP/dt, PPC e da frequência de marcapasso, foram reduzidos, em média, aproximadamente 58, 47, 54 e 46 e 54%, (Fig. 6 - A, B ,C, D e E).

A adição do prazosin, antagonista do receptor α_1 -adrenérgico, na solução de perfusão, também atenuou algumas das respostas induzidas pela FC. Em média, o aumento da PVE_{max} , +dP/dt e da PPC foram reduzidos, aproximadamente, em média, 60; 50; 30% (Fig. 6 - A, B e D).

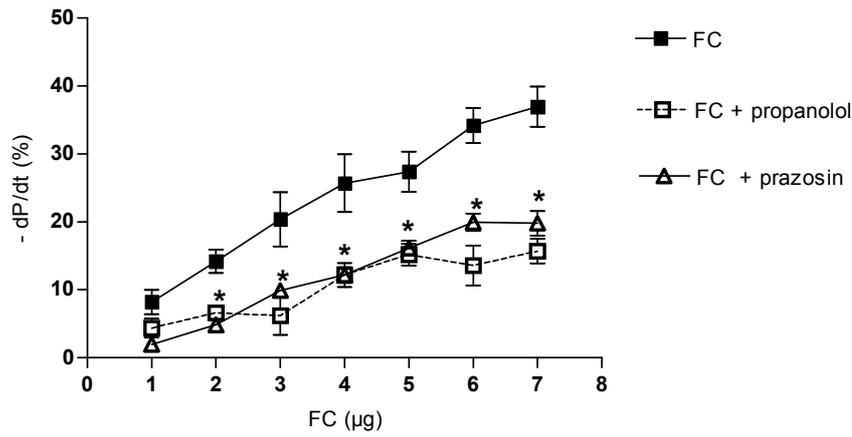
A



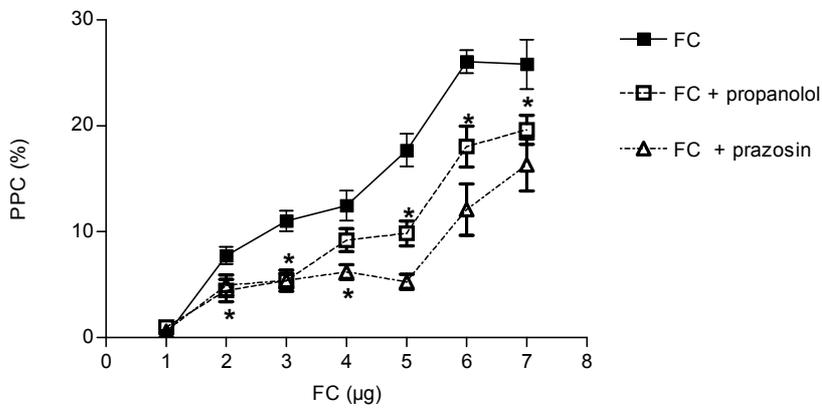
B



C



D



E

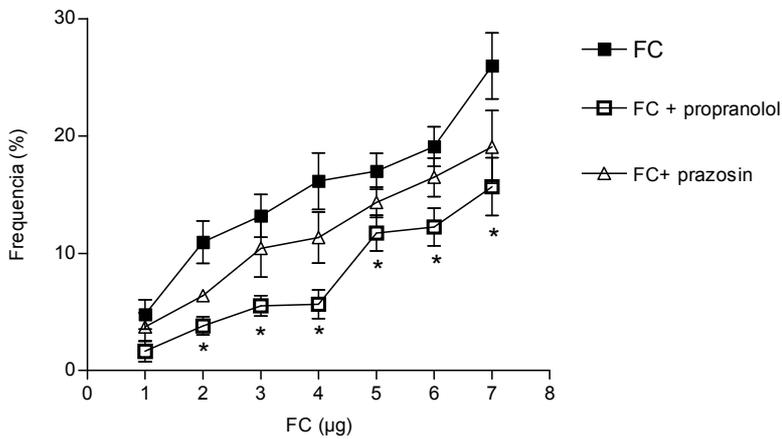
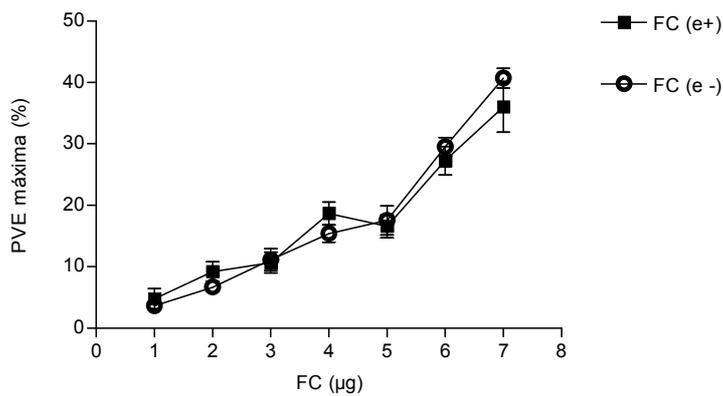


Figura 7. Efeito da fração cardiovascular FC (1-7 µg) em corações isolados de rato na presença e ausência do propranolol (10µM), prazosin (5µM). (A) Pressão ventricular esquerda máxima (PVE_{max}), (B) + dP/dT, (C) - dP/dT, (D) pressão de perfusão coronariana. N=7 para cada grupo. *p<0, 05 quando comparado à FC sozinha e com endotélio intacto.

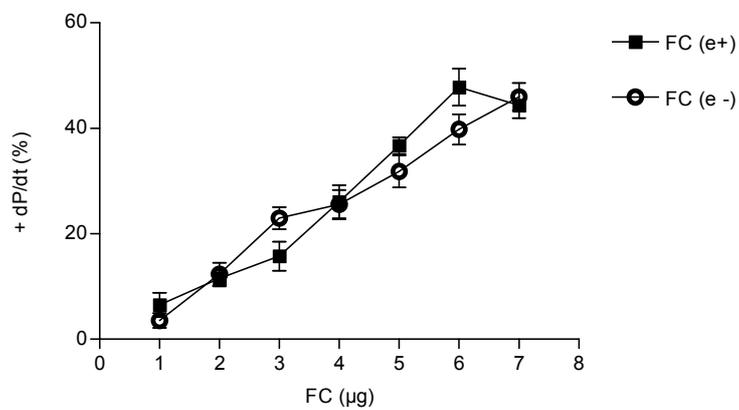
A figura 8 mostra os resultados da participação do endotélio vascular no efeito da FC. A remoção do endotélio reduziu em aproximadamente 42% a vasoconstrição induzida pela FC. A resposta variou de 25,8 para $18,5 \pm 1,3\%$ na maior dose testada. (Fig 8-D). Entretanto, a ausência do endotélio não resultou em alterações na resposta inotrópica, lusitrópica e cronotrópica (Fig 8 – A, B e C e E respectivamente).

O veículo (glicerol 10%) não influenciou nos resultados.

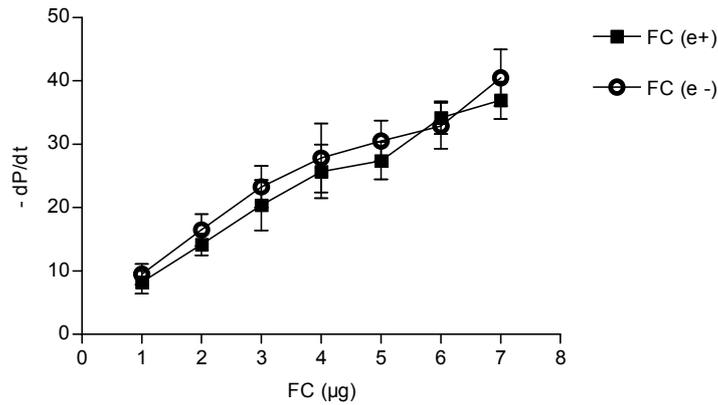
A



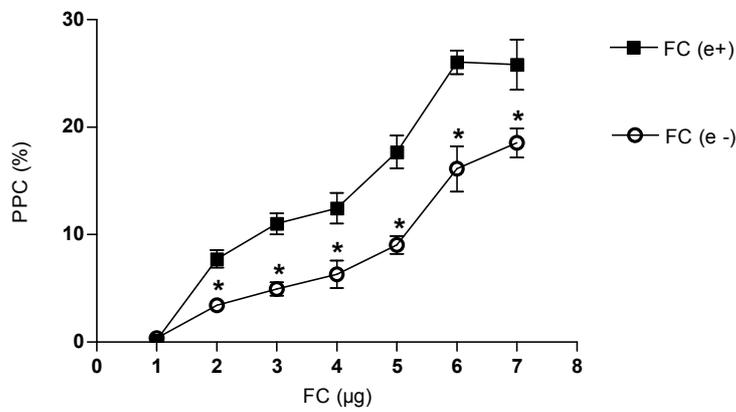
B



C



D



E

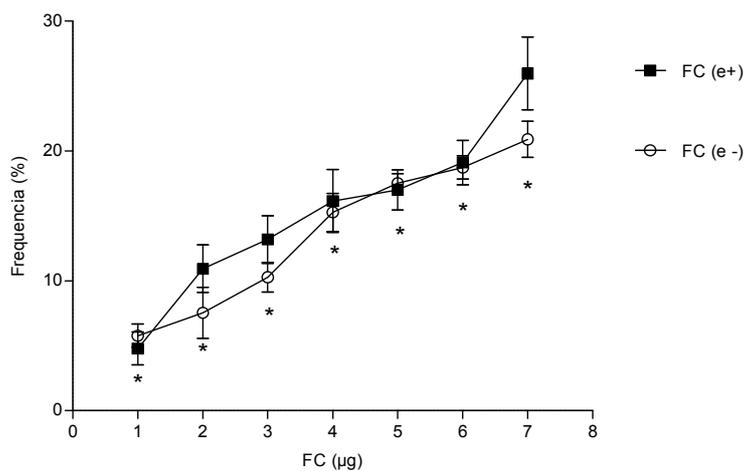


Figura 8. Participação do endotélio nos efeitos induzidos pela fração cardiovascular (FC; 1-7 µg) em corações isolados de rato. (e+) presença; (e-) ausência do endotélio vascular. (A) Pressão ventricular esquerda máxima (PVE_{max}), (B) + dP/dT (C) - dP/dT (D) pressão de perfusão coronariana (E) frequência de intrínseca de marca-passo. N=7 para cada grupo. *p<0,05 quando comparado à FC sozinha e com endotélio intacto.

5 - DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, o potente efeito da peçonha bruta do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* sobre corações isolados de ratos. A peçonha produziu forte efeito, inotrópico positivo, lusitrópico e vasoconstritor, sendo que todos eles se desenvolveram de forma transiente e dose-dependente. Sobre a frequência intrínseca de marcapasso a peçonha suscitou taquicardia sendo que doses maiores que 80 µg, levaram à parada cardíaca.

Venenos animais tem sido foco de muitos estudos nas últimas décadas. Além de favorecer o desenvolvimento de mecanismos de proteção das vítimas do envenenamento, o conhecimento sobre as ações dos venenos também possibilita a descoberta de novos agentes farmacológicos e fisiológicos. Os venenos são fontes de protótipos farmacêuticos e de ferramentas para diagnósticos, sendo que cinco derivados de veneno já são utilizados como medicamentos e vários outros compostos ativos relacionados ao veneno estão sendo estudados em ensaios pré-clínicos ou clínicos. (Menez et al, 2006)

Embora os envenenamentos por peixes não representem fonte significativa de acidentes e mortalidade humana, os mesmos podem causar graves seqüelas. A sintomatologia do envenenamento para a maioria das espécies de peixe é muito similar, sendo que a severidade dos sintomas está relacionada com o número de espinhos envolvidos no acidente e da profundidade de penetração na vítima. (Church e Hodgson, 2002a).

O peixe-escorpião *S. plumieri* é um dos peixes mais freqüentes e peçonhentos da família Scorpaenidae do litoral brasileiro (Figueiredo and Menezes, 1980; Carvalho-Filho, 1999). Estudos clínicos demonstram que o envenenamento por esse peixe é caracterizado primeiramente pela intensa dor acompanhada de tumefação, eritema e equimose da região afetada. Em seguida podem ser observadas manifestações sistêmicas (em 13% dos casos) como ansiedade, náusea, vômitos, hipotensão e

sincope (Haddad et al., 2003). Estudos farmacológicos com a peçonha do *S. plumieri* evidenciam sua letalidade. Administração intravenosa da peçonha em ratos gera efeitos no sistema cardiovascular e respiratório consistindo em queda abrupta da pressão arterial média e da frequência respiratória levando à parada cardíaca. A peçonha possui também efeitos hemolíticos, hemorrágicos e atividade proteolítica (Carrijo et al., 2005).

Nosso interesse em investigar a atividade *in vitro* da peçonha do peixe *S. plumieri* é justificado pelo fato de que ainda permanece obscuro se os efeitos cardiovasculares observados *in vivo* são causados apenas pela ação direta da peçonha sobre o sistema cardiovascular ou se o impacto da extrema dor e sofrimento, após o envenenamento, contribui para os sintomas cardiovasculares apresentados pelas vítimas. Dessa forma, investigamos os efeitos da peçonha bruta em corações isolados de ratos, excluindo a influencia de outros sistemas que medeiam a dor.

Como já descrito, quando administramos a peçonha diretamente no coração, observamos os seguintes efeitos: efeito inotrópico positivo (aumento da pressão ventricular esquerda máxima e da $+dP/dt$), lusitrópico (aumento da $-dP/dt$), vasoconstritor (aumento da pressão de perfusão coronariana) e cronotrópico positivo (aumento da frequência cardíaca de marca-passo).

Respostas similares já foram documentas em estudos com o veneno de outros peixes. Entretanto a maioria dos estudos relata que os venenos de peixes induzem um efeito bifásico composto por uma resposta inotrópica e cronotrópica negativa seguida de resposta inotrópica e cronotrópica positiva em preparações cardíacas. A resposta negativa parece envolver a atividade de receptores muscarínicos, devido à presença de compostos colinomiméticos ou devido à liberação de acetilcolina endógena. Os efeitos positivos parecem envolver pelo menos parcialmente, a atividade de adrenoreceptores (por ações diretas ou indiretas). Entretanto, respostas não-adrenérgicas também já foram observadas (Church e Hogson, 2002a).

O veneno do peixe-escorpião *S. guttata* produz resposta bifásica em átrio isolado de rato. A resposta inclui uma redução inicial da força de contração e da frequência cardíaca, mas é seguida de um marcante efeito cronotrópico e inotrópico positivo (Carlson et al, 1971). O veneno do escatófago (“spotted butterfly”) *Scatophagus argus* em coração isolado de sapo igualmente resulta um aumento da amplitude de contração e da frequência cardíaca, e ainda, na resposta contrátil do íleo isolado de cobaias (Muhuri et al, 2004).

Além disso, o veneno do peixe-soldado (*Gymnapistes marmoratus*) também exerce efeito contrátil nos músculos isolados sistema gastrointestinal de cobaia (Hopkins et al, 1997) e efeito inotrópico bifásico sobre átrio isolado de rato. Estudos com o veneno do peixe-gato indiano (*Plotosus canius* Hamilton) revelam resposta inotrópica positiva. Pequenas doses do veneno desse peixe aumentam a força de contração dos corações de coelhos e sapos, enquanto que doses maiores levam à parada cardíaca. A toxina P-C, purificada deste veneno, também induz a parada cardíaca (Auddy e Gomes, 1996). Este veneno também atua sobre aurículas de cobaias aumentando a frequência e a amplitude de contração (Audy et al, 1994; 1995).

A cardioleputina, toxina purificada do veneno do peixe-pedra (*Synanceja verrucosa*), promove rápido aumento na resposta contrátil e um aumento moderado da frequência cardíaca em preparações com átrio de cobaia (Abe et al, 1996). Entretanto, o efeito da cardioleputina parece ser irreversível, o que difere das respostas transientes observadas no presente trabalho. O veneno bruto do peixe-pedra (*S. trachynis*) causa, além da broncoconstrição, constrição do íleo de cobaias. A constrição do músculo liso do íleo é reduzida pela indometacina, mas inalterada pelo bloqueio dos receptores histamínicos (Hopkins et al, 1997). O aumento da frequência e da força de contração (após efeito inotrópico negativo) em átrio isolado de rato e em fibras atriais isoladas de rã também são respostas do veneno do peixe-pedra *S. verrucosa* (Church e Hodgson, 2000; 2001; Hopkins et al, 1994; 1996; Sauviat et al, 1995).

O veneno bruto do peixe-leão (*Pteros volitans*), assim como o do peixe soldado (*G. marmoratus*), induz forte efeito cronotrópico e inotrópico bifásico sobre átrio isolado de ratos, composto por uma resposta negativa transitória seguida de uma resposta positiva e sustentada (Church e Hodgson, 2002). Esses efeitos inotrópicos positivos, listados acima, foram inibidos pelo propranolol, antagonista não-seletivo dos receptores β -adrenérgicos. (Chucch e Hodgson, 2002b; Hopkins e Hodgson, 1998).

Uma vez que o sistema adrenérgico está relacionado com diversos aspectos das funções cardiovasculares e é considerado um dos principais reguladores das funções cardíacas (Broddie e Michel, 1999), nós investigamos o envolvimento dos receptores adrenérgicos nos efeitos gerados pelo veneno do peixe-escorpião *S. plumieri*.

A presença de propranolol na solução de perfusão atenuou, em média, aproximadamente 43, 72, 81, 55 e 43% o aumento da PVE_{max}, +dP/dt, -dP/dt, PPC e da frequência de marcapasso. Esses dados sugerem que as respostas geradas pelo veneno envolvem, pelo menos parcialmente, os receptores β -adrenérgicos, atuando via algum agonista adrenérgico presente na peçonha ou via liberação de norepinefrina das terminações nervosas simpáticas presentes no coração.

Trabalhos da literatura demonstram que venenos de outros peixes são capazes de induzir a liberação de neurotransmissores como acetilcolina e substância P (Kriger et al; 1993; Colassante et al, 1996) e liberação de catecolaminas de células neuroendócrinas (Kriger et al; 1993; Colassante et al, 1996). A exposição à traquinilisina, toxina do *S. trachynis*, induz a liberação de catecolaminas pelas células cromafins bovinas em cultura, sendo que a secreção máxima ocorre 20 a 30 minutos após a exposição, sendo esta resposta dependente de Ca^{2+} no meio externo (Meunier et al, 2000).

A epinefrina e a norepinefrina já foram detectadas no veneno do peixe-pedra e são consideradas responsáveis por parte do efeito tóxico de venenos de peixe (Church and Hodgson, 2000, Church end Hodgson, 2002b, Sauviat, 1995). A presença de

norepinefrina, dopamina e triptofano já foram detectadas e quantificadas na peçonha do *S. horrida* e *S. verrucosa* utilizando cromatografia de alta resolução e espectrometria de massa (Garnier et al., 1996). A presença de acetilcolina também foi sugerida nos venenos dos peixes *S. trachynis*, *P. volitans* e *Potamotrygon motoro* (Cohen and Olek, 1989; Rodrigues, 1972). Isso está de acordo com fato de que vários venenos das mais variadas espécies de animais evoluíram de forma a manipular os sistemas monoaminérgicos com a conseqüente aquisição da capacidade de defesa e de predação (Weisel-Eicher e Libersat, 2004).

Entretanto, as repostas cardiovasculares induzidas pela peçonha bruta no presente trabalho, são quase totalmente neutralizadas pelo soro produzido contra a peçonha do peixe pedra *S. trachynis* - SFAV (dados não mostrados), demonstrando que os efeitos observados foram induzidos pela parte protéica da peçonha.

Uma fração protéica cardiovascular (CF) foi semi-purificada por cromatografia de filtração em gel convencional e a análise eletroforética revelou uma banda mais intensa, com massa molecular de aproximadamente 90kDa. Estudos prévios demonstraram que a peçonha do peixe *S. plumieri* e FC possuem atividade hemolítica em eritrócitos de coelho (Carrizo et al., 2005 e comunicação pessoal), sugerindo que a peçonha do peixe *S. plumieri*, apresenta um fator com atividade letal e cardiovascular semelhante ao encontrado nas peçonhas dos peixes pedras. Outro dado que corrobora com esta hipótese é que massa molecular da banda protéica encontrada na FC descrita acima é similar à massa molecular das subunidades das toxinas letais/cardiovasculares purificadas de peixes pedra. Estas toxinas (SNTX, TLY e neo-VTX) são proteínas heterodiméricas, e cada subunidade apresenta massa molecular de aproximadamente 80 KDa (Colasante *et al*, 1996; Garnier *et al*, 1995; Poh *et al*, 1991). Além disso, a neutralização dos efeitos cardiovasculares, induzidos pela peçonha bruta de *S. plumieri*, pelo SFAV, sugere que fração protéica com atividade cardiovascular é semelhante à do veneno do peixe-pedra.

A FC reproduziu os efeitos induzidos pelo veneno bruto sobre coração isolado de rato sendo que as condições de estoque não causaram qualquer perda significativa de atividade. FC gerou resposta inotrópica positiva, lusitrópica, vasoconstritora e cronotrópica positiva. A atividade específica, calculada a partir da resposta cronotrópica, demonstrou que a FC foi purificada por um fator de 3,1. Os efeitos produzidos pela fração foram atenuados pela presença do propranolol ou do prazosin, indicando a importância dos receptores adrenérgicos nessas respostas.

Sabe-se que os efeitos promovidos pelo sistema adrenérgico no coração são normalmente mediados pelos adrenoceptores α_1 e β . Entretanto, ao contrário do veneno bruto, é improvável que a FC contenha qualquer tipo de amina biogênica, o que pode sugerir que a fração induza a liberação de norepinefrina das varicosidades simpáticas presentes no coração, que por sua vez atua nos receptores α_1 e β -adrenérgicos, mediando os efeitos inotrópico, lusitrópico, vasoconstritor e cronotrópico.

A estimulação dos receptores α_1 ativa fosfolipase C com conseqüente produção de segundos mensageiros 1,4,5-tri-fosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), este último leva à ativação da proteína quinase C (PKC). PKC que, por sua vez, medeia uma variedade de efeitos do coração como efeito inotrópico positivo.

Os mecanismos envolvidos no efeito inotrópico positivo gerado pela estimulação dos receptores adrenérgicos α_1 no coração ainda não foram totalmente esclarecidos. A estimulação desses receptores ativa canais de cálcio tipo L voltagem-dependente via proteína quinase C, com aumento discreto da concentração intracelular de cálcio, sendo que a fosforilação, independente da PKC, miosina-quinase de cadeia leve parece ser importante, apesar desse mecanismo ainda não ser totalmente caracterizado no músculo cardíaco. Além disso, aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , como resultado da alcalinização intracelular (via ativação

do trocador Na^+/H^+) também parece ser importante. (Pucéat et al, 1992; Terzic et al, 1992).

Como já mencionado, efeitos inotrópicos positivos e cronotrópicos também são produzidos pela ativação de receptores β -adrenérgicos

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos, diferente dos receptores α_1 , ativa proteína quinase A (PKA) via proteína G/AMPC. A PKA ativada, fosforila diversas outras proteínas e acelera o relaxamento (efeito lusitrópico), aumenta a força de contração do músculo cardíaco e a frequência cardíaca. A peçonha e a FC induziram estes efeitos no coração isolado de ratos.

O efeito lusitrópico pela estimulação dos receptores β está associado com a fosforilação específica do resíduo Ser-16 da fosfolamban, ocasionando o aumento da taxa de recaptação de Ca^{2+} do citosol para o retículo sarcoplasmático. Em roedores, o efeito lusitrópico parece estar mais associado com os receptores adrenérgicos β_1 , uma vez que a estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos não resulta na aceleração do relaxamento. Isso pode ser resultado do duplo acoplamento dos receptores adrenérgicos β_2 às proteínas G_s e G_i , sendo que a fosforilação da fosfolamba nesses animais só é observada após a ativação do receptor adrenérgico β_1 , e não do β_2 . (Gerhardstein et al, 1999; Kumman et al, 1989, 1996; Xiao et al, 1994). Considerando o exposto acima, avaliamos a participação dos receptores adrenérgicos α_1 e β nas respostas induzidas pela FC no coração isolado. O propranolol e prazosin na dose de $10\mu\text{M}$ atenuaram o aumento da pressão ventricular esquerda máxima, da $+dP/dt$ e da $-dP/dT$ induzidas pela FC, o que confirma o envolvimento destes receptores nestas respostas. Na resposta cronotrópica positiva induzida pela PB e pela FC, somente observamos a participação dos receptores β -adrenérgicos, utilizando-se o propranolol na solução de perfusão.

Doses maiores dos antagonistas foram testadas, mas não alteraram o índice de redução das respostas.

No presente trabalho, além do efeito inotrópico positivo, lusitrópico positivo e cronotrópico, também observamos um aumento da pressão de perfusão coronariana gerado pela peçonha bruta e pela FC. É possível, no entanto, que parte desse efeito seja consequência do efeito inotrópico positivo gerado no ventrículo esquerdo, pois foi utilizado para o ensaio “o coração inteiro”, o que difere dos trabalhos já realizados. A maior parte da literatura relata a vasodilatação como a principal resposta vascular induzida por peçonhas de peixes. Em anéis de coronária de porco, o veneno do peixe-leão (*P. volitans*) causa relaxamento dependente do endotélio. Esse efeito vasodilatador é potencializado pela atropina, porém é reduzido pelo inibidor da NO-sintase (LNAME) e pela ausência de Ca^{2+} na solução nutritora (Church e Hodgson, 2002b).

O veneno do peixe-soldado (*G. marmoratus*), em anéis de coronária, também produz efeitos vasodilatadores, sendo também imprescindível a presença do endotélio vascular para tal (Church e Hodgson, 2001). Hopkins e Hodgson (1998) relatam o efeito vasodilatador do veneno desse peixe também sobre anéis de aorta de rato, o qual também é dependente da presença do endotélio, entretanto o bloqueio dos receptores muscarínicos, com atropina, não impede a vasodilatação.

O veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) e a stonustoxina também possui efeito vasodilatador dependente do endotélio em anéis de aorta de rato. Esse efeito foi abolido pela atropina e parece envolver a produção de NO e ativação de canais de potássio que causam relaxamento (Church e Hodgson, 2000; Liwe et al, 2007; Low et al, 1990; Sung et al, 2002).

Apesar da vasodilatação ser bem documentada na literatura, alguns autores, semelhante ao observado neste trabalho, descrevem uma resposta vasoconstritora para peçonhas de peixes. Investigações usando microscopia intravital revelaram que o veneno do peixe *Thalassophryne maculosa* causa alterações hemodinâmicas no músculo cremaster de camundongo incluindo contração arteriolar transiente (Sosa-Rosales et al, 2005a) e o veneno do peixe-gato árabe (*Arius thalassinus*) exerce o

mesmo efeito sobre preparações com a artéria umbilical de humano (Thulesius et al, 1983). O veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) causa constrição de anéis de coronárias de porco na ausência e presença do endotélio vascular, sendo que essa resposta é abolida pela atropina (Church e Hodgson, 2000).

Na verdade, os efeitos causados por veneno de peixes em vasos isolados variam não só com a espécie do peixe, mas também variam entre estudos com o mesmo tipo de veneno, além de variarem com o leito vascular a ser estudado (Church and Hodgson, 2002a).

O efeito vasoconstritor, induzido pela FC e pela peçonha bruta de *S. plumieri* foi atenuado pelos antagonistas dos receptores adrenérgicos. Acredita-se que os receptores α_2 são encontrados em maior número pré-sinápticamente enquanto que os receptores α_1 -adrenérgicos estão distribuídos relativamente de forma igual por toda a circulação coronariana (Cillan, 1991). Sabe-se, que nas artérias coronárias a vasoconstrição é mediada, principalmente pela ativação dos receptores adrenérgicos α_1 e que os receptores β ocasionam vasorelaxamento por aumentarem os níveis de AMPc. Portanto, é provável que a redução da resposta vasoconstritora, induzida pela peçonha bruta e FC, pelo propranolol, seja resultante da concomitante redução da resposta inotrópica ventricular, uma vez que, como já mencionado, trabalhamos com todo o coração isolado.

Tendo em vista a participação do endotélio vascular nas respostas vasoconstritoras, e que o endotélio é capaz de regular o tônus vascular através da liberação de agentes vasodilatadores e vasoconstritores (Brenner et al, 1989; Vane et al, 1990; Vanhoutte, 1989) nós investigamos o efeito do endotélio na resposta à FC. A remoção endotelial reduziu em aproximadamente 42% a resposta vasoconstritora, sugerindo que a vasoconstrição em questão é parcialmente dependente do endotélio. Entretanto, a ausência do endotélio não alterou a resposta inotrópica e a lusitrópica geradas pela FC.

Substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio incluem o NO, a PGI₂ e EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio). O NO é gerado nas células endoteliais por ação da óxido nítrico sintase (NOS), que promove a oxidação de nitrogênio guanidínico da L-arginina, formando NO e citrulina (Murad, 1999). O NO formado se difunde para o músculo liso vascular e estimula a formação do 3'5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) pela ativação da guanilato ciclase solúvel (Rapoport e Murad, 1983). O GMPc ativa proteína quinase GMPc - dependente (PKG), a qual reduz o influxo de Ca²⁺ e sua liberação dos depósitos intracelulares ocasionando o relaxamento muscular (Murad, 1999).

A PGI₂, produto da ciclooxygenase (COX) é derivada do ácido araquidônico, e além de ser um potente inibidor da agregação plaquetária, promove relaxamento vascular por aumentar os níveis de AMPc no músculo liso. O AMPc, além de inibir a quinase miosínica, também ativa a PKA que, por sua vez, leva à hiperpolarização das células musculares lisa e conseqüente relaxamento.

Já o EDHF segundo Campbell e Harder (2001), é uma substância capaz de promover o relaxamento vascular dependente do endotélio, mas independente da COX e da NOS e bloqueado por antagonistas de canais de K⁺. Ou seja, a ação hiperpolarizante do EDHF exclui a ação do NO e do PGI₂.

Logo após a descoberta dos fatores relaxantes, a participação do endotélio em respostas vasoconstritoras também foi observada (Simonson e Dunn, 1990; Yanagisawa et al, 1989). Fatores vasoconstritores derivados do endotélio incluem a endotelina e fatores produzidos pela via das ciclooxygenase (Tramboxano A2, postagalinina H2 e ânios superóxidos). Portanto, uma variedade de respostas vasoconstritoras dependentes do endotélio pode ser bloqueada pelos inibidores da ciclooxygenase (Lüscher, 1990; Lüscher et al, 1992).

Estudos preliminares com a adição de indometacina na solução de perfusão não alterou o efeito vasoconstritor incitado pela FC (dados não mostrados), o que

sugere que esta resposta é independente de produtos do metabolismo do ácido araquidônico liberados pelo endotélio.

Algumas situações de vasoconstrição dependentes do endotélio não envolvem a participação dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico. A produção de endotelina, por exemplo, é estimulada pela trombina, epinefrina, angiotensina II e não envolve a ciclooxigenase (Yanagisawa et al, 1988; Yanagisawa, e Masaki, 1989). Entretanto, respostas vasoconstritoras mediadas pela endotelina são sustentadas e lentas (Vanhoutte et al, 1989) diferente da resposta induzida pela FC de *S. plumieri*, a qual foi rápida e transiente.

Dessa forma, podemos sugerir que a resposta vasoconstritora observada é parcialmente dependente de endotélio, por bloqueio de sua atividade vasodilatadora, e/ou por liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio, e que não estejam envolvidos no metabolismo do ciclo do ácido araquidônico.

Parte do efeito vasoconstritor, do inotrópico, do lusitrópico e do cronotrópico da peçonha de *S. plumieri*, pode ter sido gerada através de outras vias sem envolvimento do sistema adrenérgico ou do endotélio, avaliados neste trabalho, como por exemplo, modificando diretamente a cinética do Ca^{2+} .

A capacidade do veneno do peixe *G. marmoratus*, do *S. trachynis* e do *P. volitans* de aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} independente da atuação sobre receptores muscarínicos e adrenérgicos já foi demonstrada. Essa capacidade parece ser mediada pelo aumento do influxo de Ca^{2+} através da formação de poros permeáveis ao íon na membrana celular (Church et al, 2003,). As toxinas letais SNTX e TLY purificadas de peixes-pedra formam poros na membrana celular (Chen et al, 1997; Meunier et al, 2000; Ouanounou et al., 2002). A formação de poros permeáveis ao Ca^{2+} pela traquinilisina é importante na indução da secreção de catecolaminas pelas células cromafins, uma vez que esse efeito parece não envolver os canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo L, N, P, Q) (Meunier et al, 2000).

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o veneno bruto do peixe escorpião *S. plumieri* produz efeito vasoconstritor no leito coronariano, bem como efeito lusitrópico e inotrópico positivo em corações isolados de ratos. Adicionalmente nós purificamos parcialmente uma fração da peçonha que reproduz esses efeitos, os quais foram parcialmente mediados por ativação dos receptores adrenérgicos. Investigações futuras serão realizadas para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesses efeitos.

Este trabalho contribuiu para a caracterização bioquímica e farmacológica da peçonha do peixe escorpião *S. plumieri* e deixa alternativas a serem exploradas: continuidade do processo de purificação da proteína com atividade cardiovascular, ampliação de ensaios cardíacos e vasculares utilizando outras preparações (como o músculo papilar isolado e anéis de aorta) e avaliação dos efeitos sobre correntes iônicas em miócitos cardíacos e vasculares.

6 – REFERENCIAS

Auddy B, Alam MI., Gomes A (1994). Pharmacological actions of the venom of the Indian catfish (*Plotosus canius* Hamilton). *Indian J Med Res.* 99: 47-51.

Auddy B, Muhuri DC, Alam MI, Gomes A (1995). A lethal protein toxin (toxin-PC) from the Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. *Nat Toxins.* 3(5): 363-368.

Auddy B, Gomes A (1996). Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. Occurrence of lethal protein toxin (toxin-PC). *Adv Exp Med Biol.* 391: 225-229.

Abe T, Sumatora M, Hashimoto T, Yoshihara J, Shimamura Y, Fukami J (1996). Purification and properties of a cardioactive toxin, cardioleputin, from stonefish, *Synanceja verrucosa*. *J. Venom. Anim. Toxins* 2: 135-141.

Austin L, Cairncross KD, McCallum IAN (1961). Some pharmacological actions of the venom of the *Synanceja horrida*. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 131: 339–347.

Boletini-Santos D, Komegae EN, Figueiredo SG, Haddad JrV, Lopes-Ferreira M, Lima C (2008). Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. *Toxicon* 51: 585–596.

Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ (1989). Endothelium-dependent vascular responses, mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84: 1373-1378.

Breton P, Delamanche I, Buée J, Goudey-Perrière F, Perrière C (2002). Evidence for a neurotoxic activity in crude venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*). *J Nat Toxins.* 11(4): 305-313.

Buckup PA, Menezes N.A (eds.), (2003). *Catálogo dos Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil.* 2.ed. URL: <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/>

Campbell WB, Harder DR (2001). EDHF-what is it? *American Journal of Physiology* 280: h2413-h2416.

Carrijo LC, Andrich F, Lima ME, Cordeiro MN, Richardsonc M, Figueiredo SG (2005). Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon* 45, 843–850.

Carlson RW, Schaeffer Jr, RC, La Grance RG, Roberts CM, Russel FE, (1971). Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata* — I. *Toxicon* 9: 379–391.

Carlson RW, Schaeffer Jr, RC, Whigham H, Weil MH, Russel FE (1973). Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*—II. *Toxicon* 11: 167–180.

Carvalho-Filho A (1999). *Peixes: Costa Brasileira (Fishes: Brazilian Coast)*. Melro, São Paulo pp. 92–94.

Cassoli JV (2008). *Purificação e caracterização bioquímica parcial de hialuronidase presente na peçonha do peixe-escorpião Scorpaena plumieri*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UFMG, Brasil.

Chhatwal I, Dreyer F (1992). Isolation and characterization of a dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Thachinus draco*. *Toxicon* 30: 87-93.

Choromansky JM, Murray TF, Weber LJ (1984). Responses of the isolated buffalo sculpin heart to stabilize venom of the lionfish (*Pterois volitans*). *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 27: 229–232.

Church JE, Hodgson WC (2000a). Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon* 38: 391-407.

Church JE, Hodgson WC (2000b). Evidence for the presence of a cholinomimetic in the venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Proc. Aust. Soc. Clin. Exp. Pharmacol. Toxicol.* 7: 90-97.

Church JE, Hodgson WC (2000c). Similarities in the pharmacological activity of venoms from Australian fish. *Proc. Aust. Soc. Clin. Exp. Pharmacol. Toxicol.* 8, 15.

Church JE, Hodgson WC (2001). Stonefish (*Synanceia* spp.) antivenom neutralises the in vitro and in vivo cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. *Toxicon* 39: 319-324.

Church JE, Hodgson, WC (2002a). The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon* 40: 1083–1093.

Church JE, Hodgson WC (2002b). Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon* 40: 787–796.

Church JE, Moldrich RX, Beart PM, Hodgson WC (2003). Modulation of intracellular Ca²⁺ levels by Scorpaenidae venoms. *Toxicon* 41: 679-689.

Cillan WM (1991). Functional distribution of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the coronary microcirculation. *Circulation* 84: 2108-2122.

Clements-Jewery H, Hearse D, Curtis MJ (2002). Independent contribution of catecholamines to arrhythmogenesis during evolving infarction in the isolated rat heart. *British journal of pharmacology* 135: 807-815.

Cohen AS, Olek AJ (1989). An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. *Toxicon* 27: 1367–1376.

Colasante P, Meunier FA, Kreger AS, Molgo J., 1996. 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 (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2149–2156.

Conceição K, Konno K, Melo RL., Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lima C, Richardson M, Pimenta DC, Lopes-Ferreira M (2006). Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Peptides.* 27(12): 3039-3046.

Datta A, Gomes A, Sarangi, B, Kar, PK., Lahiri, SC (1982). Pharmacodynamic actions of crude venom of the Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. *Indian J. Med. Res.* 76: 892–89.

Fahim FA, Mady EA, Ahmed SM, Zaki MA (1996). Biochemical studies on the effect of *Plotosus lineatus* crude venom (in vivo) and its effect on EAC-cells (in vitro). *Adv Exp Med Biol.* 391: 343-55.

Figueiredo JL., Menezes NA., (1980). *Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil (Handbook of Marine Fishes of Southeast of Brazil)*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo pp. 14–18.

Garnier P, Goudey-Perrière F., Breton P., Dewulf C., Petek F, Perrère C (1995). Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1981) venom and purification of a lethal, hypotensive end cytolytic factor. *Toxicon* 33: 143–155.

Garnier P, Garnier, P, Grosclaude JM.; Goudey-Perriere F, Gervat V, Gayral, P., Jacquot C, Perriere, C (1996). Presence of norepinephrine and other Biogenic amines in stonefish venom. *J. Chromat. B: Biomed. Appl* 685: 364-369.

Garnier P, Ducancel F, Ogawa T, Boulain JC, Goudey-Perrière F, Perrière C., Ménez A (1997). 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.* 1337: 1-5.

Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta-2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38: 10361-10370.

Ghadessy FJ., Chen D., Kini RM., Chung MC., Jeyaseelan K, Khoo HE., Yuen R (1996). Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. *J Biol Chem.* 11: 25575-81.

Gwee, MCE, Gopalakrishnakone P, Yuen R, Khoo, HE, Low KS (1994). A review of stonefish venoms and toxins. *Pharmacology and Therapeutics* 64 (3), 509-528.

Haddad Jr.V (2000). Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento. São Paulo, Roca.

Haddad JrV, Martins IA., Makyama HM (2003). Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 42: 79–83.

Haddad JrV., Garrone ND, de Paula Neto JB, Marques FPL, Barbaro KC (2004). Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon* 43: 287–294.

Hahn ST., O'Connor JM (2000). An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. *Toxicon* 38: 79-89.

Halstead BW (1951). Injurious effects from the sting of the scorpionfish *Scorpaena guttata* with report of a case. *Califórnia Med.* 74: 395–396.

Halstead BW (1966). Venomous marine animals of Brazil. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, p. 1-26, 1966.

Hopkins BJ, Hodgson WC, Sutherland SK, (1994). Pharmacological studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon* 32: 1197–1210.

Hopkins BJ, Hodgson WC, Sutherland SK (1996). Evidence for adrenergic and tachykinin activity in venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Toxicon* 34: 541-54.

Hopkins BJ, Hodgson WC, Sutherland SK, (1997). An in vitro pharmacological examination of venom from the soldierfish *Gymnapistes marmoratus*. *Toxicon* 35: 1101-1111.

Hopkins BJ, Hodgson WC, (1998). Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). *Toxicon.* 36(7): 973-83.

Junqueira ME, Grund LZ., Orii NM, Saraiva TC., de Magalhães Lopes CA, Lima, C, Lopes-Ferreira M (2007). Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon*. 49(7): 909-919.

Karmakar S, Muhuri DC, Dasgupta SC, Nagchaudhuri AK, Gomes A, (2004). Isolation of a haemorrhagic protein toxin (SA-HT) from the Indian venomous butterflyfish (*Scatophagus argus*, Linn) sting extract *Indian J Exp Biol*. 42(5): 452-460.

Khoo HE, Yuen R, Poh CH., Tan CH (1992). Biological activities of *Synanceja horrida* (stonefish) venom. *Nat Toxins*.1: 54-60.

Kizer KW, McKinney HE, Auerbach PS (1985). Scorpaenidae envenomation: a five-year Poison Center experience. *JAMA* 253 (6), 807–810.

Kreger AS (1991). The detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Toxicon* 29: 733–743.

Kreger AS, Molgo J, Comella JX, Hansson B, Thesleff S (1993). Effects of stonefish (*Synanceia trachynis*) venom on murine and frog neuromuscular junctions. *Toxicon* 31: 307–317.

Kurosawa S, Kanaya N, Niiyama Y, Nakayama M, Fujita S, Namiki A (2003). Landiolol, esmolol and propranolol protect from ischemia/reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Canadian Journal of Anesthesia* 50:489-494.

Liew HC, Khoo HE., Moore PK., Bhatia M, Lu J, Moochhala SM (2007). Synergism between hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) in vasorelaxation induced by stonustoxin (SNTX), a lethal and hypotensive protein factor isolated from stonefish *Synanceja horrida* venom. *Life Sciences* 80, 1664–1668.

Lopes-Ferreira M, Emim JA, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araújo Mda S, Juliano L, Lapa AJ, Souccar C, Moura-da-Silva AM (2004). Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol*, 11: 2151-2157.

Lopes-Ferreira M, Barbaro KC, Cardoso DF, Moura-da-Silva AM, Mota I (1998). *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*. 36 (2): 405-410.

Lopes-Ferreira M, Moura-da-Silva AM, Piran-Soares, AA., Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM., Farsky SHP (2002). Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon* 40: 1141–1147.

Low KS, Gwee MC, Yuen R (1990). Neuromuscular effects of the venom of the stonefish *Synanceja horrida*. *Eur. J. Pharmacol.* 183: 574-580.

Low KS, Gwee MC, Yuen R, Gopalakrishnakone P, Khoo, HE (1993). Stonustoxin: a highly potent endothelium-dependent vasorelaxant in the rat. *Toxicon* 31(11): 1471-1478.

Low KS, Gwee MC, Yuen R., Gopalakrishnakone P, Khoo HE, 1994. Stonustoxin: effects on neuromuscular function in vitro and in vivo. *Toxicon* 32: 573-81.

Lowry OH, Rosenbrough NI, Faar AL, Randall RJ, (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.

Lüscher TF (1990). The endothelium: Target and promoter of hypertension?

Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi H., Yang ZH, (1992). Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19: 117-130.

Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lopes-Ferreira M, (2006). Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon.* 47(5): 575-583.

Magalhães GS, Junqueira-de-Azevedo ILM, Lopes-Ferreira M, Loernzini DM, Ho, PL, Moura-da-Silva AM, 2006. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie* 88: 693-699.

Meunier, F. A., Mattei, C., Chameau, P., Lawrence, G., Colasante, C., Kreger, A. S., Dolly, J. O., Molgó, J., 2000. Trachynilysin mediates SNARE-dependent release of catecholamines from chromaffin cells via external and stored Ca²⁺. *Journal of Cell Science* 113, 1119-1125.

Moyle PB, Cech Jr.J (1996). *Fishes: an introduction to ichthyology*, third ed. Prentice-Hall, USA pp. 308–309.

Muhuri D, Karmakar S, Dasgupta SC., Nagchaudhuri AK, Gomes A (2004). Pharmacological studies on the venomous spotted butterflyfish (*Scatophagus argus* Linn) sting extract on experimental animals. *Indian J Exp Biol* 42: 461-467.

Murad F (1999). Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1317-1327.

Nair MSR, Cheung P, Leong I, Ruggieri GD (1985). A nonproteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). *Toxicon* 23: 525–527.

Nelson, JS (1984). *Fishes of the World*. Wiley, New York.

Obata T, Yasumitsu Y (1999). Prazosin attenuates hydroxyl radical generation in the rat myocardium. *European Journal of Pharmacology* 379: 161-166.

Ohsaka A, (1979). New York: Springer-Verlag. 52: 480-489.

O'Connor, J.M., Hahn, S.T., 2004. From venom to pain research: a novel use of a scorpaeidae venom. *Biol Res Nurs*. 6(2), 100-109.

Ouanounou G, Malo M, Stinnakre J, Kreger AS, Molgo J (2002). Trachynilysin, a neurosecretory protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, forms nonselective pores in the membrane of NG108-15 cells. *J Biol Chem*. (42):39119-27.

Pareja-Santos A, Oliveira Souza VM, Bruni FM, Sosa-Rosales JI, Lopes-Ferreira M, Lima C (2008). Delayed polymorphonuclear leukocyte infiltration is an important component of *Thalassophryne maculosa* venom pathogenesis *Toxicon*. 52(1): 106-114.

Perriere, C., Goudey-Perriere, F., Petek, F. (1988). Purification of a lethal fraction from the venom of the weever fish *Trachinus vipera* C. V. *Toxicon*. 26, 1222-1227.

Poh CH, Yuen R, Khoo HE, Chung MCD, Gwee MCE, Gopalakrishnakone P, 1991. Purification and partial characterization of Stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 793–798.

Pucéat M, Terzic A, Clément O, Scamps F, Vogel SM, Vassort G (1992). Cardiac alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropy via myofibrillar sensitization. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 263-265.

Rapoport, R.M., Murad, F (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxio in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circulation Research* 52, 352-357.

Roche, ET, Halsteat BW (1972). *Fish Bulletin of the Department of Fish and Game of State of California*, vol. 156 1972 pp. 1–49.

Rodrigues RJ (1972). Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*). *Trans N Y Acad Sci* 34: 677-86.

Russell, FE, Emery JA., (1960). Venom of the weevers *Trachinus draco* and *Trachinus vipera*. *Ann. NY Acad. Sci.* 90, 805–819.

Russel FE (1965). Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. In: Russel, F.S. (Ed.), *Advances in Marine*.

Russell, FE (1971). Venom poisoning. *Ration. Drug Ther.* 5: 1–7.

Saunders PR (1959). Venom of the stonefish *Synanceja horrida* (Linnaeus). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 123: 195–205.

Saunders PR, Rothman S, Medrano VA, Chin P (1962). Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanceja horrida*. *Am. J. Physiol.* 203: 429–432.

Satoh F, Nakagawa H, Yamada H, Nagasaka K, Nagasaka T, Araki Y, Tomihara Y, Nozaki M, Sakuraba H, Ohshima T, Hatakeyama T, Aoyagi H (2002). Fishing for bioactive substances from scorpionfish and some sea urchins. *J Nat Toxins.* 11(4): 297-304.

Sauviat MP, Garnier JP, Goudey-Perriere F, Perriere C, (1995). Does crude venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) activate β -adrenoceptors in the frog heart muscle? *Toxicon* 33: 1207-1213.

Schaeffer Jr, RC., Carlson RW, Russel FE (1971). Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon* 9: 69-78.

Smith WL (2003). *Scorpaeniformes II: Scorpionfishes and relatives*. Grimek's Animal Life Encyclopedia: Fishes. Thoney, D., Loiselle, P., Schlager, N. (Ed). Farmington Hills, The Gale Group 2: 13-178.

Smith WL, Wheeler WC (2006). Venom evolution widespread in fishes: A phylogenetic road map for Bioprospecting of Piscine

Simonson MS, Dunn MJ (1990). Endothelin: biological actions and mechanisms of signal transduction. *ACE Report* 64: 1-8.

Soprani J (2008). Avaliação do efeito anti-tumoral de um polipeptídeo isolado de peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* e avaliação do seu potencial uso diagnóstico de tumores, Dissertação de Mestrado. Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, CDNT, Brasil.

Sosa-Rosales JI, D'suze G, Salazar V, Fox J, Sevcik C (2005b). Purification of a myotoxin from the toadfish *Thalassophryne maculosa* (Gunter) venom. *Toxicon* 45(2): 147-153.

Sosa-Rosales JI, Piran-Soares AA, Farsky SH, Takehara HA, Lima C., Lopes-Ferreira M (2005). Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*. 45(2): 155-161.

Sri Balasubashini M, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Viswanathan V, Raveendran P, Menon VP (2006a). Fish venom (*Pterios volitans*) peptide reduces tumor burden and ameliorates oxidative stress in Ehrlich's ascites carcinoma xenografted mice. *Bioorg Med Chem Lett*. 16(24): 6219-6225.

Sri Balasubashini M, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Rukkumani R, Menon VP (2006b). FV peptide induces apoptosis in HEP 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *J Carcinog*. 5:27-33.

Sutherland S (1983). Australian Animal toxins. Oxford University Press

Terzic A, Pucéat M, Clément O, Scamps F, Vassort G (1992). Alpha 1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol.* 447, 275-292.

Thulesius O, Al-Hassan JM, Criddle RS, Thomson M (1983). Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). *Gen Pharmacol.* 14(1): 129-132.

Ueda A, Suzuki M, Honma T, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K (2006). Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Biochimica et biophysica acta.* 1760(11): 1713-1722.

Vane RJ, Anggard EE, Botting RM, (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27-36.

Vanhoutte PM (1989). Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13, 658-666.

Vanhoutte PM, Auch-Schweik W, Boulange, r C, Janssen PA, Katusic ZS, Komori K, Miller VM, Schini VB, Vidal M (1989). Does endothelin-1 mediate endothelium-dependent contractions during anoxia? *Cardiovasc Pharmacol* ;13, 124-128

Wang J, Yazawa K, Hao L., Onoue Y, Kameyama, M (2007). Verrucotoxin inhibits K_{ATP} channels in cardiac myocytes through a muscarinic M_3 receptor-PKC pathway. *European Journal of Pharmacology* 563: 172-179.

Weiner S (1959). Observations on the venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Med. J. Aust.* 1: 620–627.

Weisel-Eicher A, Libersat F, (2004). Venom effects on monoaminergic systems. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190: 683-690.

Xiao R-P, Hohl C, Altschuld R (1994) β_2 -Adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca^{2+} dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 269: 19 151–156.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T, (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 31 332 (6163), 411-415.

Yanagisawa M, Masaki T (1989). Biochemistry and molecular biology of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10: 374-378.