

**Caracterização da Resposta Inflamatória
Local Induzida Pela Peçonha do Peixe-
escorpião *Scorpaena plumieri***

Thiago Nunes de Menezes

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, abril de 2011

**Caracterização da Resposta Inflamatória Local
Induzida Pela Peçonha do Peixe-escorpião *Scorpaena
plumieri***

Thiago Nunes de Menezes

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 25/04/2011 por:

Prof.^a Dr.^a Suely Gomes de Figueiredo – Orientadora, UFES

Dr. Filipe Andrich – Co-orientador, UFES

Prof.^a Dr.^a Maria Elena de Lima Perez Garcia, UFMG

Prof.^a Dr.^a Nazaré Souza Bissoli, UFES

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg - Coordenador do PPGCF, UFES

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, com apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox)
- Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC).

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada à minha sobrinha, Isabela.

“Se quiser ter algo que nunca teve, faça algo que nunca fez.”

(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Quero e preciso agradecer muito a Deus em primeiro lugar, por todas as oportunidades quem surgiram em minha vida.

A minha família. Meus Pais José e Geruza e meus irmãos Gabriela e André, por sonharem juntos comigo, dividindo as tristezas e multiplicando as alegrias.

A Isabela, forma única de vida, que mesmo sem perceber ainda, faz todos a sua volta se sentirem importantes.

Ao Serge, integrante da família, pelos momentos divertidos em nossas pescarias de fim de semana (quando dava), e até mesmo nas mudanças feitas com um Fiat Uno!

Eterna gratidão tenho a Prof.^a Suely. Pessoa muito especial que mesmo sem me conhecer, deu-me um voto de confiança e me ensinou muito mais que ciência.

Aos meus amigos e irmãos científicos do Laboratório de Química de Proteínas, Filipe Andrich, Helena L. Gomes, Leonardo P. Ribeiro, Pedro H. Lemos, Juliana B. C. Trindade, Olavo Dobrovosky, Fernanda Gutierrez e Vinícius Kiffer, pela convivência agradável e inúmeros momentos de alegria. Cada um tem sua importância.

Aos meus primos Felipe Caus e Danilo Mariani, irmãos pra mim. A Felipe C. Silva, amigo/primo/irmão.

A Andressa. Muitas experiências divididas, opiniões sinceras e parceria incondicional. Ah, obrigado também pelo sumário e pelas correções do inglês!

Ao Mário, a base do LQP! Pessoa solícita e companheira que coletou os peixes-escorpião para a realização deste e vários outros trabalhos do nosso laboratório. Você e sua família sintam-se abraçados.

Aos professores e servidores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela ajuda e prontidão sempre que necessário.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos momentos juntos ao longo das disciplinas e nos momentos de descontração. Em especial a Leandro Ceotto e Marcella Porto.

A Prof.^a Nazaré S. Bissoli pela gentil compra do Kit CBA.

A Prof.^a Elenice M. Lemos e colegas do Centro de Pesquisa Renè Rachou (FIOCRUZ – MG) pelas dosagens das citocinas.

Ao Prof. Fausto Edmundo pelas análises histopatológicas.

Aos colegas da Pós-Graduação em Engenharia Ambiental pelo companheirismo durante análises no HPLC.

As famílias Castelo e Vicente pelas orações e a família Alves pelo apoio inicial.

A todos meus amigos que fazem parte da minha vida e que, mesmo sem contato freqüente, sempre trocamos abraços calorosos nos reencontros.

A todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Tenham certeza que sou grato e espero que gostem do resultado final.

RESUMO

O envenenamento em humanos causado por acidentes com o peixe *Scorpaena plumieri* produz dor intensa e imediata, e edema local. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar experimentalmente a resposta inflamatória local aguda induzida pela peçonha de *S. plumieri* (SpV). Utilizando o teste da pata de camundongo, foi demonstrado que SpV (7,5 – 100 µg de proteína) induz intenso edema e nocicepção local e tanto a intensidade quanto a persistência do edema são dose dependente. O tratamento prévio dos animais com inibidor de serino-proteases (aprotinina) ou com antagonista do receptor B₂ de bradicinina (HOE-140) reduziram significativamente a resposta edematogênica, demonstrando o direto envolvimento do sistema calicreína-cinina. Entretanto, o pré-tratamento com outros antiinflamatórios (anti-histamínico e inibidor da COX-2) tiveram menor efeito sobre esta resposta. Dosagens dos níveis de mediadores pró-inflamatórios por citometria de fluxo no sobrenadante de extratos das patas, 2h após a injeção de SpV (15 µg de proteína), revelaram níveis elevados das citocinas TNF e IL-6 e da quimiocina MCP-1. Os níveis elevados desses mediadores podem ser associados com as alterações histopatológicas observadas no tecido injuriado, caracterizadas por infiltrado celular com predominância de neutrófilos (6h) e células mononucleadas (12h após a injeção), além de edema intenso da derme. Dessa forma pode-se sugerir que as cininas, juntamente com as citocinas, podem regular a migração e o acúmulo de leucócitos no tecido inflamado. Uma fração protéica pró-inflamatória foi purificada da peçonha bruta por cromatografia de filtração molecular e troca aniônica; essa fração reproduziu a resposta edematogênica de SpV. Neste trabalho também foi demonstrado que o soro desenvolvido contra a peçonha de peixe pedra (SFAV) é capaz em neutralizar *in vivo* as atividades nociceptiva e edematogênica da peçonha de *S. plumieri*. Análises por *Western Immunoblotting* confirmaram a reatividade cruzada, pois proteínas de SpV com massa molecular na faixa de ~98 kDa foram reconhecidas por SFAV. Estes resultados sugerem que o componente responsável pelos efeitos inflamatórios de SpV possui semelhanças antigênicas com toxina(s) encontrada(s) em peçonhas de peixes-pedra. Em síntese, este trabalho contribuiu para a caracterização da resposta inflamatória eliciada pela peçonha de *S. plumieri*, e também demonstrou que a peçonha de peixes-pedra do Indo-Pacífico e do peixe-escorpião preto do Oceano Atlântico possuem proteínas com características estruturais similares.

ABSTRACT

Envenomation with *Scorpaena plumieri* fish venom causes immediate, local, and intense pain, and tissue edema in humans. The aim of the present study was to characterize experimentally the local acute inflammatory response induced by *S. plumieri* venom (SpV). Mouse paw edema bioassays have showed that SpV (7.5 - 100 µg of protein) induce intense local edema and nociception. The edema intensity and its persistence were dose-dependent. It was also demonstrated that previous administration of serine-protease inhibitor (aprotinin) or bradykinin B₂ receptor antagonist (HOE-140) significantly reduces the edematogenic response to venom. These results demonstrate a direct involvement of the Kallikrein-Kinin System in the edema formation. However, the pre-treatment with other anti-inflammatory drugs (antihistamine and inhibitor of COX-2) had less effect on this response. Elevated levels of proinflammatory mediators (cytokines TNF and IL-6 and the chemokine MCP-1) were detected in supernatants of paw tissue extracts by flow cytometric analyses 2h after SpV (15 µg of protein) injection. This proinflammatory mediators release could be associated with histopathological changes observed into paw tissue, characterized by cellular infiltration, mainly neutrophils (6h) followed later by mononuclear cell recruitment (12h after injection). It was also observed edema at strong dermis of the tissue injected. Thus, kinins, in concert with cytokines, may regulate leucocytes interstitial accumulation and trafficking to the inflammatory site. Partial purification of a proteic proinflammatory fraction, which reproduced the edematogenic response induced by crude venom, was achieved by gel filtration and anion exchange chromatographies. In addition also was demonstrated that stonefish antivenom (SFAV) is able to neutralize *in vivo* nociceptive and edematogenic activities of the venom of *S. plumieri*. Western immunoblotting analysis confirmed the cross reactivity, since SpV proteins with MW in the range of ~ 98 kDa were recognized by SFAV. These experiments suggest that the SpV compound responsible for the inflammatory effects possesses similar antigenic properties to those found in stonefish venom. In conclusion, this work described for the first time the pattern of local inflammatory reaction elicited by *S. plumieri* venom. It was also reported structural similarities between venom proteins from Indo-Pacific (stonefish) and Atlantic Ocean fish (scorpionfish).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 A pesquisa sobre peçonhas de animais	23
1.2 Peixes Peçonhentos	25
1.3 Caracterização das peçonhas de peixes	27
1.3.1 Atividade hemolítica.....	29
1.3.2 Atividade cardiovascular.....	29
1.3.3 Atividade inflamatória.....	30
1.4 O Peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	33
1.5 Terapia dos envenenamentos	36
1.6 O processo inflamatório	37
1.6.1 Nocicepção.....	37
1.6.2 Migração celular.....	38
1.6.3 O sistema calicreína-cinina.....	39
1.6.4 Citocinas.....	41
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3. MATERIAIS	44
3.1 Reagentes	44
4. MÉTODOS	45

4.1	Coleta dos Peixes	45
4.2	Obtenção da Peçonha	45
4.3	Dosagem da Concentração Protéica	45
4.4	Atividades Biológicas	47
4.4.1	Atividade Edematogênica.....	47
4.4.2	Atividade Nociceptiva	47
4.4.3	Avaliação da estabilidade das atividades biológicas.....	49
4.4.4	Estudo da via de formação do edema.....	49
4.4.5	Análise histopatológica.....	50
4.4.6	Níveis de citocinas pró-inflamatórias eliciadas pela peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	50
4.5	Purificação da fração protéica responsável pela atividade edematogênica	54
4.5.1	Primeira Etapa - Fracionamento da peçonha de <i>S. plumieri</i> por cromatografia de filtração em gel convencional.....	54
4.5.2	Segunda Etapa - Cromatografia de troca aniônica em sistema de alta resolução.....	54
4.6	Eletroforese em gel de tricina – SDS-poliacrilamida	55
4.7	Eletroforese Bidimensional	55
4.7.1	Primeira Dimensão – Focalização isoelétrica (FIE).....	55
4.7.2	Segunda Dimensão – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
4.8	Reatividade Cruzada do SpV com o Stonefish Antivenom (SFAV)	57
4.8.1	Ensaio <i>in vivo</i>	57
4.8.2	Ensaio <i>in vitro</i> - Western Immunoblotting.....	57
4.9	Análise Estatística dos Dados	58

5. RESULTADOS	59
5.1 Atividades Biológicas	59
5.1.1 Atividade edematogênica.....	59
5.1.2 Atividade Nociceptiva.....	59
5.1.3 Avaliação da estabilidade das atividades biológicas	62
5.1.4 Estudo da via de formação do edema.....	62
5.1.5 Análise histopatológica	65
5.1.6 Níveis de citocinas pró-inflamatórias eliciadas pela peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	73
5.2 Purificação da fração protéica responsável pela atividade edematogênica	73
5.2.1 Primeira Etapa - Fracionamento da peçonha de <i>S. plumieri</i> por cromatografia de filtração em gel convencional.....	73
5.2.2 Segunda etapa - Cromatografia de troca iônica em sistema de alta resolução.....	78
5.2.3 Análise da homogeneidade e estimativa da massa molecular.....	78
5.3 Neutralização das atividades edematogênica e nociceptiva induzida pela peçonha de <i>S. plumieri</i> pelo soro contra a peçonha do peixe-pedra (<i>Stonefish antivenom</i> - SFAV).....	78
5.3.1 Ensaio <i>in vivo</i>	78
5.3.2 Ensaio <i>in vitro</i>	82
6. DISCUSSÃO	84
6.1 Estudo da atividade edematogênica e nociceptiva da peçonha de <i>S. plumieri</i>.....	84
6.2 Avaliação da estabilidade das atividades biológicas	87
6.3 Estudo da via de formação do edema	88

6.4	Análise histopatológica.....	92
6.5	Níveis de citocinas eliciadas pela peçonha do peixe <u>S. plumieri</u>.....	94
6.6	Purificação da fração protéica responsável pela atividade Edematogênica.....	95
6.7	Reatividade cruzada com o <i>Stonefish Antivenom</i>.....	99
7.	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
9.	ANEXOS.....	120
	Anexo I – Resumos em Congresso.....	120
	Anexo II - Artigo aceito para publicação	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécimes de peixes peçonhentos.....	26
Figura 2: Lesões causadas por acidentes com arraias do gênero <i>Potamotrygon</i>	32
Figura 3: Aparato peçonhento do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i>	35
Figura 4: Peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	46
Figura 5: Extração da peçonha.....	48
Figura 6: Plataforma de microesferas do kit CBA.....	53
Figura 7: Atividade edematogênica da peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	60
Figura 8: Atividade nociceptiva da peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	61
Figura 9: Avaliação da estabilidade das atividades biológicas da peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	63
Figura 10: Estudo da via de formação do edema induzido pela peçonha de <i>S. plumieri</i>	64
Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos.....	66
Figura 12: Níveis de citocinas no homogenato de patas de camundongos após a injeção da peçonha de <i>S. plumieri</i>	74
Figura 13: Perfil cromatográfico da filtração em gel da peçonha do peixe <i>S. plumieri</i>	77
Figura 14: Perfil da cromatografia de troca aniônica da fração edematogênica obtida na filtração.....	79

Figura 15: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha de <i>S. plumieri</i> e das frações obtidas nas etapas de purificação.....	80
Figura 16: Neutralização da atividade edematogênica e nociceptiva da peçonha de <i>S. plumieri</i> com o SFAV.....	81
Figura 17: Perfil protéico da peçonha do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i> (SpV) e reatividade cruzada com o <i>stonefish antivenom</i> (SFAV)	83
Figura 18: Edema na mão esquerda desenvolvido por indivíduo envenenado pelo peixe-escorpião <i>S. plumieri</i>	86
Figura 19: Proposta do mecanismo de ação da peçonha sobre o KKS.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da potência da atividade edematogênica de SpV e frações purificadas.....**96**

Tabela 2: Algumas propriedades de toxinas de peçonhas de peixes.....**98**

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ANOVA	Análise de variância
APRO	Aprotinina
BSA	Soro albumina bovina
BK	Bradicinina
CBA	Cytometric bead array
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato)
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DDT	Ditiotreitol
DF	Diclofenaco de sódio
DL₅₀	Dose letal mediana
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
FIE	Focalização isoelétrica

FL-2	Leitor de fluorescência 2
FL-4	Leitor de fluorescência 4
FSC	Leitura do citômetro de fluxo baseada no tamanho
GC	Grupo controle
HE	Hematoxilina-Eosina
HOE	HOE-140
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IGP	Gradiente de pH imobilizado
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase isoforma induzível
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.v.	Intravenoso
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
KKS	Sistema calicreína-cinina
MCP-1	Proteína tipo 1 quimiotática de monócitos
MM	Massa molecular
NA	Noradrenalina
neoVTX	Neoverrucotoxina

NOS	Óxido nítrico sintase
PB	Tampão fosfato de sódio
PBS	Tampão fosfato de sódio com salina
PE	Fluorocromo ficoeritrina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR	Prometazina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFAV	Anti-veneno contra peçonha de peixes-pedra
sIL-6R	Receptor solúvel para interleucina 6
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNTX	Stonustoxina
Sp-CTx	Toxina citolítica purificada peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-GP	Protease gelatinolítica purificada peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
Sp-H	Hialuronidade purificada peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
SpV	Solução da peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
SSC	Leitura do citômetro de fluxo baseada na granulidade
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina

TNF	Fator de necrose tumoral
TLY	Trachynilysina
TRVP1	Canal transiente de cátions, subfamília V, membro 1
Tx4(6-1)	Toxina inseticida isolada da peçonha da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>
VTX	Verrucotoxina

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pesquisa sobre peçonhas de animais

Os animais venenosos/peçonhentos estão amplamente difundidos nos diferentes ecossistemas compreendendo mais de cem mil espécies (Calvete *et al.*, 2009), os quais podem apresentar comportamento de ataque e defesa, que incluem a produção de substâncias repelentes, paralisantes ou com outras ações biológicas, se ajustando ao longo dos processos evolutivos a fim de obter uma maior eficiência. A peçonha pode ter papel essencial para ataque, a captura, e para a digestão do alimento, ou contribuir para a defesa do animal, podendo atuar em sistemas vitais dos predadores ou agressores (Russell, 1996; Calvete *et al.*, 2009). De uma maneira geral, as peçonhas são uma mistura complexa de múltipla composição química e amplo espectro de ação farmacológica. É comum encontrar nessas misturas enzimas, neurotransmissores, ácidos nucleicos, sais inorgânicos, monoaminas, toxinas protéicas e não protéicas, além de outros compostos orgânicos ainda não identificados, os quais podem interagir com enzimas, receptores e canais iônicos da presa (ou vítima quando se tratar de humanos), acarretando desordens no sistema nervoso central e periférico, cardiovascular, coagulação sanguínea e etc., que são responsáveis pela sintomatologia observada nos envenenamentos (Calvete *et al.*, 2009). A composição das peçonhas de animais é específica para cada espécie além de depender de outros fatores como o sexo, nutrição, habitat natural, condições climáticas entre outras. (Russell, 1996; Vassilevski, 2009).

O valor medicinal de peçonhas é bem conhecido desde a Grécia antiga e o uso da peçonha de escorpiões e serpentes é descrito pela medicina chinesa tradicional como remédios populares (Harvey *et al.*, 1998; Koh *et al.*, 2006). Embora este conhecimento popular esteja presente em várias gerações, as investigações sobre a composição das peçonhas como fonte de produtos farmacêuticos avançou apenas nas últimas décadas, após a caracterização de um peptídeo potencializador da bradicinina (BK) isolado a partir da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva, 1949), que se tornou protótipo do primeiro anti-hipertensivo comercial da classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA), o Captopril®. O exemplo mais recente da utilização de peçonhas para geração de produtos naturais é o anestésico ziconotide (Prialt®) aprovado em 2004 pelo FDA

(*Food and Drug Administration*, EUA), um fármaco bloqueador dos canais de cálcio (Ca^{2+}) tipo N desenvolvido a partir da toxina ω -*Conotoxin* M-VII-A, isolada do *Conus magus* (McIntosh *et al.*, 1982). Além disto, toxinas de peçonhas de animais tem sido utilizadas como instrumento de estudo em sistemas fisiológicos, um exemplo clássico é a *Tetradotoxin*, um potente bloqueador de canais de sódio (Na^+) isolado do peixes da família Tetradontidae (Ritchie, 1980); a ω -*Agatoxin* isolada da peçonha da aranha *Ageneiopsis aperta*, que foi importante na identificação de subtipos de canais de Ca^{2+} (Adams *et al.*, 1990; Teramoto *et al.*, 1993); e a toxina Tx4(6-1) purificada a partir da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, que apresenta atividade inseticida (Figueiredo, 1995).

Nas últimas três décadas houve um grande avanço na caracterização química e farmacológica de peçonhas de animais terrestres (cobras, aranhas e escorpiões); entretanto, ao compararmos com os estudos destas peçonhas com as de peixes, observa-se que o estudo destas está apenas se iniciando. Os desafios da pesquisa de peçonhas de peixes vão desde a dificuldade da captura dos espécimes (Khoo, 2002) até a extração da peçonha, principalmente no que diz respeito à natureza lábil de muitas delas (Schaeffer *et al.*, 1971; Carrijo *et al.*, 2005). Grande parte das toxinas bioativas destas peçonhas são proteínas termolábeis de alta massa molecular, o que dificulta sua purificação e estudo (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a). Apenas cerca de uma dúzia de proteínas foram purificadas e caracterizadas com sucesso a partir dessas peçonhas.

O que também contribuiu de forma negativa para a geração de dados sobre peçonhas de peixes é o fato dos envenenamentos por peixes apresentarem pouca relevância epidemiológica, pois o número de acidentes causados por estes animais não é significativo quando comparado com aqueles causados por animais terrestres (Church e Hodgson, 2002a). Todavia, estudos vêm sendo realizados com animais marinhos peçonhentos, não apenas para o entendimento de suas manifestações clínicas nos indivíduos acidentados, mas também para demonstrar que representam uma vasta fonte de novas toxinas e de outras substâncias naturais de interesse científico (Oliveira *et al.*, 1990; Nuijen *et al.*, 1999; Rinehart, 2000; Van-Kesteren *et al.* 2002). Portanto, as peçonhas de animais marinhos representam uma fonte ainda pouco explorada de moléculas bioativas (Church e Hodgson, 2002a).

1.2 Peixes Peçonhentos

Os peixes constituem quase metade dos animais vertebrados encontrados na Terra (Nelson, 1984), dentre os quais cerca de 22.000 espécies estão contidas em 50 ordens e 445 famílias (Russell, 1996). Smith e Wheeler (2006), realizaram um estudo filogenético e sugeriram que o número de peixes peçonhentos ultrapassam a 1200.

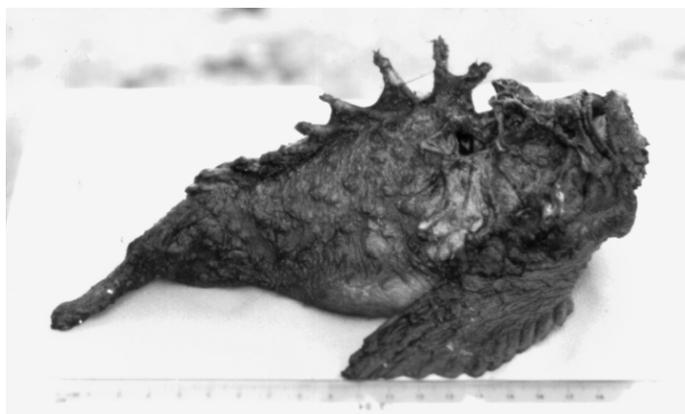
Os peixes de importância toxinológica podem ser agrupados em venenosos ou peçonhentos. Os venenosos obtêm suas toxinas incorporando venenos de plantas, algas ou outros organismos através da cadeia trófica, ou possuem vias metabólicas para produção de seus venenos. Alguns exemplos são o baiacu (*Colomesus psittacus*), a garoupa (*Epinephelus marginatus*), e a barracuda (*Sphyraena barracuda*) (Grund, 2009). Já os peixes peçonhentos apresentam glândulas ou tecidos especializados para a produção e secreção de substâncias tóxicas, além de um aparato especial para a inoculação destas (Russell, 1996), como é o caso do niquim (*Thalassophryne nattereri*, fig. 1A), o peixe-pedra Indo-Pacífico (*Synanceja trachynis*, fig. 1B) e o peixe-escorpião preto do Oceano Atlântico (*Scorpaena plumieri*, fig. 1C).

Os peixes peçonhentos utilizam sua peçonha principalmente com o propósito de defesa e proteção (Gwee *et al.*, 1994; Church e Hodgson, 2002b) e os considerados mais perigosos pertencem a família Scorpaenidae, classificados em três gêneros de acordo com a morfologia do aparato peçonhento: *Pterois* (peixes-leão), *Synanceja* (peixes-pedra) e *Scorpaena* (peixes-escorpião). O aparato peçonhento destes animais é constituído por espinhos encontrados nas nadadeiras dorsais (11-17), pélvicas (2), e anais (3) (Russell, 1965). O tecido produtor/secretor da peçonha é encontrado nas cavidades dos espinhos (Russell, 1965; Smith e Wheeler, 2006). O envenenamento em humanos, em geral, ocorre por pressão mecânica ao pisar ou tocar no animal. Os espinhos tornam-se eretos, perfuram os tecidos da vítima e a bainha tegumentária é rompida e/ou deslocada para baixo, permitindo que a peçonha penetre no ferimento (Russell, 1965; Shaeffer *et al.*, 1971; Gwee *et al.*, 1994; Haddad *et al.*, 2003).

A



B



C

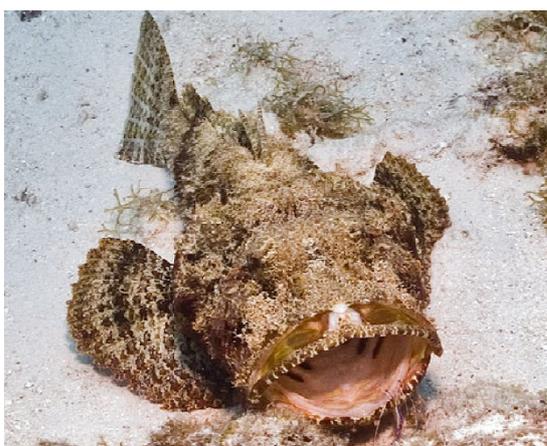


Figura 1: ESPÉCIMES DE PEIXES PEÇONHENTOS. (A) *Thalassophryne nattereri* (niquim), (B) *Synanceja trachynis* (peixe-pedra), (C) *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião). Fonte: (A) Moura, 1997, (B) Khoo, 2002, (C) Bolhas, 2009.

A maior parte dos acidentes ocorre em ambientes de águas calmas e/ou sombreadas (Haddad Jr. 2003), os quais podem se relacionar com os hábitos da grande maioria dos peixes peçonhentos, que não possuem costumes migratórios, se movem forma lenta e vivem em águas rasas em ambientes protegidos (Maretic, 1988).

Embora o número de casos de morte em humanos causado por acidentes com peixes peçonhentos seja pequeno, em grande parte dos casos, a injúria pode levar a vários graus de morbidade. As manifestações clínicas dos acidentes com peixes peçonhentos são majoritariamente locais, que incluem dor, edema, eritema e em alguns casos, necrose; entretanto, as manifestações sistêmicas como desordens cardio-respiratórias são observadas principalmente nos acidentes envolvendo peixes da família Scorpaenidae (Figueiredo *et al.*, 2009). Geralmente, o tratamento é sintomático e os efeitos locais são parcialmente revertidos por imersão do membro afetado em água quente. Às vezes é necessário o uso de infiltrações anestésicas ou mesmo de opiáceos (Haddad Jr., 2000).

O Brasil, com sua ampla faixa costeira de aproximadamente 7.400 km, apresenta uma rica diversidade de fauna marinha, com grande número de animais potencialmente perigosos. Associado a isto, nosso clima tropical propicia grande número de banhistas nas praias, o incremento da pesca comercial e esportiva, mergulho autônomo e pesca submarina, favorece a ocorrência de vários acidentes com humanos provocados por peixes peçonhentos (Mondin, 2007). Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil, todavia os que mais causam acidentes são as arraias, os bagres, o niquim e os peixes-escorpião (Haddad Jr. 2003).

1.3 Caracterização das peçonhas de peixes

Embora as peçonhas de peixes possuam características químicas e farmacológicas sensivelmente diferentes dos animais terrestres (Russell, 1996), elas compartilham entre si muitas similaridades importantes. Várias atividades farmacológicas têm sido descritas para peçonhas de peixes, dentre elas atividade hemolítica, neuromuscular, citolítica, tóxica e letal. Entretanto o efeito sistêmico mais potente destas peçonhas é

sobre o sistema cardiovascular (Gwee *et al.*, 1994; Church e Hodgson, 2002a,b) produzindo profundas alterações por atuação em receptores do sistema nervoso autônomo (Church e Hodgson, 2002b) e por liberação de fatores endoteliais (Hopkins e Hodgson, 1998). No que diz respeito aos efeitos locais em humanos, os sinais/sintomas do envenenamento são bastante semelhantes, principalmente em relação à dor, geralmente desproporcional ao tamanho da lesão (Sutherland e Tibballs, 2001).

As peçonhas de peixes são de natureza protéica, e apresentam proteínas com ampla faixa de massa molecular variando entre ~10 e 800kDa (Figueiredo *et al.*, 2009). Além dos constituintes protéicos, outros compostos biologicamente ativos também estão presentes nestas peçonhas. Aminas biogênicas, noradrenalina (NA), dopamina (DA), triptofano (Trp) foram descritas nas peçonhas dos peixes do gênero *Synanceja* (peixes-pedra) (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a); a serotonina (5-HT) e substâncias análogas foram encontradas na peçonha do peixe-soldado *Gymnapistes marmoratus* (Hopkins *et al.*, 1997); estudos sugerem que as peçonhas de *S. trachynis*, *Pterois volitans* e *Potamotrygon motoro* possuem acetilcolina ou colinomiméticos (Cohen e Olek, 1989); e uma toxina não-protéica (MM 327Da), foi purificada da peçonha do peixe-leão *P. volitans* (Nair *et al.*, 1985).

Em relação à toxicidade, as peçonhas de peixes são letais, sendo que as dos peixes pedra do gênero *Synanceja* são altamente tóxicas quando comparadas com as peçonhas dos peixes dos gêneros *Pterois* e *Scorpaena*. A DL₅₀ da peçonha dos peixes pedra em camundongos é comparável à de algumas serpentes. A DL₅₀ do peixe-pedra *Synanceja horrida* é 0,36 µg/g (i.v.) (Poh *et al.*, 1991). Se essa DL₅₀ fosse extrapolada para um homem de 60 Kg, seriam necessárias aproximadamente 18 mg (i.v.) da peçonha para levar à óbito (Sivan, 2009). Já a DL₅₀ da peçonha *S. trachynis* é 1,6 µg/g (i.v.) em camundongos. As espécies pertencentes à família Batrachoididae com maior importância toxicológica são o *Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa*, estas apresentam DL₅₀ de 4,54 e 4,93 µg/g (i.p.) respectivamente (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa-Rosales *et al.*, 2005).

Somente algumas toxinas já foram isoladas de peçonhas de peixes. As mais estudadas são as toxinas multifuncionais de alta massa molecular (~150 kDa) obtidas das peçonhas dos peixes-pedra (*Synanceja*). Essas toxinas, as quais são letais, foram purificadas a partir da peçonha do peixe *Synanceja horrida* (stonustoxin

– SNTX – *Stonefish National University of Singapore*), *S. trachynis* (trachynilisin – TLY) e *S. verrucosa* (verrucotoxin – VTX e *neoverrucotoxin* – neoVTX), (Kreger, 1991; Poh *et al.*, 1991; Garnier *et al.*, 1995; Ghadessy *et al.*, 1996; Colasante *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 2006). Estas apresentam uma variedade de efeitos biológicos, como atividade hemolítica, neurotóxica, cardiotoxica, edematogênica, neuromuscular e citolítica (Poh *et al.*, 1991; Garnier *et al.*, 1995; Colassante *et al.*, 1996; Hahn e O'connor, 2000).

1.3.1 Atividade hemolítica

Devido à importância das células sanguíneas na homeostase, elas constituem um alvo relevante para diversas toxinas (Sivan, 2009). Várias peçonhas de peixes apresentam atividade hemolítica *in vitro*, como por exemplo, as peçonhas de *Synanceja trachynis* (Kreger, 1991), *Synanceja horrida* (Poh *et al.*, 1991), *Synanceja verrucosa* (Garnier *et al.*, 1995), *Trachinus draco* (Chhatwal e Drayer, 1992), *Thalassoprhynchus nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998, 2001), *Scorpaena guttata* (Carlson *et al.*, 1971) e *Scorpaena plumieri* (Carrijo *et al.*, 2005).

A atividade hemolítica dessas peçonhas parece ser espécie-específica (Poh *et al.*, 1991). Apresenta alta atividade sobre eritrócitos de coelho, e menor atividade sobre as de camundongos e cabras, entretanto, eritrócitos de outros animais (humanos, cobaias e aves) são totalmente resistentes a essas peçonhas (Shiomi *et al.*, 1989; Chhatwal e Drayer, 1992). Em função da ausência de fosfolipases A₂ nas peçonhas de peixes, essa ação sobre os eritrócitos pode ser considerada como ação hemolítica direta (Figueiredo *et al.*, 2009).

1.3.2 Atividade cardiovascular

Uma das mais pronunciadas características do envenenamento por peixes peçonhentos em humanos são as desordens cardiovasculares. As alterações neste sistema têm sido o principal foco de estudo de peçonhas de peixes.

Segundo Church e Hodgson (2002b), parte dos efeitos cardiovasculares produzidos pelas peçonhas de peixes parecem ser resultantes de uma ação direta e/ou indireta do(s) composto(s) da peçonha em receptores muscarínicos e/ou adrenérgicos

(Church e Hodgson, 2002b), como demonstrado anteriormente por Thulesius *et al.* (1983) para a peçonha do peixe-gato do Golfo Árabe. Entretanto, a resposta contrátil induzida peçonhas de *Heteropneustes fossilis* e *Plotosus caninus* em diferentes tipos de musculaturas lisas, parece envolver prostaglandinas, (Auddy *et al.*, 1994).

Estudos em corações isolados de ratos mostraram que a peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena guttata* (Carlson *et al.* 1971), do peixe-soldado *Gymnapistes marmoratus* (Hopkins e Hodgson, 2000), do peixe-pedra *S. trachynis* (Church e Hodgson, 2002b) e do peixe-leão *Pterois volitans* (Church e Hodgson, 2002b), produzem respostas inotrópicas bifásicas consistindo de uma fase inicial de decréscimo seguida por um aumento na força de contração.

Respostas cronotrópicas bifásicas caracterizadas por uma queda inicial seguida de um aumento na frequência cardíaca, foram induzidas pelas peçonhas dos peixes *G. marmoratus* (Hopkins e Hodgson, 2000) e *S. guttata* (Carlson *et al.* 1971), entretanto as peçonhas de *P. volitans* e *S. trachynis* (Church e Hodgson, 2002b), apresentaram resposta com uma única fase, a de aumento da frequência cardíaca.

Respostas hipotensivas em modelos animais também foram descritas para as peçonhas de *S. horrida* e *P. volitans*. Um efeito hipotensivo foi observado em coelhos anestesiados, efeito este atribuído em parte, a vasodilatação periférica uma vez que a frequência cardíaca não foi alterada (Saunders *et al.*, 1959; 1962).

1.3.3 Atividade inflamatória

Uma das maiores e/ou comuns manifestações fisiopatológicas que os diversos organismos têm após o envenenamento com peçonhas de peixe é a resposta inflamatória local (Sivan, 2009), caracterizada clinicamente por dor e edema. Em um estudo de 45 envenenamentos humanos pelo peixe-leão *P. volitans*, Kizer *et al.* (1985) relataram que a principal queixa foi dor intensa no local da injúria e 60% dos casos apresentaram edema local.

Aldred *et al.* (1996) analisaram 101 registros de acidentes com *P. volitans* e criaram com os sinais locais apresentados uma escala para avaliar a gravidade; grau 1: Edema e eritema; grau 2: Formação de bolhas e vesículas; grau 3: Presença de necrose cutânea. A maioria (95%) dos acidentes foram classificados como “grau 1”

acompanhado de intensa dor local, e 13% apresentaram também manifestações sistêmicas.

No Brasil, apesar dos acidentes causados por bagres (família Ariidae) serem os mais frequentes, os causados por arraias (vários gêneros), peixes-sapo (gênero *Thalassophryne*) e peixes-escorpião (gênero *Scorpaena*), também possuem importância epidemiológica. Há uma relação inversa entre a frequência e a gravidade dos acidentes causados por bagres, arraias e peixes-escorpião, sendo os primeiros mais comuns e de gravidade média e os últimos mais raros entretanto muito graves (Haddad Jr., 2003).

Em 2004, Haddad Jr. *et al.* apresentaram dados epidemiológicos de 84 indivíduos acidentados com arraias de água doce do gênero *Potamotrygon* em alguns rios brasileiros. A maioria dos acidentes (~90%) foram registrados durante o verão, dentre os quais cerca de 85% ocorreram durante o dia em regiões de águas sombreadas, locais preferidos por este peixe. O processo inflamatório local induzido pelas peçonhas dessas arraias é extremamente severo. Em 100% dos casos os indivíduos relataram dor excruciante, apresentaram formação de edema e eritema e aproximadamente 90% apresentaram úlceras e necrose tecidual (fig. 2). O tempo médio de cicatrização da ferida foi de 3 meses.

Em estudos experimentais, a resposta edematogênica local, causada pela peçonha de *Scatophagus argus* em camundongos, foi caracterizada pela persistência do evento mesmo após 24 h da injeção da peçonha, sugerindo uma potencial capacidade de formação de edema das toxinas presentes. A vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, eventos necessários para formação de edema, não foram relacionados com a presença de histamina, uma vez que o pré-tratamento com uma droga anti-histamínica (maleato de feniramina) não foi capaz de impedir o fenômeno inflamatório. Também foi observada a presença de intensa nocicepção em todas as doses utilizadas experimentalmente (Sivan *et al.*, 2007).

Em 2003, Lima e colaboradores caracterizaram experimentalmente a resposta inflamatória local aguda induzida pela peçonha do peixe *T. nattereri*. Após a injeção na pata de camundongos, a peçonha induziu uma intensa resposta edematogênica dose-dependente e a liberação local de três citocinas, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina 1 beta (IL-1 β) e a Interleucina 6 (IL-6). Ao injetar a



Figura 2: LESÕES CAUSADAS POR ACIDENTES COM ARRAIAS DO GÊNERO *Potamotrygon*. Acima, lesão do dorso do pé direito de indivíduo do sexo masculino com 1 dia de evolução. A região apresenta necrose tecidual e formação de úlceras cutâneas. Abaixo, úlcera cutânea crônica com aproximadamente 3 meses de evolução. Fonte: Haddad Jr. *et al.*, 2004.

peçonha na cavidade peritoneal dos animais, foi possível observar a migração de leucócitos do leito vascular para o líquido peritoneal.

1.4 O Peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

Os peixes-escorpião, pertencentes à família Scorpaenidae, são freqüentemente encontrados em águas de baixas profundidades entre rochas e recifes de corais. Na costa brasileira são encontradas espécies de oito gêneros da família Scorpaenidae (Nomura, 1984; Carvalho-Filho, 1999), sendo que somente peixes do gênero *Scorpaena* estão associados com envenenamentos em seres humanos (Haddad Jr., 2000). Segundo Figueiredo e Menezes (1980), as espécies do gênero *Scorpaena* encontradas são:

- *S. plumieri* Block, 1789;
- *S. brasiliensis* Cuvier, 1829;
- *S. grandicornis* Cuvier e Valenciennes, 1829;
- *S. isthmensis* Meek e Hildebrand, 1928;
- *S. dispar* Longley e Hildebrand, 1940.

As espécies mais comumente encontradas são o *Scorpaena brasiliensis* (peixe-escorpião vermelho) e o *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião preto). O aparato peçonhento destes animais é constituído por espinhos que estão distribuídos ao longo da nadadeira dorsal (13), anais (3) e pélvicos (2). São estruturas grandes, fortes e pontudas, recobertas por uma bainha tegumentar moderadamente grossa. As glândulas veneníferas são encontradas nas cavidades anterolaterais dos espinhos, em uma camada alongada e fusiforme de tecido acinzentado, mostrado na figura 3B (Russell, 1965; Figueiredo e Menezes, 1980; Haddad *et al.*, 2000, 2003).

Um estudo epidemiológico realizado por Haddad *et al.* (2003) caracterizou clinicamente as manifestações induzidas pela peçonha de *S. plumieri* em acidente com humanos. Neste estudo todos os indivíduos acidentados apresentavam dor excruciante desproporcional ao tamanho da injúria, edema e eritema locais, sinais clássicos de resposta inflamatória. Algumas manifestações sistêmicas como

taquicardia/arritmia, náusea, diarreia e agitação também foram observadas. A compreensão desses fenômenos e a elucidação de seus mecanismos, podem trazer uma série de benefícios, e servem como ponto de partida para o desenvolvimento de uma terapia eficaz contra o envenenamento.

A caracterização química e farmacológica da peçonha de *S. plumieri* vem sendo realizada por nosso grupo de pesquisa. Estudos iniciais demonstraram a natureza protéica da peçonha e descreveram algumas atividades biológicas, que incluem: letalidade, atividade hemolítica, resposta inflamatória sistêmica e ação sobre o sistema cardiovascular (Carrijo *et al.*, 2005, Boletini-Santos *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2010; Andrich *et al.*, 2010).

Carrijo *et al.* (2005) demonstraram que a injeção de doses sub-letais da peçonha de *S. plumieri* (DL₅₀ i.v. 0,28 mg/Kg) em camundongos, acarreta perda de controle de movimentos, hipersalivação, convulsões e dispnéia. Demonstraram também que a peçonha de *S. plumieri* induziu uma discreta hemorragia local após injeção subcutânea em camundongos, intensa atividade hemolítica de maneira dose-dependente em eritrócitos de coelhos, queda abrupta na pressão arterial e na frequência respiratória em ratos após injeção via intra-venosa.

Em 2008, Boletini-Santos *et al.* demonstraram por ensaios imunohistoquímicos, a presença/deposição da peçonha de *S. plumieri*, nos tecidos pulmonares (tecido epitelial e vascular) de camundongos, após a injeção de 100 µg desta, tanto por via intraperitoneal como intraplantar. Esta concentração tecidual da peçonha iniciou uma resposta inflamatória aguda das vias aéreas, caracterizada pelo extravasamento de proteínas e migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) para o espaço alveolar, que foi confirmado através de análise histopatológica. Foi observado também que a peçonha induz aumento significativo de citocinas e quimiocinas (IL-6, KC e MPC-1) nos tecidos pulmonares. Uma intensa apoptose dos macrófagos alveolares foi também observada e relacionada com os níveis elevados de IL-6.

Os efeitos cardiovasculares da peçonha de *S. plumieri* tanto *in vivo* quanto *in vitro* foram avaliados por Gomes *et al.*, 2010. A peçonha provocou alterações na pressão arterial média de ratos anestesiados, a qual é caracterizada por resposta pressora inicial e persistente em doses sub-letais, e uma resposta bifásica (fase pressora inicial transitória seguida por severa hipotensão) em doses letais. Estudos *in vitro* em corações isolados de ratos, demonstraram que a peçonha induziu efeito inotrópico

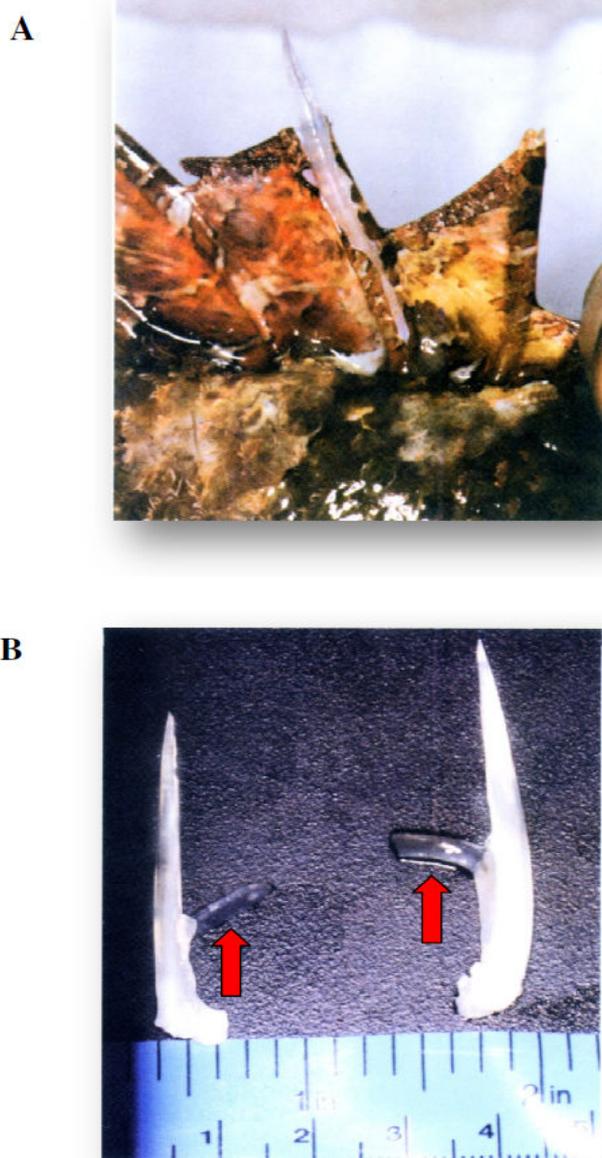


Figura 3: APARATO PEÇONHENTO DO PEIXE-ESCORPIÃO *S. plumieri*. (A) Espinhos dorsais envolvidos por membrana tegumentar. (B) Espinhos dissecados mostrando o tecido cinzento no qual se encontram as glândulas produtoras da peçonha (setas). Fonte: Haddad Jr, 2000.

positivo, lusitrópico positivo e vasoconstritor de forma dose-dependente, os quais foram associados parcialmente à ação do veneno sobre o sistema β -adrenérgico.

Quatro proteínas já foram purificadas a partir desta peçonha; (i) As enzimas Sp-GP e Sp-H uma protease com atividade gelatinolítica e uma hialuronidase (Carrijo *et al.*, 2005; Cassoli, 2008); (ii) Plumieribetina, lectina tipo B capaz de inibir a ligação da integrina $\alpha 1\beta 1$ ao colágeno tipo IV (Evangelista *et al.*, 2009); (iii) Sp-CTx, toxina citolítica e vasoativa, apresenta potente atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho e relaxamento em anéis de aorta isolados de ratos pré contraídos com fenilefrina. Esta toxina também causou uma resposta bifásica com relaxamento inicial concentração- e endotélio-dependente, seguida por uma fase contrátil (Andrich *et al.*, 2010).

1.5 Terapia dos envenenamentos

No que diz respeito às estratégias terapêuticas dos acidentes com animais peçonhentos, além das intervenções farmacológicas nos sistemas e/ou mediadores envolvidos, a terapia com soros anti-venenos é historicamente bem sucedida. Estão disponíveis comercialmente diversos soros para serpentes, aranhas e escorpiões, entretanto, apenas o peixe-pedra da região Indo-Pacífica, *Synanceja trachynis*, possui um anti-veneno (SFAV, *Stonefish Antivenom*, produzido pela empresa australiana *Commonwealth Serum Laboratories*). Este peixe, juntamente com o *Synanceja horrida* e o *Synanceja verrucosa*, são considerados os mais perigosos e mortais que se têm conhecimento (Khoo *et al.*, 1992; Church e Hodgson, 2002a). O soro anti-*Synanceja trachynis* é capaz de neutralizar a atividade hemolítica, letal e/ou cardiovascular de *Synanceja verrucosa* (Shiomi *et al.*, 1989) assim como de peixes pertencentes a diferentes gêneros como o *Pterois*, *Dendrochirus*, *Inimicus* e *Gymnapistes* (Shiomi *et al.*, 1989; Church e Hodgson, 2002b, 2003).

A capacidade do anti-veneno do peixe-pedra de neutralizar atividades tóxicas de outros peixes, é explicada pelo conceito de que peixes peçonhentos pertencentes a diferentes gêneros podem compartilhar toxinas semelhantes (Church e Hodgson, 2002a). Dessa forma, tem-se sugerido que toxinas de muitos peixes

venenosos/peçonhentos são química e farmacologicamente similares, e seus efeitos se diferem apenas quantitativamente (Church e Hodgson, 2002a).

1.6 O processo inflamatório

A inflamação é um processo adaptativo no qual um tecido e/ou organismo reagem a uma injúria. Independe da causa, a inflamação é uma resposta com o intuito de restaurar a homeostase, passando pelas etapas de reconstituição e cura do tecido danificado. A resposta inflamatória aguda a uma injúria envolve alterações na microcirculação, conduzindo de forma coordenada componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) ao local da injúria, seguido por fagocitose pelas células competentes e dor local. Alterações no calibre e no fluxo vascular iniciam rapidamente após a lesão e se desenvolvem de diferentes maneiras. Após uma vasoconstrição transitória das arteríolas, ocorre vasodilatação, que permite um aumento da permeabilidade desses vasos, principalmente nas vênulas pós-capilares, levando a um extravasamento de fluido rico em proteínas para o tecido extravascular, formando o edema acompanhado de dor (para revisão veja Teixeira *et al.*, 2009).

1.6.1 Nocicepção

O processo inflamatório é freqüentemente associado com a dor e hiperalgesia. A função fisiológica da dor é alertar o cérebro sobre alterações na homeostase fornecendo informação sobre o estímulo causador do dano tecidual, permitindo que o organismo se proteja de um prejuízo maior. O fenômeno da dor é originado nas fibras nervosas sensoriais periféricas através da ativação de nociceptores, que transmitem a informação do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC). A nocicepção codifica e processa o estímulo nocivo no sistema nervoso, que pode ser mensurado através de técnicas eletrofisiológicas. O estímulo nocivo ativa os neurônios nociceptivos primários, através de terminações nervosas livres (fibras A δ e C), no sistema nervoso periférico, respondendo a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. As vias periféricas de dor são ativadas por esses estímulos além de vários mediadores inflamatórios que estão envolvidos

na gênese, manutenção e severidade da dor (para revisão veja Cummins e Rush, 2007).

Diversos mecanismos estão envolvidos nos processos nociceptivos centrais e periféricos, incluindo rápidas mudanças funcionais de sinalização e mudanças na regulação de longa duração como *up-regulation* da relação mediador/receptor (Cervero e Laird, 1991).

O reconhecimento inicial da injúria leva a produção e/ou liberação de mediadores como bradicinina (BK), histamina, serotonina (5-HT), prostanóides, citocinas, prótons e outras substâncias que podem atuar nas fibras sensoriais de duas formas diferentes. A primeira caracterizada pela indução de dor pela ação direta em receptores pró-nociceptivos e/ou canais iônicos, uma vez que ativados levam a ativação de várias vias de proteínas quinase (Cheng e Ji, 2008). Essa ativação causa a fosforilação de canais iônicos voltagem-dependentes, principalmente os de sódio, iniciando a propagação dos potenciais de ação (Woolf, 2004; Giordano, 2005). A segunda, atua na sensibilização inicial das fibras aferentes primárias reduzindo seus limiares para que responda a um estímulo de menor intensidade, fenômeno conhecido como hiperalgesia (Brown e Passmore, 2010).

Além desses mediadores, os neurônios primários aferentes contribuem para liberação direta de neuropeptídeos como substância P (SP) e CGRP (sigla do inglês *calcitonin gene-related peptide*), ou indireta liberação de catecolaminas através do sistema simpático, levando a uma inflamação neurogênica (Haddad, 2007; Harvey e Dickenson, 2008; Rittner *et al.*, 2008a, b).

Alterações centrais, tais como mudanças no índice da expressão de receptores (plasticidade nociceptiva), hiperexcitabilidade central e alterações no controle descendente do mesencéfalo também podem ser observadas em condições inflamatórias e neurogênicas (Harvey e Dickenson, 2008).

1.6.2 Migração celular

Após uma lesão tecidual de qualquer natureza, numerosos mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, cininas e eicosanóides, são produzidos na circulação ou nas proximidades da lesão, por células endoteliais ou células residentes, principalmente mastócitos, macrófagos e células dendríticas.

Esses mediadores são elementos chave que orquestram todos os eventos da resposta inflamatória à injúria (para revisão veja Teixeira *et al.*, 2009). Concomitantemente, leucócitos circulantes, inicialmente neutrófilos, migram para o local da lesão sob influência de agentes quimioatraentes. Esse processo envolve de forma seqüencial a captura, rolamento e adesão leucocitária à vasculatura endotelial, seguida pela transmigração através das paredes dos vasos e posterior migração até o tecido afetado. Essa seqüência de eventos é conhecida como diapedese (Granger e Kubes, 1994). Todos os passos da cascata de recrutamento celular são regulados pelas moléculas de adesão celular, tanto nos leucócitos quanto no endotélio. Os diferentes subtipos de moléculas de adesão, são responsáveis pelos diferentes passos do extravasamento celular (Carlos e Harlan, 1994). A expressão e função dessas moléculas são reguladas por vários mediadores inflamatórios (Hubbard e Rothlein, 2000; Kaplanski *et al.*, 2003). A resolução da inflamação e a fase de reparo envolvem o decaimento dos mediadores químicos pro-inflamatórios e o aumento dos anti-inflamatórios no tecido residente e principalmente nos macrófagos recrutados, assim como a apoptose dos granulócitos com subsequente remoção pelos fagócitos. Essa etapa é drenada pelo sistema linfático que remove o fluido e os detritos celulares do espaço intersticial (Serhan e Savill, 2005). Entretanto, se os eventos agudos não forem bem sucedidos na neutralização do agente lesivo, o processo inflamatório persiste adquirindo novas características como a infiltração de fagócitos mononucleares, linfócitos, fibroblastos e em algumas circunstâncias granulócitos na região afetada, instaurando o estado inflamatório crônico (Medzhitov, 2008).

1.6.3 O sistema calicreína-cinina

O sistema calicreína-cinina representa uma cascata enzimática endógena que, após ativação de serino-proteases plasmática e tecidual, conhecidas como calicreínas, liberam peptídeos ativos, as cininas, os quais exercem diversos efeitos biológicos incluindo hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e deflagração de resposta inflamatória e nociceptiva. As cininas constituem um grupo de peptídeos com 9 a 11 resíduos de aminoácidos, dentre os quais estão incluídos a bradicinina (BK) e a Lys-bradicinina (calidina), que são originadas pela hidrólise dos seus respectivos precursores, o cininogênio de alto e

baixo peso molecular (Bhoola *et al.*, 1992). Estes peptídeos exercem seus efeitos biológicos através da ativação de dois receptores chamados B₁ e B₂. Estes receptores são membros de uma super família de receptores, semelhante à rodopsina, acoplados a proteína G. Vários subtipos do receptor B₂ já foram descritos. A BK e calidina são agonistas endógenos do receptor B₂, que é expresso de forma predominante, enquanto que os metabólitos ativos derivados destes des-Arg⁹-bradicinina e des-Arg¹⁰-calidina são agonistas preferenciais do receptor B₁. Resultados obtidos através de experimentos em modelos animais sugerem que o receptor B₂ está envolvido na fase aguda da inflamação e na resposta à dor, enquanto que o receptor B₁ participa da resposta à fase crônica (Dray, 1997).

Um dos mecanismos de indução de hipersensibilidade induzida pela bradicinina está muito bem compreendido e envolve o receptor de canal transiente de cátions (Na⁺, Ca²⁺) da subfamília V membro 1 (TRPV1), expresso nos axônios sensoriais. Esses canais normalmente respondem a estímulos nocivos térmicos acima de 42 °C, entretanto após a exposição à BK, respondem a estímulos menores, como temperatura ambiente por exemplo (Huang *et al.*, 2006).

Gerada durante a inflamação e lesão tecidual, a BK é um dos mais potentes mediadores inflamatórios e reguladores dos nociceptores. A ativação dos receptores B₂, constitutivamente expressos nos neurônios sensoriais aferentes primários, induz hiperalgesia através da liberação de diacilglicerol (DAG) e ativação da proteína quinase C, além de poder sensibilizar os nociceptores a liberar prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico tanto das células imunes e endoteliais quanto dos neurônios sensoriais (Dray e Perkins, 1997). A BK também é capaz de proporcionar a liberação de substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) em cultura de neurônios sensoriais de ratos (Vasko *et al.*, 1994). Uma vez sintetizada, a bradicinina é rapidamente inativada no plasma e nos pulmões por peptidases chamadas de *cininases*, restringindo seus efeitos aos locais onde foi produzida, atuando como mediadora de processos inflamatórios locais (Brawn e Passmore, 2010).

A administração de BK reproduz dois sinais cardinais da inflamação (rubor e calor) através da ativação dos receptores B₂ que provocam vasodilatação devido à estimulação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e fosfolipase A₂ (PLA₂), levando à produção de óxido nítrico e prostanóides pelas células vasculares

endoteliais. O subsequente exudato rico em proteínas da circulação é fortemente determinado pelo aumento da permeabilidade vascular, sendo este considerado essencialmente como o mecanismo vasogênico do terceiro sinal cardinal da inflamação, o edema (tumor) (Moreau *et al.*, 2005). O papel específico dos receptores B₁ e B₂ na percepção da dor (4º sinal cardinal da inflamação) é relacionado com a amplitude de sua expressão. Os receptores B₂ quando ativados pela BK, contribuem para a resposta aguda à dor (Dray, 1997).

Uma das aplicações mais promissoras dos antagonistas de receptores de cininas é a analgesia. Ensaio utilizando modelos animais demonstram a analgesia promovida pelo bloqueio farmacológico dos receptores B₂ com antagonistas seletivos em modelos de hiperalgisia inflamatória aguda; esta observação é sustentada pelas alterações nas respostas nociceptivas verificadas em camundongos *knockout* para receptores B₂ (Calixto *et al.*, 2000). Apesar dos muitos estudos realizados, um mecanismo de ação nociceptiva direta da bradicinina universalmente aceito ainda não foi definido (Brawn e Passmore, 2010).

1.6.4 Citocinas

Outra classe de mediadores da resposta inflamatória com grande importância são as citocinas. Inicialmente chamadas de linfocinas ou monocinas para indicar as células produtoras, o termo “citocina” passou a ser empregado e é a melhor descrição, uma vez que quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizar essas proteínas, e passaram a ter uma enorme importância em quase todas as áreas de estudos em biologia. Muitos pesquisadores têm feito analogia entre as citocinas e os hormônios, entretanto enquanto os hormônios são sintetizados por tecidos altamente especializados, as citocinas são produzidas praticamente por qualquer tipo de célula (Hopkins, 2003, Dinarello, 2000).

Algumas citocinas favorecem claramente o processo inflamatório, sendo classificadas como citocinas *pró-inflamatórias* enquanto que outras suprimem esse fenômeno e são chamadas de citocinas *anti-inflamatórias*. Esta classificação deve ser criteriosa, pois algumas citocinas podem tanto promover quanto suprimir o processo inflamatório. Por exemplo, a interleucina 4 (IL-4), a IL-10 e a IL-13 são potentes ativadores de linfócitos B favorecendo a inflamação, entretanto também

são capazes de suprimir genes para a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias (Dinarello, 2000).

A classificação das citocinas em pró e anti-inflamatórias é baseada na expressão dos genes que codificam mediadores do processo inflamatório. Se durante o processo o gene que codifica um determinado mediador está mais expresso que o normal por intermédio de uma citocina, ela então é classificada como pró-inflamatória. Como exemplo dessa classe de genes estão os que codificam as enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂), ciclooxigenase 2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase isoforma induzível (iNOS), aumentando a síntese de leucotrienos, prostaglandinas e óxido nítrico (Dinarello, 2000). Outra classe de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias, são os das quimiocinas, que são substâncias quimioatraentes de leucócitos. Neste grupo, classifica-se a interleucina – 8 (IL-8), que é capaz de facilitar a passagem dos leucócitos da circulação para o tecido e também promover sua degranulação, gerando lesão tecidual. A IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF) também são capazes de induzir a expressão das moléculas de adesão celular, promovendo a diapedese (Dinarello, 2000). De forma conjunta, as citocinas pró-inflamatórias desencadeiam uma cascata de produtos de genes, geralmente não produzidos em indivíduos saudáveis. A IL-1 e o TNF são particularmente importantes na expressão de genes pró-inflamatórios, atuando de forma sinérgica. Se o estímulo for de origem bacteriana, trauma mecânico, isquemia, ativação de linfócitos T ou toxinas, IL-1 e TNF deflagram a cascata de mediadores inflamatórios, sendo o endotélio seu principal alvo. O sinergismo entre a IL-1 e o TNF é um fenômeno comum. Ambas citocinas são produzidas no local da inflamação e existe uma correlação entre seus níveis e a severidade do processo inflamatório. Há também um sinergismo entre a IL-1 e bradicinina, no que diz respeito à produção de prostanóides e outras citocinas pró-inflamatórias (Dinarello, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar experimentalmente, em modelo murino, a resposta inflamatória local induzida pela peçonha do peixe-escorpião preto brasileiro *Scorpaena plumieri*, e verificar a reação cruzada desta peçonha com o soro anti o peixe pedra (*Synanceja* spp).

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos fisiopatológicos locais induzidos pela peçonha *S. plumieri* quanto:
 - Formação de edema;
 - Indução de nocicepção;
 - Alterações histopatológicas;
 - Liberação de citocinas.
2. Estudo do mecanismo da ação edematogênica através de bloqueios farmacológicos.
3. Purificar a fração protéica pró-inflamatória da peçonha por técnicas cromatográficas;
4. Verificar a reação cruzada entre a peçonha do peixe-escorpião e o soro anti-*Synanceja* por ensaios de proteção (*in vivo*) e análises de imuno reconhecimento (*in vitro*);

3 MATERIAIS

3.1 Reagentes

As drogas anti-inflamatórias utilizadas neste trabalho foram o diclofenaco de sódio (Novartis), prometazina (Sanofi), aprotinina (Bayer) e HOE-140 (Sigma). O soro comercial contra a peçonha de peixes-pedra (SFAV, *StoneFish AntiVenom*) foi adquirido da Commonwealth Serum Laboratories (Melbourne, Austrália). O CBA (Kit de inflamação em camundongos) utilizado para dosagem dos níveis de citocinas foi fabricado pela BD Biosciences (San Diego, EUA).

Os reagentes utilizados na eletroforese bidimensional foram: Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250); uréia, CHAPS, anfólitos (Bio-Lyte 3-10), tiras com gradiente linear de pH imobilizado (IPG “strip”: Immobilized pH gradient), DTT (Ditiotreitol) e padrão de peso molecular para SDS-PAGE (Broad Range) da Bio-Rad Laboratories Inc. (EUA)/ tiouréia, tris (hidroximetil aminoetano), glicerol, iodoacetamida, glicina, kit de dosagem de proteína (2-D Quant Kit) e tampão de reidratação (Destreak) da GE Healthcare (Suécia); SDS (dodecilsulfato de sódio) da J.T. Baker (EUA); solução de acrilamida-bis (Acrylamide/Bis Solution – 37.5:1 (30 % w/v de T e 2.6 % de C) da Serva Electrophoresis (Alemanha); agarose da BioAmérica Inc (EUA). Para o *Western blotting*, foram utilizados leite em pó desnatado (Molico) e o tween 20, anticorpos anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase, peróxido de hidrogênio, diaminobenzidina e 4-cloro-1-naftol (Sigma).

Para as etapas de purificação, a resina Sephacryl S200 HR foi adquirida da GE Life Sciences (Suécia) e a coluna de troca aniônica para HPLC da Eprogen (EUA). As membranas de diálise foram obtidas da Sigma (EUA). Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica, procedentes da Merck, Sigma, Bio-Rad e Vetec. As soluções utilizadas nas cromatografias foram preparadas em água purificada em sistema milli-Q, enquanto as utilizadas em outros experimentos foram preparadas em água destilada.

4 MÉTODOS

4.1 Coleta dos Peixes

Os exemplares de peixe-escopião *Scorpaena plumieri* foram capturados por mergulhadores licenciados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) com o auxílio de puçá manual. A captura foi realizada em locais de águas rasas, próximos a rochas e recifes de coral no litoral do município de Fundão, Espírito Santo. Os peixes foram mantidos em aquário de água marinha com suprimento adequado de oxigênio até o momento da identificação, que foi feita através da observação de manchas brancas sobre a coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais (fig. 4B), as quais são características desta espécie (Figueiredo e Menezes, 1980).

4.2 Obtenção da Peçonha

A peçonha foi extraída dos espinhos dorsais e anais dos peixes de acordo com o método de *Batch*, desenvolvido por Schaeffer *et al.*, (1971). Os espinhos foram removidos dos peixes previamente anestesiados por resfriamento (- 20 °C) e fatiados manualmente com auxílio de um alicate. Os fragmentos foram transferidos para um frasco com PBS a 4 °C e manualmente homogeneizados sobre resfriamento (banho de gelo) para solubilização da peçonha. O extrato foi centrifugado a 14.000 *g* por 30 minutos a 4 °C para remoção das partículas insolúveis. O sobrenadante obtido corresponde à fração solúvel da peçonha, a qual foi chamada de SpV (do inglês *Scorpaena plumieri* Venom) (fig. 5). Uma parte do material extraído foi imediatamente submetida ao fracionamento e outra armazenamento para posterior utilização.

4.3 Dosagem da Concentração Protéica

O conteúdo protéico da peçonha do peixe-escorpião (SpV) foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA – Sigma) como padrão.

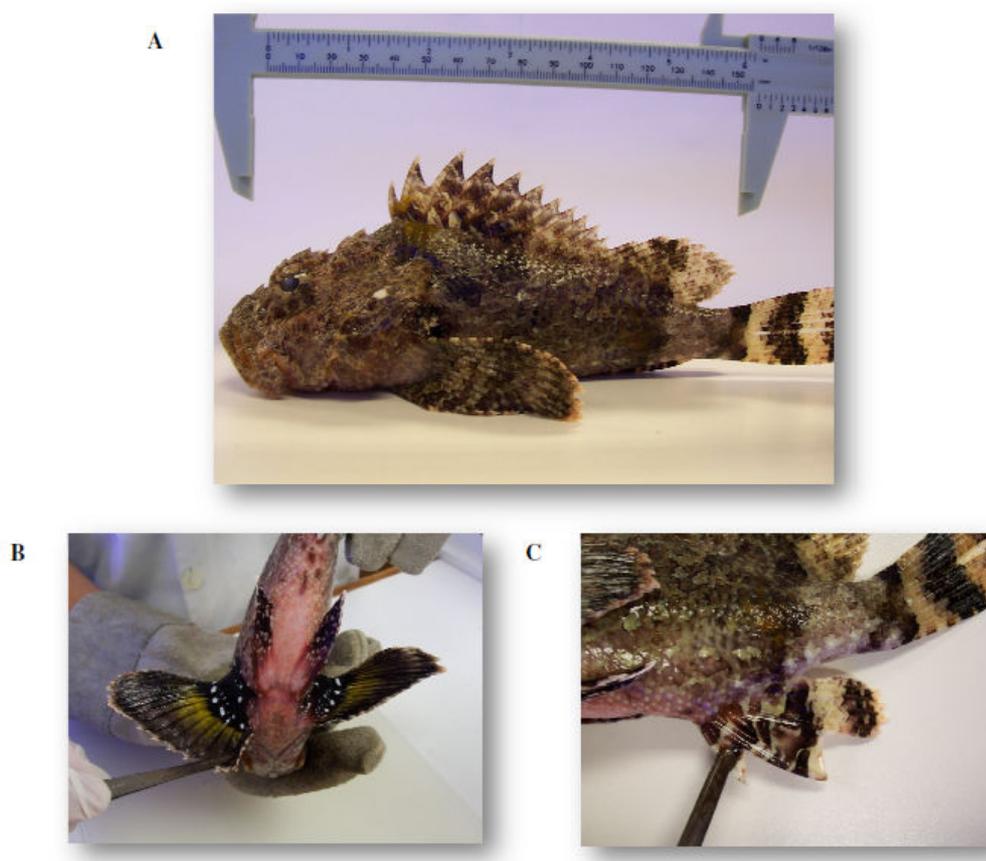


Figura 4: PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*. (A) Vista lateral de um exemplar. (B) Manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características da espécie. (C) Nadadeira anal e espinhos anais. Fonte: Andrich, 2009.

4.4 Atividades Biológicas

Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, machos, pesando entre 20 e 25 g, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 27 x 18 x 13 cm, alocando no máximo quatro animais, com água e ração *ad libitum* em ciclo claro / escuro de 12 h. Todos os experimentos seguiram as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

4.4.1 Atividade Edematogênica

Para a avaliação da atividade edematogênica da peçonha de *S. plumieri*, diferentes doses (7,5, 15 e 60 µg de proteína em 30 µL de PBS), foram injetadas na região do coxim plantar da pata traseira direita de camundongos (via intra-plantar, i.pl.). Foram utilizados 4 animais por dose testada. Os animais do grupo controle receberam 30 µL de PBS. O edema foi avaliado pela diferença da espessura (aferida em milímetros) da pata antes (0 h) e após a injeção de SpV, nos tempos 0,5, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h utilizando um paquímetro digital (Zaas Precision). Os resultados foram expressos como a média da porcentagem do aumento da pata em relação à espessura inicial (Lima *et al.*, 2003).

4.4.2 Atividade Nociceptiva

A atividade nociceptiva foi avaliada de acordo com o descrito por Hunskaar *et al.* (1985). Os camundongos foram colocados individualmente em gaiolas de vidro com superfície inferior refletora para facilitar a observação. Após um período de adaptação de 10 minutos, os animais receberam via i.pl. diferentes doses do SpV (7,5, 15, 30, 60 e 100 µg de proteína contidas em 30 µL de PBS). Foram utilizados 4 animais por dose testada. Os animais do grupo controle receberam 30 µL de PBS.

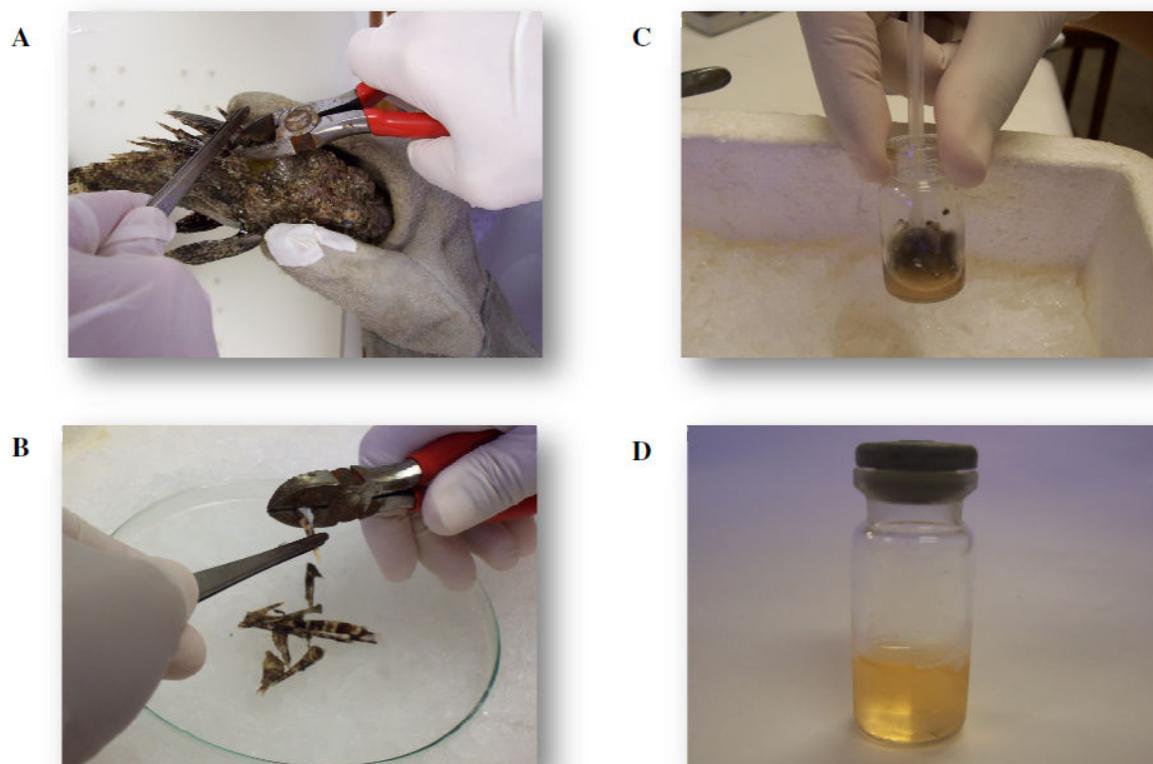


Figura 5: Extração da peçonha. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Seccionamento dos espinhos. (C) Homogeneização dos espinhos fatiados em PBS. (D) Fração solúvel da peçonha (SpV). Fonte: Andrich, 2009.

O índice de nocicepção foi determinado pelo tempo em segundos que o animal permaneceu com a pata injetada na boca (ato de lambe ou morder) durante os primeiros 30 minutos de avaliação experimental.

4.4.3 Avaliação da estabilidade das atividades biológicas

Para avaliação da estabilidade das atividades biológicas, amostras de SpV foram estocadas em diferentes temperaturas (24, 4, - 15 e - 196 °C) e também submetida a processo de liofilização. Após 80 horas de armazenamento, as atividades edematogênica e nociceptiva (N = 4) foram avaliadas conforme metodologia descrita nos itens 4.4.1 e 4.4.2 e comparadas com os resultados obtidos de ensaios realizados com a peçonha recém extraída, considerado 100% ativa. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

4.4.4 Estudo da via de formação do edema

Para o estudo da via de formação do edema, os camundongos foram pré-tratados via intra-peritoneal (i.p.) com diferentes drogas anti-inflamatórias, 30 minutos antes da injeção i.pl de 15 μ g de SpV contidas em 30 μ L de PBS. Os experimentos foram conduzidos seguindo as metodologias descritas por Bohrer *et al.* (2007) e Sivan *et al.* (2007). Os animais foram distribuídos em 6 grupos de N=4:

- Grupo controle positivo de atividade edematogênica (PBS + SpV). Neste grupo, 30 minutos antes da injeção i.pl. de SpV, os animais receberam administração i.p. de PBS;
- Os animais do grupo controle negativo (PBS + PBS), receberam uma injeção prévia de PBS via i.p., e 30 μ L de PBS pela via intra plantar;
- Grupo pré-tratado com 1 mg/Kg de diclofenaco de sódio (DF + SpV), um inibidor não seletivo porém com maior predileção para a COX-2;
- Pré-tratamento com 1 mg/Kg de prometazina (PR + SpV), antagonista dos receptores H₁ de histamina;

- Grupo de animais que receberam 8 mg/Kg de aprotinina (AP + SpV), um inibidor de serino proteases;
- Pré-tratamento com 100 nmol/Kg de HOE-140 (HOE + SpV), um antagonista dos receptores B₂ de bradicinina.

As doses utilizadas do diclofenaco de sódio e da prometazina foram estimadas com base na faixa terapêutica recomendada pelos fabricantes, e as da aprotinina e do HOE-140 de acordo com por Bohrer *et al.* (2007). Os resultados foram expressos como média ± EPM.

4.4.5 Análise histopatológica

Para avaliar alterações histopatológicas locais no tecido após a aplicação da peçonha, 15 µg de SpV foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita e, após 0,5, 2, 6, 12, 24 e 48 horas da injeção, os animais foram sacrificados e as patas amputadas na região articular.

Em seguida, os membros foram fixados e descalcificados em solução Bouin-salina por 96 horas. Após fixação, as patas foram imersas em álcool etílico 70% até o momento da inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo as patas foram submetidos a microtomia sendo obtidos cortes de 7 µm de espessura para montagem das laminas.

Com os tecidos já aderidos às laminas, foi realizada a coloração pelo método HE (hematoxilina – eosina) e análise feita em microscópio óptico com câmera digital acoplada em objetiva com aumento de 10 e 40 vezes. Estas análises foram realizadas com a colaboração do Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira.

4.4.6 Níveis de citocinas pró-inflamatórias eliciadas pela peçonha do peixe *S. plumieri*

Para verificar a presença citocinas no local da lesão induzida pela peçonha, os níveis das citocinas pró-inflamatórias Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), Fator de necrose tumoral (TNF),

Interferon (IFN) e Interleucina 12p70 (IL-12p70), foram medidos utilizando o CBA (kit de inflamação de camundogos). As análises foram realizadas de acordo com o preconizado pelo fabricante.

As amostras foram preparadas de acordo com metodologia adaptada de Lima *et al.*, 2003. Quinze microgramas de SpV (30 μ L de PBS) foram injetadas via i.pl. na pata traseira direita e, após 0,5, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da injeção, os animais foram sacrificados e as patas amputadas na região articular. Os membros foram homogeneizados com tampão fosfato 20 mM pH 7,4 acrescido de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10 mM, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 0,1 mM, benzetônio 0,1 mM, aprotinina 0,1 mM e tween 20 0,05%, numa proporção de 500 μ L do tampão para cada 100 mg do membro amputado. O procedimento foi conduzido em banho de gelo com auxílio de um pistilo de polipropileno acoplado a um homogeneizador automático durante 30 segundos a 100 rotações por minuto. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 14.000 *g* por 20 minutos a 4 °C para retirada de partículas insolúveis e o sobrenadante (amostra para dosagem das citocinas) mantido a – 80 °C até o momento das dosagens. Foram utilizados 4 animais para cada tempo e o grupo controle recebeu 30 μ L de PBS.

O princípio do método de dosagem com o kit CBA consiste na ligação de anticorpos com as citocinas de interesse. O kit oferece seis grupos de microesferas, apresentando intensidades de fluorescência diferentes, revestidas com anticorpos específicos para cada tipo de citocina, denominadas “esferas de captura”. Para as dosagens, as esferas de captura específicas para cada citocina, foram agrupadas e posteriormente misturadas com 25 μ L de cada amostra a fim de permitir a ligação das esferas de captura com as possíveis citocinas presentes na amostra. Em seguida, foram adicionados a essa mistura anticorpos monoclonais anti-citocinas de camundongos, conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE). Após esta etapa (de marcação), a fluorescência de um total de 1800 microesferas por amostra foi lida em citômetro de fluxo FACSCallibur® (BD Biosciences), com base em gráficos de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (fig. 6A).

As populações das microesferas foram detectadas de acordo com suas respectivas intensidades de fluorescência, se distribuindo ao longo de eixo Y (detector de fluorescência 4, FL-4, o qual capta luz no comprimento de onda ~650 nm, correspondente a cor vermelha) (fig. 6B). O aumento da fluorescência das

microesferas representado pelo deslocamento ao longo do eixo X (detector de fluorescência 2, FL-2, o qual capta luz no comprimento de onda ~570 nm, correspondente a cor laranja), foi empregado como variável proporcional a concentração de cada citocina presente (fig. 6C).

O mesmo procedimento foi realizado previamente para a construção de uma curva padrão com concentrações de 20 a 5000 pg/ml, e empregada para determinar as concentrações de cada citocina na amostra em análise.

Estas análises foram realizadas com a colaboração da Dr^a. Elenice Moreira Lemos e Amanda Cardoso, no Laboratório de Diagnóstico do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ, Belo Horizonte – MG).

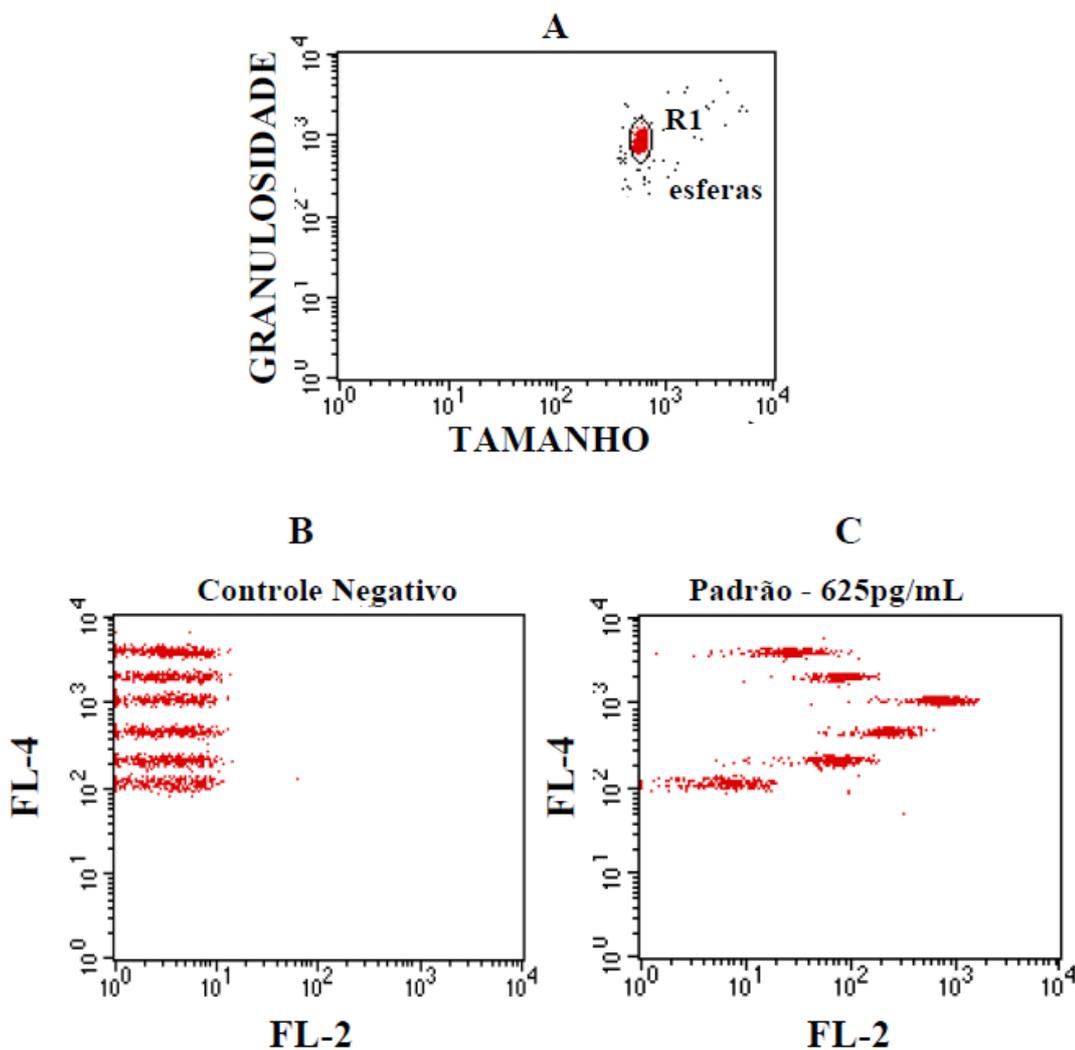


Fig. 6: Plataforma de microesferas do kit CBA. (A) Determinação da região da população de microesferas através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulidade (SSC). (B) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas, distribuídas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões de intensidade de fluorescência específicas ao longo do eixo Y, num gráfico FL-2 *versus* FL-4. (C) Deslocamento das microesferas ao longo do eixo X proporcional a concentração de cada citocina presente do padrão, num gráfico de distribuição FL-2 *versus* FL-4.

4.5 Purificação da fração protéica responsável pela atividade edematogênica

O processo de purificação do componente protéico com atividade edematogênica da peçonha bruta envolveu duas etapas cromatográficas, filtração em gel e troca aniônica.

*4.5.1 Primeira Etapa - Fracionamento da peçonha de *S. plumieri* por cromatografia de filtração em gel convencional*

Imediatamente após a obtenção da peçonha, conforme item 4.2, uma amostra de SpV (43,2 mg proteína) foi aplicada em coluna de Sephacryl S200 HR (2 x 120 cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio (PB) 10 mM pH 7,5, contendo 0,4 M de NaCl. A cromatografia foi conduzida a 4 °C com fluxo de 7 mL/h, coletando-se frações de 1,75 mL. O conteúdo protéico das frações eluídas foi estimado pela leitura da absorbância a 280 nm. A indução edema foi monitorada nos eluatos conforme descrito no item 4.4.1.

4.5.2 Segunda Etapa - Cromatografia de troca aniônica em sistema de alta resolução

A concentração salina (NaCl) da fração de interesse F2, proveniente da etapa anterior, foi ajustada para 0,1 M por diluição em PB 20 mM pH 7,5. Posteriormente, a solução resultante foi filtrada em membrana de 0,22 µm e submetida à cromatografia de troca aniônica em sistema HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* (Shimadzu) utilizando-se coluna Eprogen Q SAX (*Strong Anion Exchange*) 250 X 4,6 mm, previamente equilibrada com PB 20mM acrescido de NaCl 0,1M pH 7,5. Após a adsorção do material à coluna, a cromatografia foi desenvolvida com um gradiente segmentado (linear) do eluente (PB 20 mM NaCl 1 M pH 7,5), segundo o programa: 0-10 min: 0% eluente; 10-15 min: 25% eluente; 15-50 min: 60% eluente; 50-55 min: 100% eluente). O fluxo foi de 0,5 mL/min, e as proteínas eluídas foram detectadas pela absorvância à 280nm. As subfrações originadas desta etapa cromatográfica foram enumeradas de acordo com o tempo de retenção e a atividade edematogênica foi mapeada conforme descrito no item 4.4.1 e o material ativo denominado SF2.

4.6. Eletroforese em gel de tricina – SDS-poliacrilamida

Esta eletroforese foi realizada conforme descrito por Schägger e Von Jagow (1987), utilizando um mini sistema de eletroforese (Bio-Rad) com placas de 10 cm de comprimento por 8,2 cm de largura.

O gel de separação (8 %) foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bis-acrilamida em água (49,5% T e 3% C), contendo 13,3% de glicerol p/v, 0,1 % de SDS p/v, 0,033% de persulfato de amônio p/v, 0,033% de TEMED v/v e 1,0 M de Tris-HCl pH 8,45.

O gel de concentração foi preparado a 5 % a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de SDS, TEMED e persulfato de amônio do gel de separação e ausência de glicerol.

Amostras de proteínas (10 a 20 µg) da peçonha bruta e frações de interesse purificadas foram diluídas em tampão Tris-HCl 50mM pH 6,8 contendo 4% de SDS p/v, 12% de glicerol p/v, e 0,01% de Serva blue G. Em seguida, as soluções foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida sob tensão de 200 V a temperatura ambiente em tampão Tris-HCl 0,2M pH 8,9 (ânodo) e Tris-HCl 0,1M contendo 0,1M de tricina e 0,1% de SDS p/v pH 8,25 (cátodo).

Para revelação das proteínas no gel, foram realizados os seguintes procedimentos: o gel foi imerso por 30 minutos em solução de metanol 50% e ácido acético 10% para fixação das proteínas ao gel; em seguida, o gel foi imerso em solução Serva blue G por 2 horas e posteriormente foi descorado em solução de ácido acético 10%.

4.7 Eletroforese Bidimensional

4.7.1 Primeira Dimensão – Focalização isoeétrica (FIE)

Para a focalização isoeétrica foram utilizados géis em tira (*Strips*, Bio-Rad), de 7 cm com gradiente linear de pH 3 a 10 e 4 a 7. Aliquotas de SpV contendo 100 µg de proteínas foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak, Amersham Biosciences), contendo 0,2% de anfólitos para um volume final de 125 µl. As

soluções das amostras foram transferidas para bandeja de reidratação e os *strips* foram colocados sobre estas, por um período de 30 minutos.

Em seguida foram realizadas as etapas de reidratação ativa (50 V por 12 horas a 20°C) e focalização isoelétrica (1ª etapa: 300 V por 3 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem, por rampa rápida, até 4.000 V em 2 horas; 3ª etapa: Acúmulo de 10.000 Volts/hora; 4ª etapa: 500 V por 5 horas) em um sistema IEFCell (Bio-Rad) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/gel.

Após o término da focalização isoelétrica, as proteínas no gel foram submetidas à redução e alquilação de acordo Andrade *et al.* (2008). O processo consistiu de incubação seqüenciada com: (i) tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 125 mM de DTT, durante 15 minutos; e (ii) tampão de equilíbrio contendo 125 mM de iodoacetamida durante 15 minutos.

4.7.2 Segunda Dimensão – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A segunda dimensão da eletroforese, foi realizada de acordo com Laemmli (1970) num sistema de mini-gel de 10 cm x 8,2 cm (Bio-Rad) com gel de separação de poliacrilamida a 10 %. O gel de separação foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida em água (29,2:0,8%), contendo 0,1% de SDS p/v, 0,1% de persulfato de amônio p/v, 0,1% de TEMED v/v e 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8.

Os *strips* contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidos para superfície do gel e seladas com agarose 0,5 % (preparada em tampão Tris/Glicina/SDS). A eletroforese foi conduzida a 20 mA/gel por 30 minutos e, em seguida a 40 mA/gel até o término da corrida em tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M contendo 0,1% de SDS pH 8,3.

Após a 2ª dimensão, as proteínas foram reveladas no gel seguindo os passos: primeira lavagem do gel (3 vezes de 30 minutos) em solução de ácido orto-fosfórico (H₃PO₄) 2%, etanol 30%; seguida por lavagem do gel (3 vezes de 10 minutos) em solução de H₃PO₄ 2%; posteriormente o gel foi imerso em 30 mL de solução de H₃PO₄ 2%, etanol 18% e sulfato de amônio, (NH₄)₂SO₄, 12% por 30 minutos a qual foi incorporada 150 µl de Coomassie G-250 2%, por 5 dias; o excesso do corante foi retirado com lavagem em solução de etanol 20%.

4.8 Reatividade Cruzada do SpV com o *Stonefish Antivenom* (SFAV)

Os testes foram conduzidos a fim de avaliar o potencial do anti-soro desenvolvido contra a peçonha do peixe-pedra *Synanceia trachynis* (*Stonefish Antivenom*, SFAV), em neutralizar as atividades nociceptiva e edematogênica do peixe-escorpião *S. plumieri*, e testar sua imuno reatividade *in vitro*.

4.8.1 Ensaios *in vivo*

Amostras de SpV foram pré-incubadas a 25 °C por 30 minutos com o SFAV (1:0,25, 1:0,5, 1:1 e 1 µg de SpV / 1,5 U de SFAV). Em seguida, amostras de 30 µL de cada mistura, as quais continham 15 µg de SpV foram administradas (i. pl.) nos camundongos e as atividades edematogênica e nociceptiva foram avaliadas de acordo com os itens 4.4.1 e 4.4.2 respectivamente. Amostras de SpV foram submetidas as mesmas condições de incubação e foram usadas como controle positivo das atividade biológicas (edema e nocicepção).

4.8.2 Ensaios *in vitro* - Western Immunoblotting

Após a separação por eletroforese bidimensional conforme item 4.7, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Whatman), durante 1 h a 350mA/100 V. A membrana foi posteriormente bloqueada por 1 hora com PBS contendo 0.3 % de Tween 20 e 5 % de leite desnatado. Em seguida foram realizadas 3 etapas de lavagem com PBS (5 minutos cada), e posteriormente a membrana foi incubada com o SFAV (CSL, Melbourne, Australia) diluído 1:500 por 1 hora a 25 °C. Após mais 3 etapas de lavagem com PBS a membrana foi incubada com o conjugado (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase) numa diluição 1:5000 em PBS contendo 0,05% de Tween 20. A imunodeteccção foi feita com peróxido de hidrogênio em presença de 4-cloro-naftol e paralisada por substituição dessa solução por água destilada.

4.9 Análise Estatística dos Dados

Os resultados dos ensaios biológicos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de um pós-teste de Tukey (*Prism Graph 5.0*). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Atividades Biológicas

5.1.1 Atividade edematogênica

Para determinar a atividade/resposta edematogênica induzida pela peçonha de *S. plumieri*, foi usado o teste da pata de camundongo pela injeção de 7,5, 15 e 60 μg de proteína de SpV/animal. Todas as doses testadas acarretaram resposta edematogênica máxima em 30 minutos. Um aumento máximo de $57,9 \pm 5,6 \%$, $60,6 \pm 5,7 \%$, $82,5 \pm 2,1 \%$ na espessura da pata foram observados com 7,5, 15 e 60 μg da peçonha, respectivamente. O edema se manteve significativamente elevado até 6 h com 7,5, 24 h com 15 e 72 h com a dose de 60 μg . A figura 7 mostra o curso temporal da formação do edema. Doses maiores analisadas não foram capazes de aumentar de forma significativa a resposta edematogênica induzida pela dose de 60 μg (dados não apresentados).

5.1.2 Atividade Nociceptiva

A figura 8 mostra a curva dose-resposta obtida para o comportamento da atividade nociceptiva induzida por SpV, demonstrando que além da resposta edematogênica local a peçonha do peixe-escorpião também causa intensa nocicepção local. Imediatamente após a injeção os animais apresentaram comportamento característico de nocicepção (ato de lambem e/ou morder a pata injetada). Com exceção da menor dose testada, 7,5 μg , as demais doses induziram uma intensa atividade nociceptiva. Amostras de 15, 30, 60 e 100 μg induziram um alto índice de nocicepção, que foram de $124,5 \pm 29,3$; $129,5 \pm 26,8$; $159,5 \pm 10,8$ e $146,3 \pm 12,2$ segundos respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que não há uma relação desta resposta com a dose, considerando que não há diferença significativa nos índices de nocicepção para doses \geq a 15 μg .

Considerando a intensidade da resposta edematogênica/nociceptiva da dose de 15 μg , esta foi selecionada para todos os ensaios biológicos posteriores.

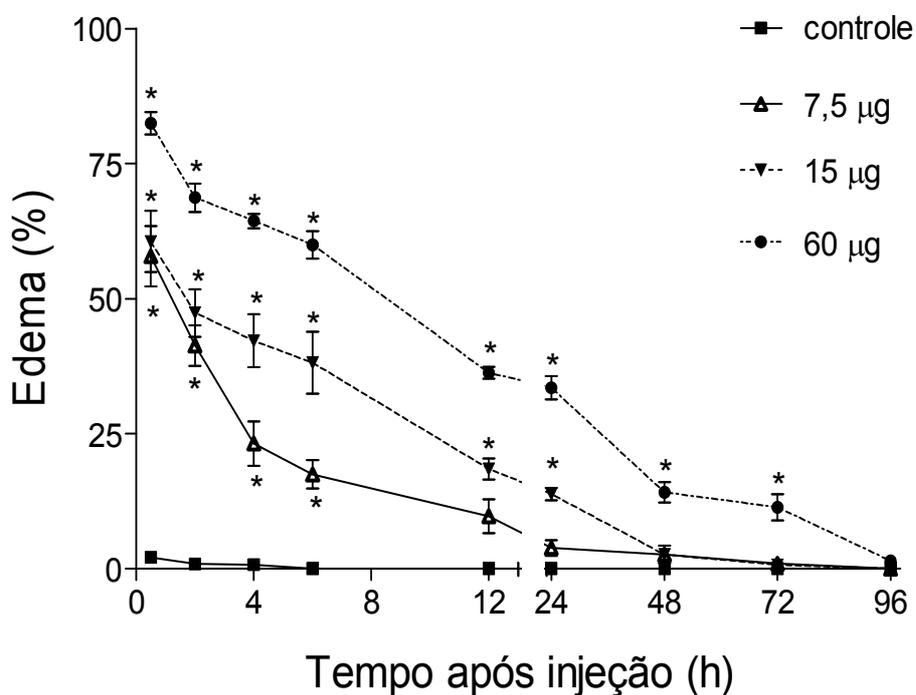


Figura 7: Atividade edematogênica da peçonha do peixe *S. plumieri*. Amostras de SpV contidas em 30 µL de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata antes e após a injeção da peçonha nos tempos estipulados, sendo expresso em porcentagem de aumento da pata. A espessura da pata foi medida com auxílio de um paquímetro digital. Camundongos injetados com PBS estéril foram considerados como grupo controle. Cada ponto representa a média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo-controle, N = 4.

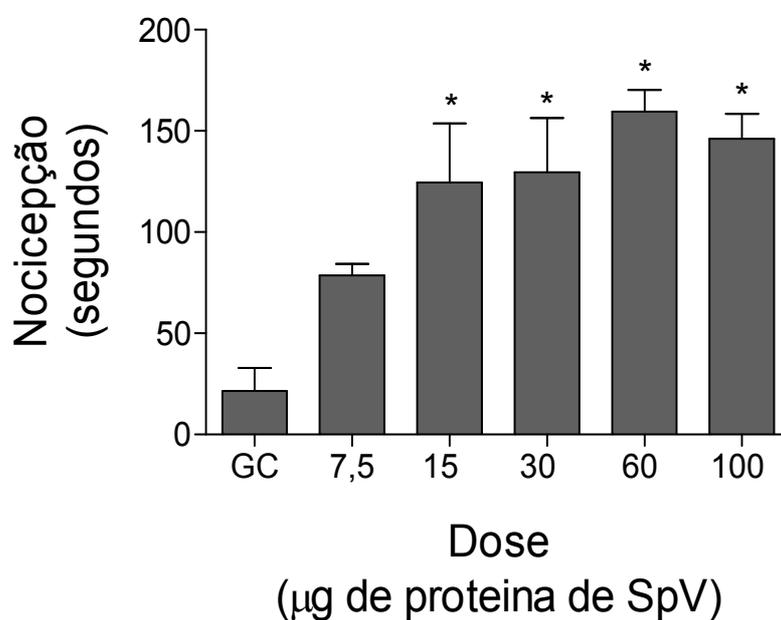


Figura 8: Atividade nociceptiva da peçonha do peixe *S. plumieri*. Amostras de SpV contidas em 30 µL de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O índice de nocicepção foi quantificado pelo tempo em que o camundongo permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante um período de 30 minutos. Camundongos injetados com PBS estéril foram considerados grupo controle (GC). Cada ponto representa a média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo-controle, N = 4.

5.1.3 Avaliação da estabilidade das atividades biológicas

A avaliação da estabilidade das atividades edematogênica e nociceptiva induzidas pela peçonha de *S. plumieri*, foi realizada com o objetivo de estabelecer a condição de armazenamento de SpV na qual acarretasse menor perda destas atividades. Com exceção do armazenamento em nitrogênio líquido (- 196 °C), a estocagem de SpV nas demais temperaturas avaliadas acarretaram perda significativa das atividades biológicas quando comparadas com a atividade da peçonha recém-extraída. O armazenamento a 4 °C causou uma perda 33% na atividade edematogênica e 62% na nociceptiva. Perdas superiores a 80 % destas atividades foram observadas quando SpV foi armazenado a 24 e - 15 °C. O processo de liofilização da solução da peçonha acarretou uma perda parcial de 25% na resposta edematogênica e reduziu drasticamente a nocicepção (95%). Os resultados são mostrados na figura 9.

5.1.4 Estudo da via de formação do edema

Para investigar a via de formação do edema, os animais foram pré-tratados com diferentes drogas anti-inflamatórias. A figura 10 mostra o curso temporal da resposta edematogênica induzida pela injeção de 15 µg da peçonha 30 minutos após a administração dos antiinflamatórios. Um edema de $87,2 \pm 1,5\%$ foi observado no grupo controle positivo (PBS + SpV), enquanto animais do grupo HOE-140 + SpV apresentaram um edema de apenas $40,6 \pm 2,2\%$, demonstrando que o antagonista do receptor B₂ de bradicinina (HOE-140) na dose de 100 nmol/kg bloqueou em ~50% a formação do edema. O pré-tratamento com aprotinina (AP + SpV), um inibidor de serino-proteases, também impediu a formação do edema: o grupo AP + SpV apresentou uma resposta edematogênica 35% menor que o grupo controle positivo. O efeito bloqueador do HOE-140 da aprotinina foram persistentes, observado até 24 horas para HOE-140 e 12 horas para a aprotinina.

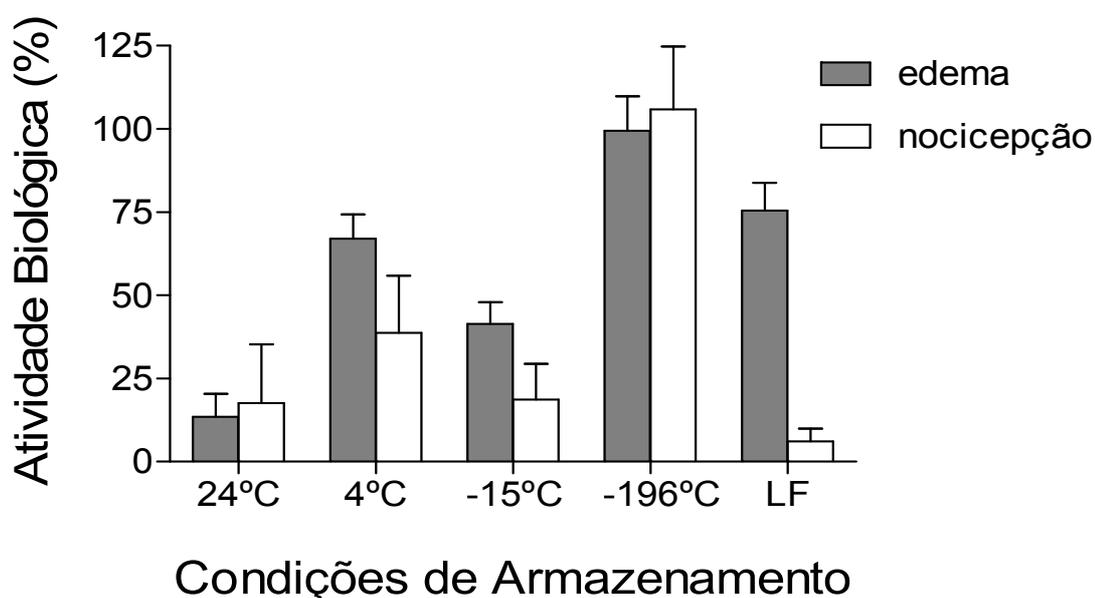


Figura 9: Avaliação da estabilidade das atividades biológicas da peçonha do peixe *S. plumieri*. Amostras de SpV foram armazenadas em diferentes condições (24°C, 4°C, -15°C, -196°C) e liofilizada (LF). Após 80 horas, as atividades edematogênica e nociceptiva das amostras foram avaliadas e comparadas com aquelas obtidas da peçonha recém-extraída. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata traseira direita antes e após 30 minutos da injeção da peçonha (15 µg), sendo expresso em porcentagem de aumento da pata. O índice de nocicepção foi quantificado pelo tempo em que o camundongo permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante um período de 30 minutos. Camundongos injetados com PBS estéril foram considerados grupo controle. Cada ponto representa a média ± EPM em porcentagem de atividade inflamatória, comparado com a atividade de SpV recém-extraído (100%).

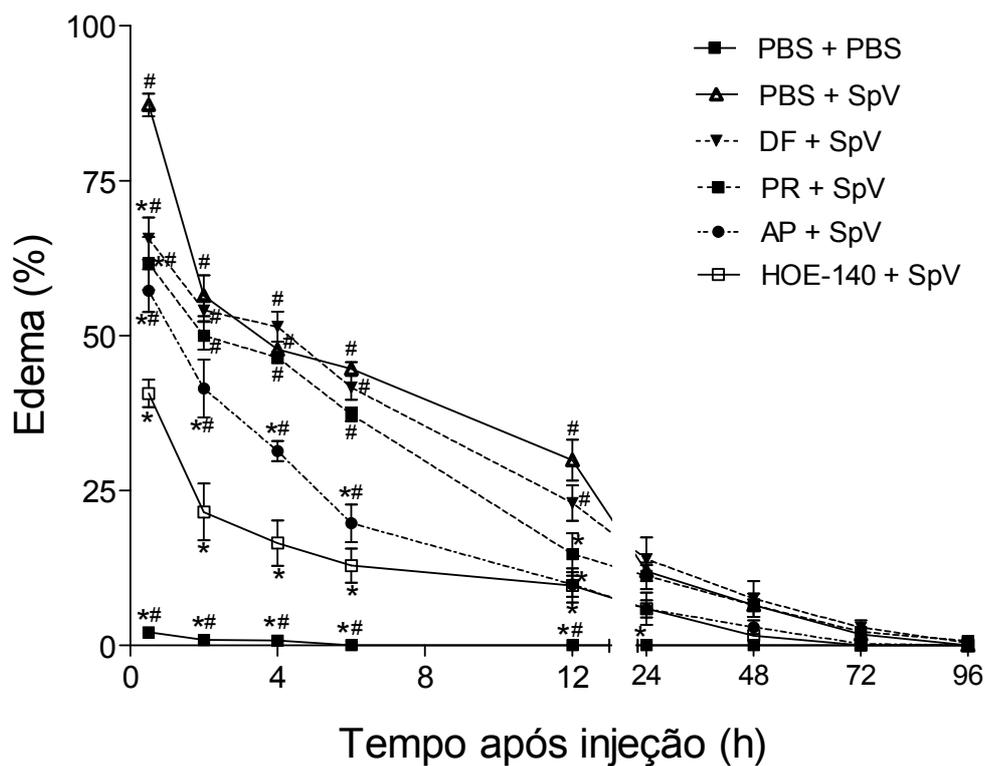


Figura 10: Estudo da via de formação do edema induzido pela peçonha de *S. plumieri*. Diferentes grupos de camundongos foram pré-tratados via i.p. com: 1 mg/Kg de diclofenaco de sódio (DF), 1 mg/Kg de prometazina (PR), 8 mg/Kg de aprotinina (AP) e 100 η mol/Kg de HOE-140 (HOE-140). Trinta minutos após, 15 μ g de proteína de SpV em 30 μ L de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata injetada antes e após a injeção da peçonha nos tempos determinados, sendo expresso em porcentagem de aumento da pata. Cada ponto representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo PBS + SpV e # $p < 0,05$ comparado com o grupo HOE-140 + SpV.

5.1.5 Análise histopatológica

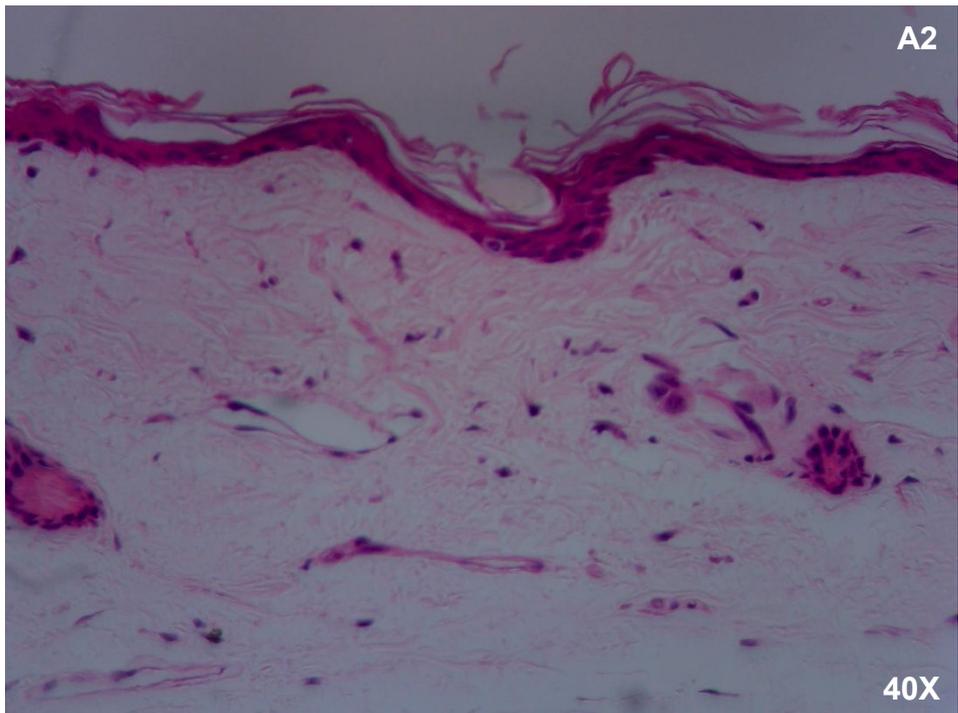
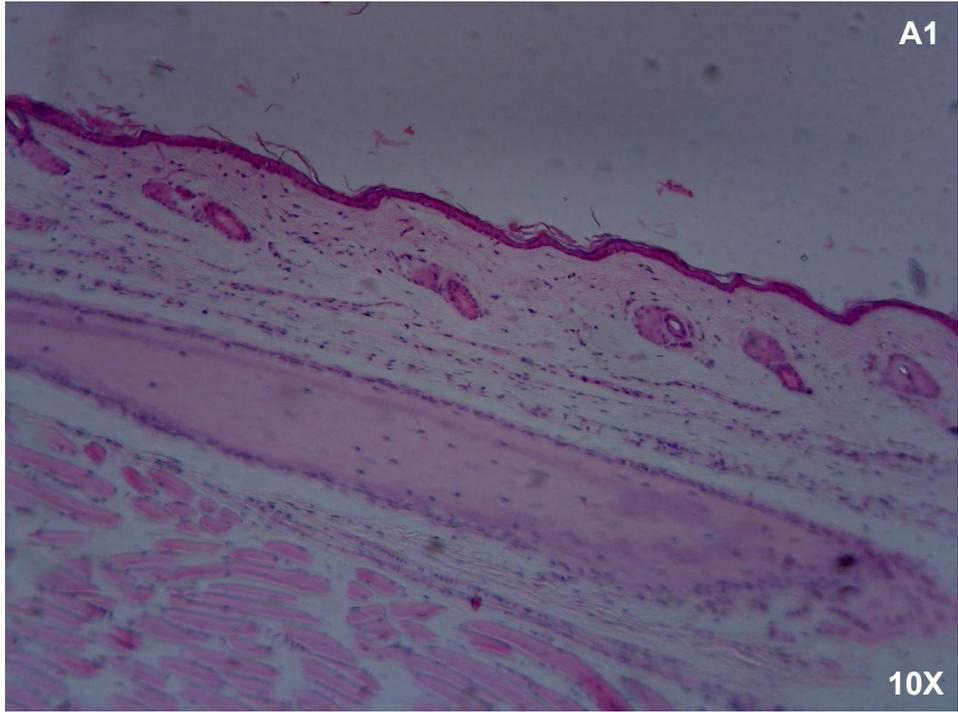
A análise histopatológica foi realizada nos tecidos das patas de camundongos injetadas com 15 µg da peçonha bruta. A figura 11 mostra o corte histológico das patas em diferentes tempos após injeção.

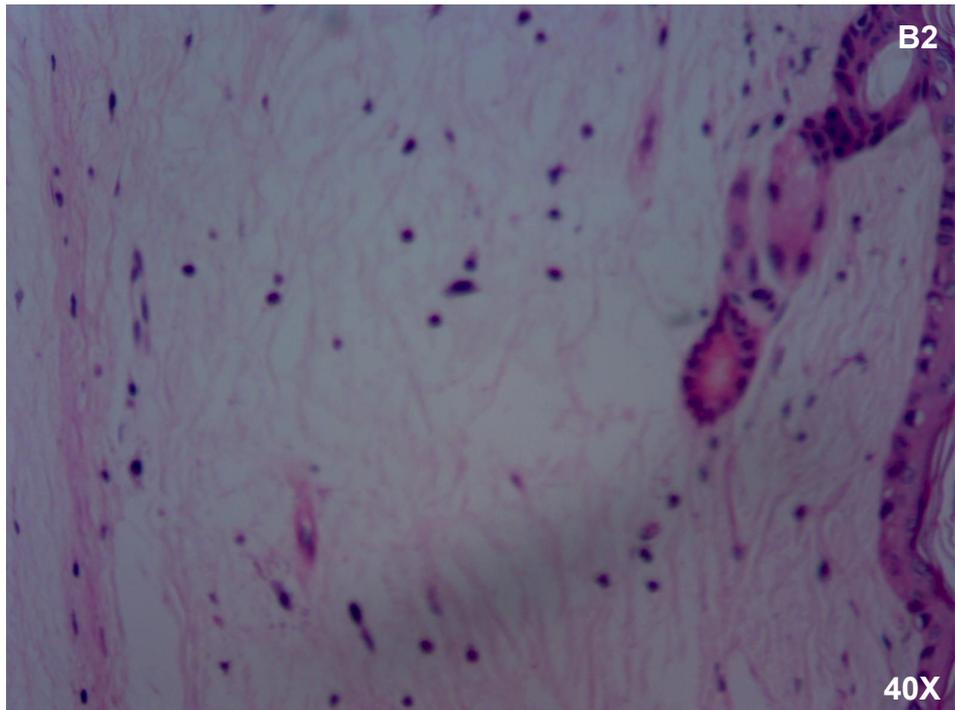
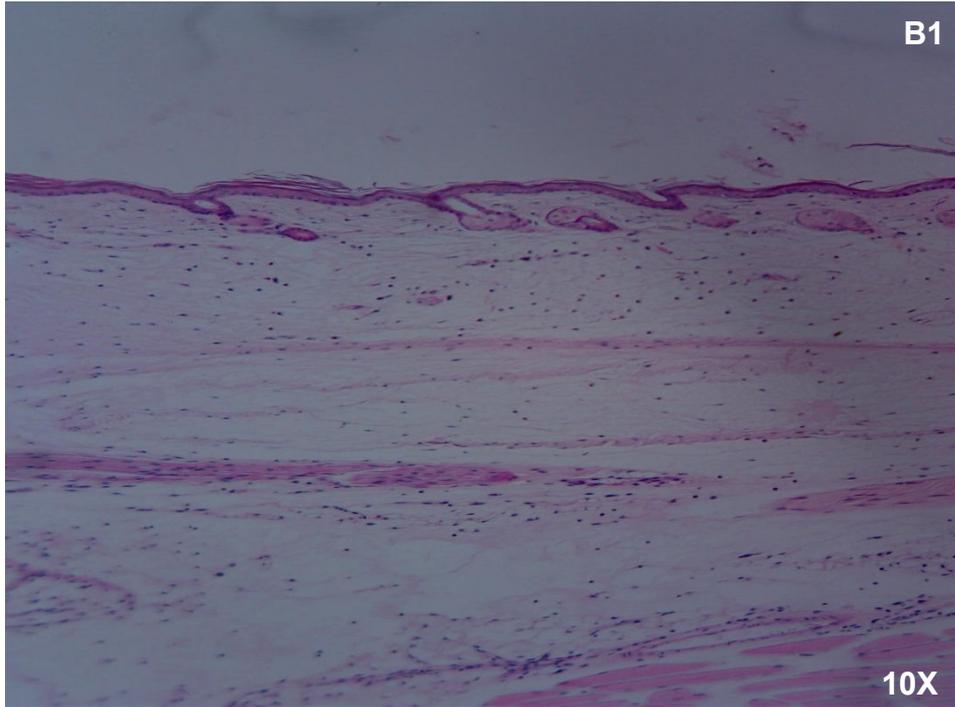
Após 30 minutos da injeção é possível observar no corte histológico (fig. 11 B1, B2) acentuado edema da derme com presença de raros leucócitos. Os vasos sanguíneos, principalmente as vênulas, se mostraram dilatados e alguns apresentaram hiperemia. As mudanças patológicas observadas nas lâminas após 2 horas (fig. 11 C1, C2) são semelhantes àquelas vistas 30 minutos após a injeção, porém com um discreto aumento no número de leucócitos na derme.

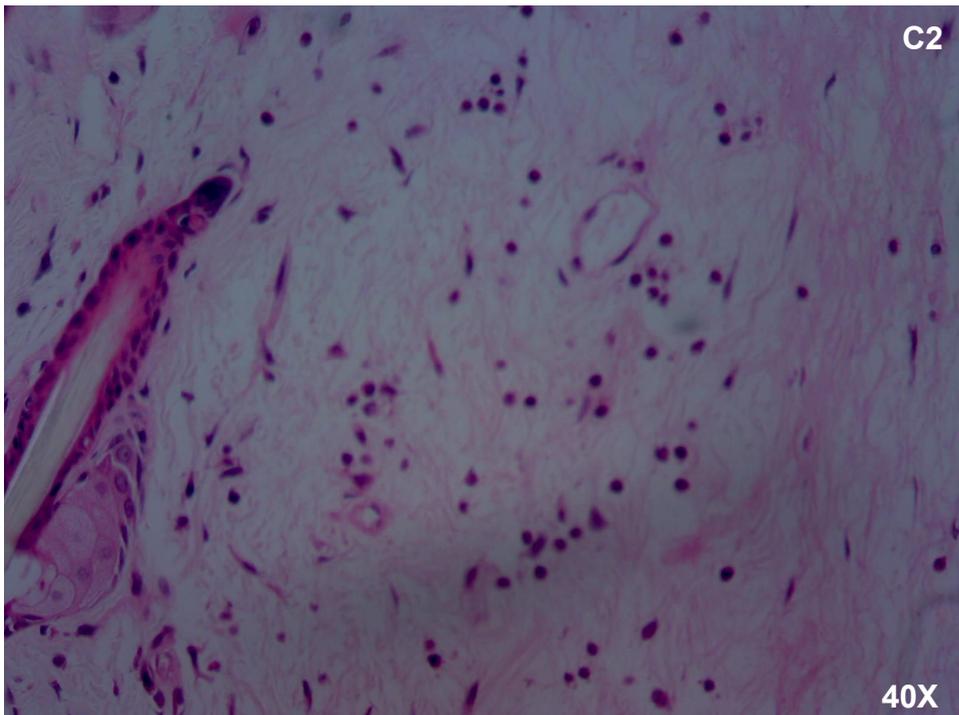
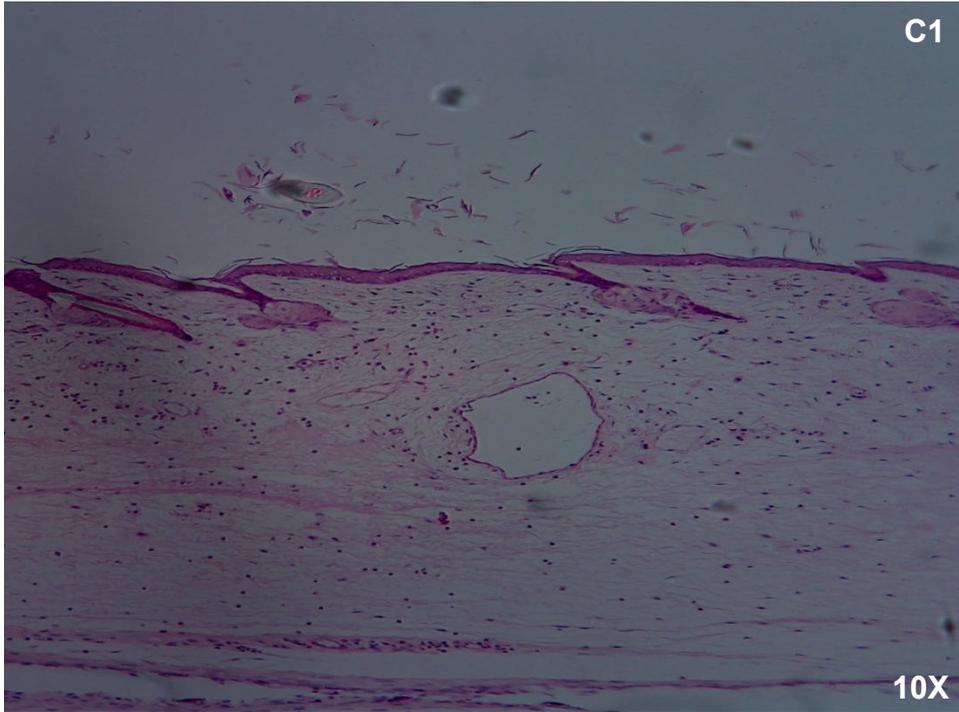
Entretanto, o corte histológico das patas dos camundongos 6 horas após a injeção (fig. 11 D1, D2), revelou a presença sustentada do acentuado edema da derme e uma intensa exudação leucocitária, com predomínio de neutrófilos. É possível observar também uma alta leucocitose intra-vascular e marginalização das células de defesa.

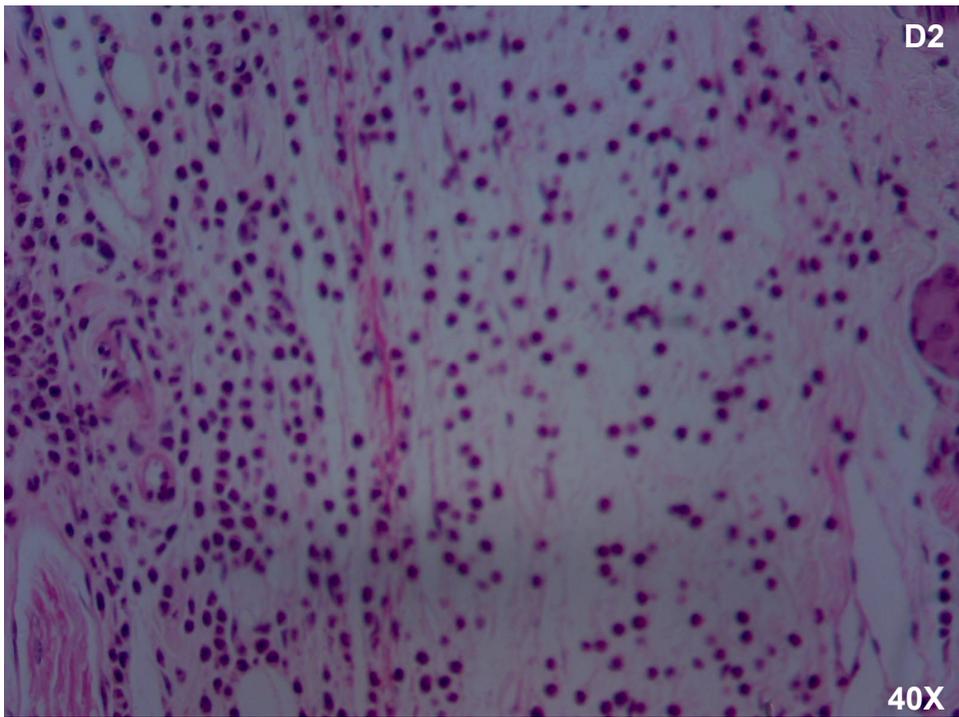
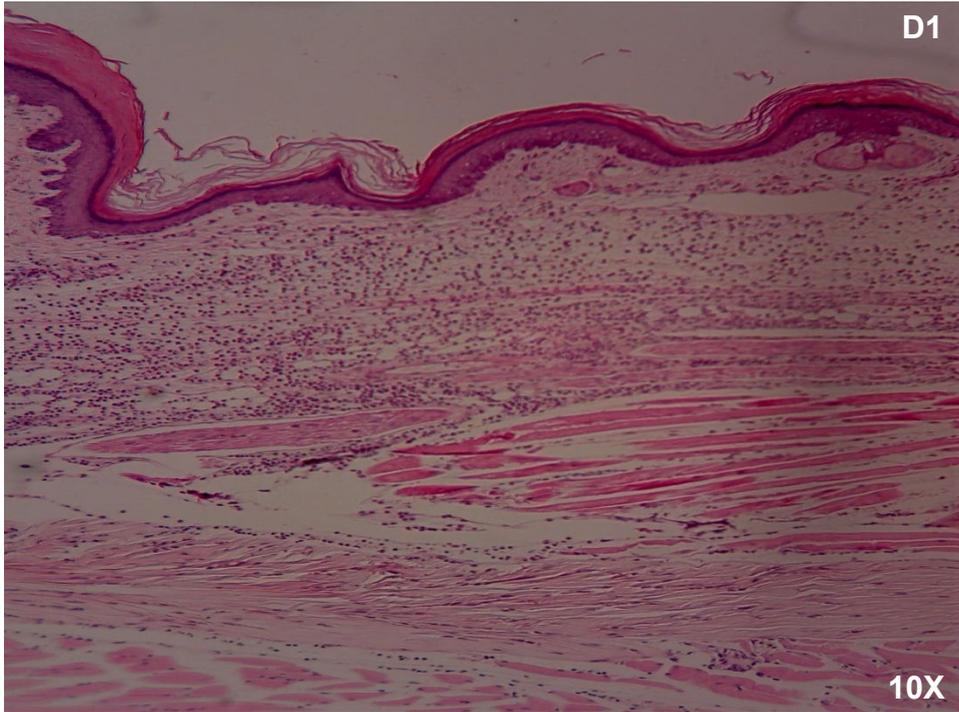
Após 12 horas da injeção, o quadro histológico ainda revela a presença de edema e abundante exudato celular com predomínio de neutrófilos com infiltrado inflamatório mononuclear (fig. 11 E1, E2). O processo inflamatório difuso se estende por toda a derme e infiltra na musculatura esquelética, na qual é possível observar ainda, raros e pequenos focos hemorrágicos. Após 24 horas (fig. 11 F1, F2), há uma redução no edema e o infiltrado inflamatório assume um padrão mais compacto, ainda com predomínio de neutrófilos, entretanto a proporção de células mononucleadas aumentou em relação ao quadro visto no corte da pata 12 horas após a injeção. O corte histológico da pata após 48 horas da injeção (fig. 11 G1, G2), apresenta um edema discreto e o exudato inflamatório é majoritariamente composto por células mononucleares, que se concentram apenas na região da derme.

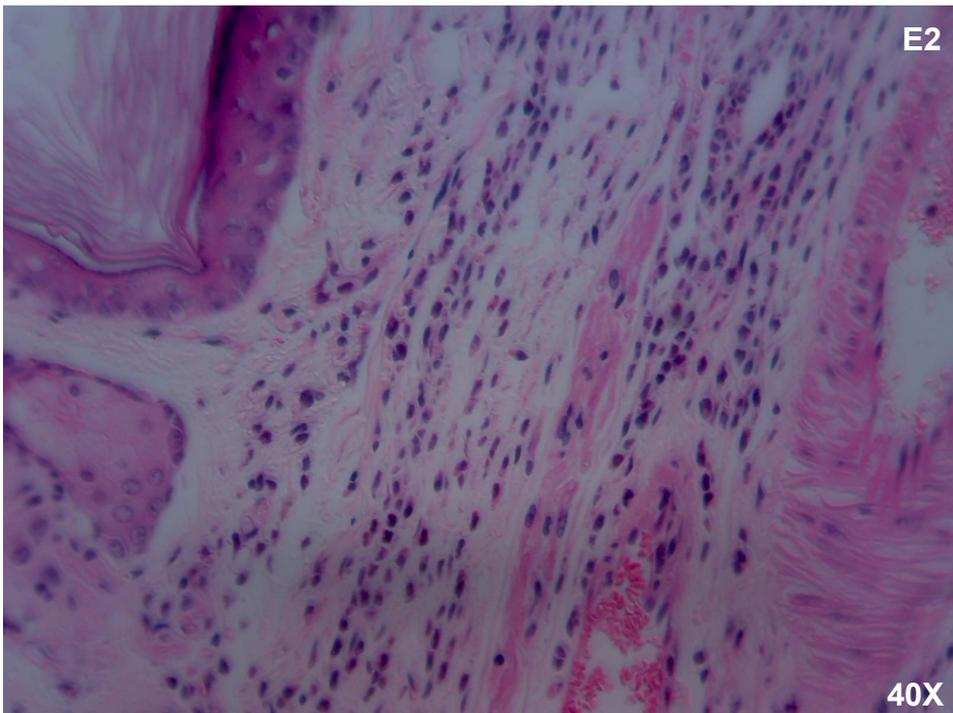
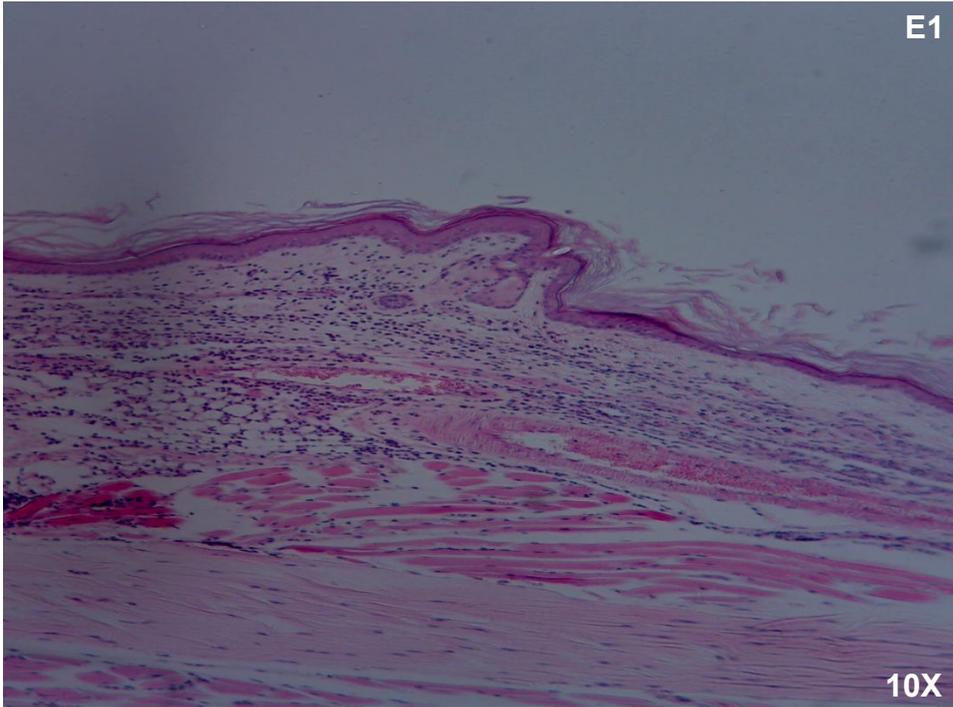
O corte histológico da pata do grupo controle apresentou uma integridade tecidual 30 minutos após a injeção do veículo da peçonha (PBS). Nota-se ausência de edema na região da derme e presença de raros leucócitos no tecido (fig. 11 A1, A2).

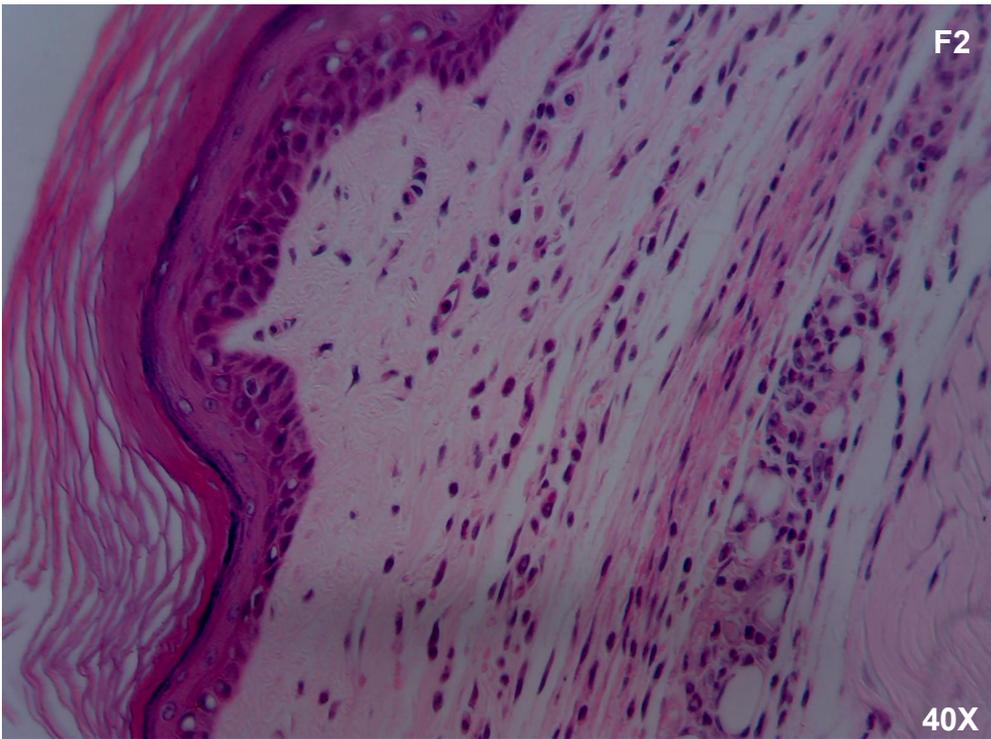
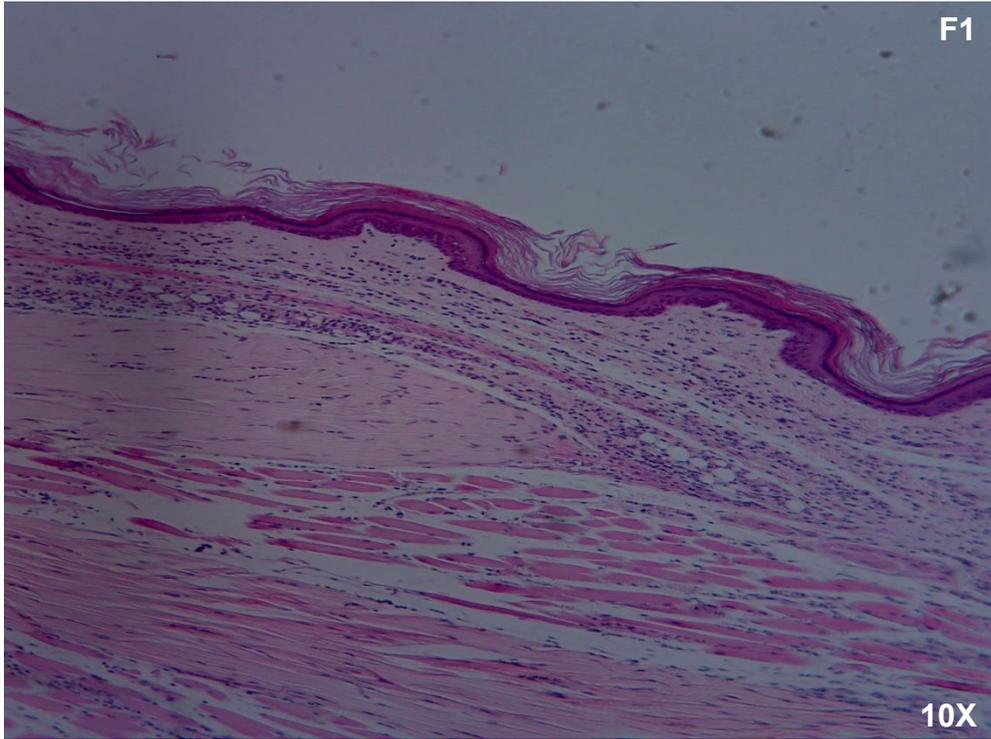












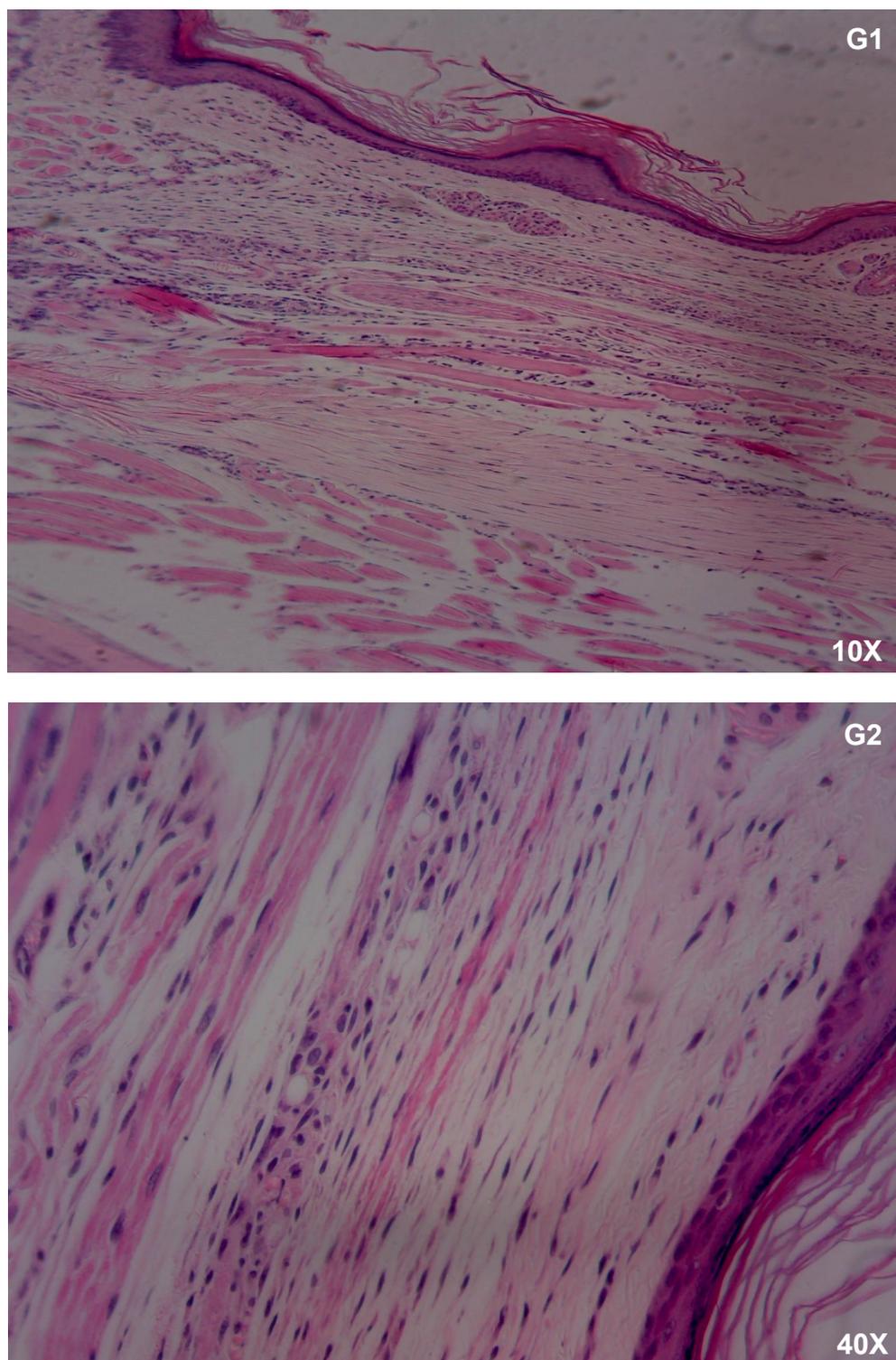


Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos. Lâminas de cortes histológicos da pata traseira direita de camundongos em vários tempos após injeção de 15 μ g da peçonha do peixe *S. plumieri* (SpV), coradas com Hematoxilina e Eosina. (A) Controle – injeção de 30 μ L de PBS, (B) após 30 min, (C) após 2h, (D) após 6h, (E) após 12h, (F) após 24h, (G) após 48h da injeção da peçonha. As análises foram feitas com objetivas de 10 e 40X.

5.1.6 Níveis de citocinas pró-inflamatórias eliciadas pela peçonha do peixe S. plumieri

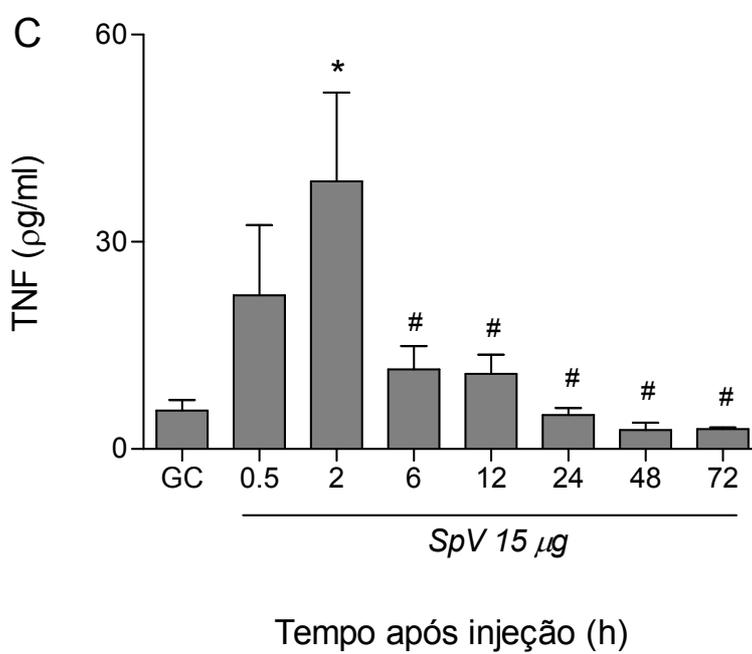
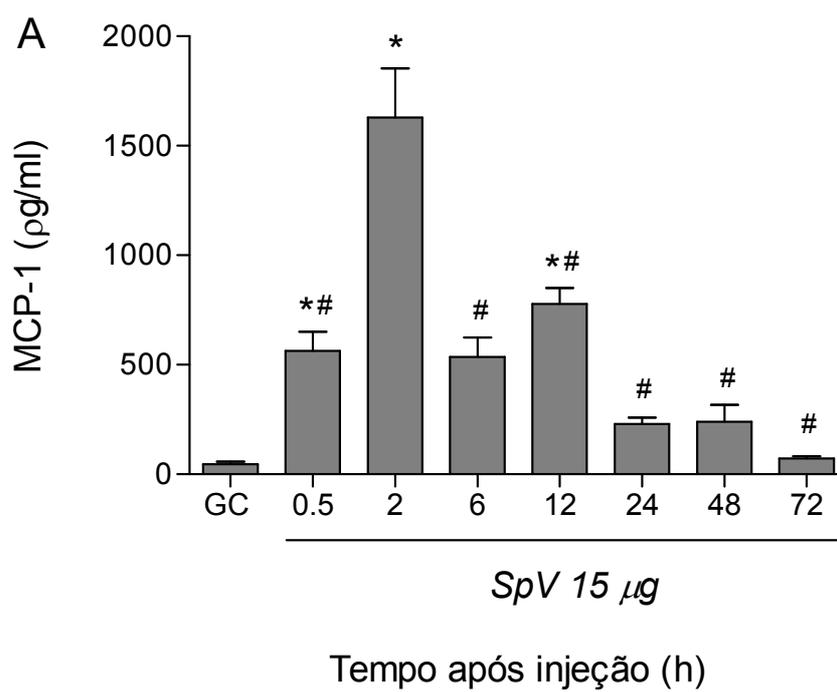
A produção de citocinas pró-inflamatórias foi avaliada pela dosagem dos níveis do Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α), das Interleucinas 6, 10 e 12p70 (IL-6, IL-10 e IL-12p70), do Interferon - gama (IFN- γ) e pela produção de uma quimiocina, a Proteína Quimioatraente de Monócitos, tipo 1 (MCP-1) nos homogenatos de patas injetadas com 15 μ g da peçonha. Um aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e MCP-1 foi detectado nestes homogenatos.

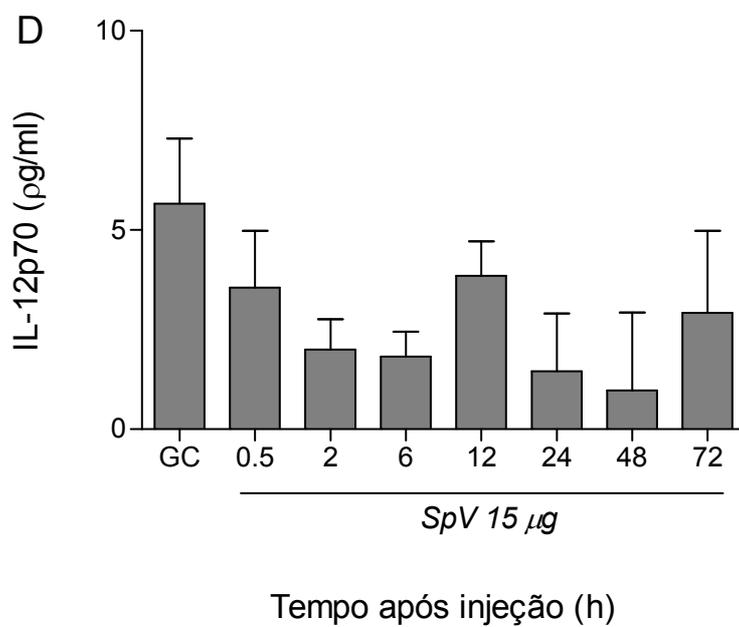
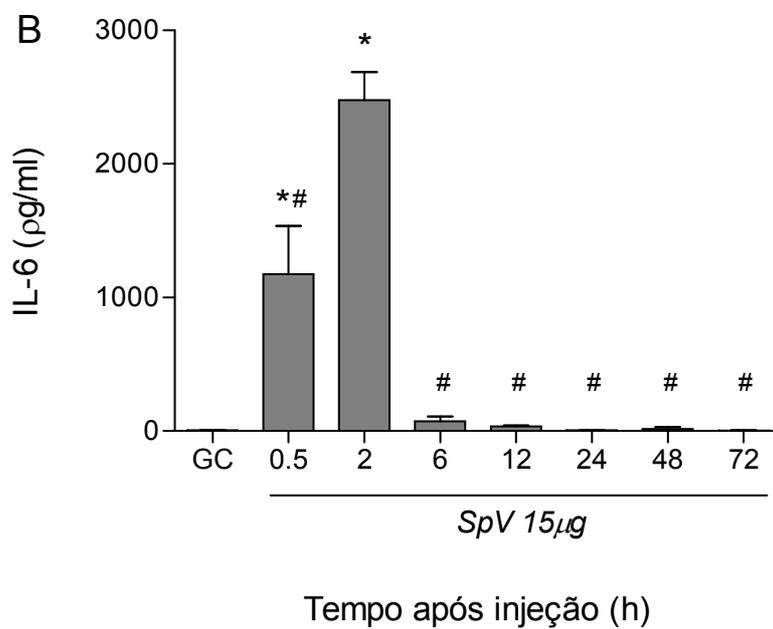
Alta produção de MCP-1 e IL-6 foi detectada 30 minutos após a injeção da peçonha (~ 565 e 1170 pg/mL respectivamente), sendo que o maior nível destas citocinas foi encontrado após 2 horas (~ 1600 e 2470 pg/mL respectivamente). Os níveis encontrados posteriormente foram semelhantes aos do grupo controle. A peçonha também induziu um aumento significativo na liberação de TNF, o qual foi detectado apenas 2 horas após a injeção (~ 38 pg/mL). Não foram detectadas diferenças nos níveis de IL-12p70, IL-10 e IFN quando comparado ao grupo controle (fig. 12).

5.2 Purificação da fração protéica responsável pela atividade edematogênica

5.2.1 Primeira Etapa - Fracionamento da peçonha de S. plumieri por cromatografia de filtração em gel convencional

Uma cromatografia de filtração molecular em sistema convencional foi utilizada como passo inicial da purificação e originou seis grupos protéicos principais (F1-F6, fig. 13). A atividade edematogênica estava associada a três frações protéicas (F2, F3 e F6), considerando a maior quantidade de material e também a maior potência em induzir a formação do edema, a fração 2 (F2) foi selecionada para dar continuidade ao processo de purificação. Um μ g de SpV induz um aumento de 4% na espessura da pata do camundongo em 30 minutos (figura 7) enquanto F2 induz 16% de aumento (destaque da figura 13).





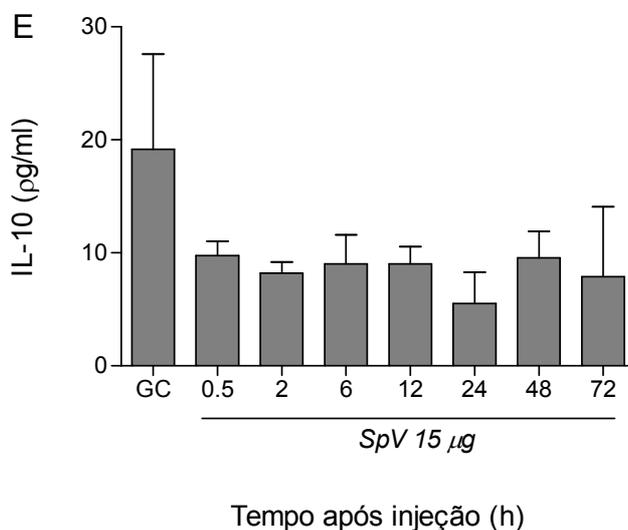
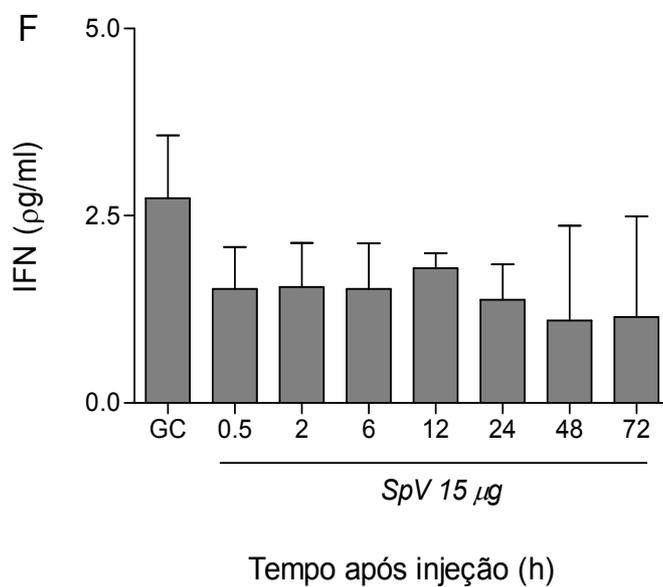


Figura 12: Níveis de citocinas no homogenato de patas de camundongos após a injeção da peçonha de *S. plumieri*. Amostras de 15 µg de proteína do SpV foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. Nos tempos 0,5, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 h após a injeção, os animais foram sacrificados, as patas amputadas e processadas para obtenção do homogenato. Seis citocinas foram dosadas: (A) MCP-1, (B) IL-6, (C) TNF, (D) IL-12p70, (E) IL-10 e (F) IFN. Os dados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 comparado com grupo controle e #p<0,05 comparado com o grupo 2 h.

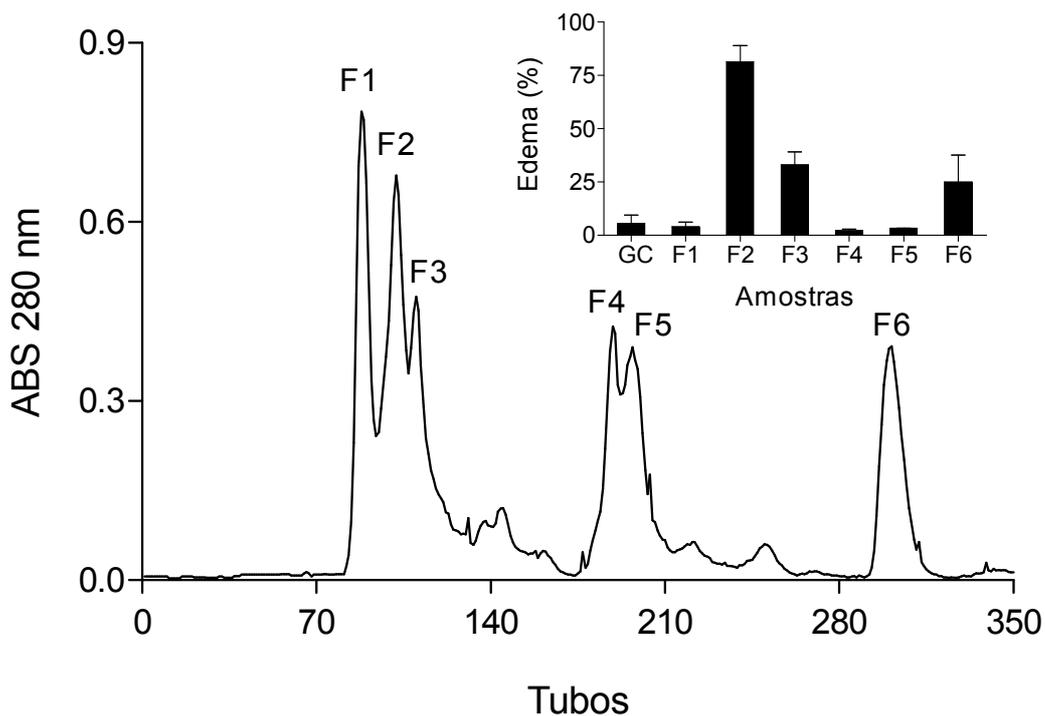


Figura 13: Perfil cromatográfico da filtração em gel da peçonha do peixe *S. plumieri*. Coluna Sephacryl S 200 HR (2,0 x 120 cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,4 M a 4°C. Amostra: SpV (43,2 mg de proteínas). Fluxo de ~ 7 mL/h com frações de 1,75 mL/tubo. O conteúdo protéico do eluato foi detectado pela leitura da absorbância a 280 nm. Em destaque, mapeamento da atividade edematogênica induzida pelas frações eluídas. O edema de local foi quantificado de acordo com metodologia descrita no item 4.4.1, usando 5ug de proteína de cada fração e avaliado após a injeção.

5.2.2 Segunda etapa - Cromatografia de troca iônica em sistema de alta resolução

A fração selecionada na filtração molecular (F2) foi posteriormente fracionada por cromatografia de troca aniônica, em coluna Eprogen Q SAX em sistema de alta resolução (HPLC), o que resultou em 4 subfrações protéicas principais (figura 14). A atividade edematogênica estava associada principalmente a subfração 2 (SF2).

5.2.3 Análise da homogeneidade e estimativa da massa molecular

O perfil eletroforético da peçonha bruta e das frações de interesse (F2 e SF2), obtidas nas cromatografias de filtração molecular e troca aniônica está mostrado na figura 15. O menor número de bandas no perfil protéico das amostras obtidas nas etapas de fracionamento, demonstraram que estas cromatografias foram efetivas em aumentar a pureza da fração edematogênica da peçonha. Pode também ser observado a intensificação de uma banda, com migração equivalente a ~90 kDa, durante o processo de fracionamento.

5.3 Neutralização das atividades edematogênica e nociceptiva induzida pela peçonha de *S. plumieri* pelo soro contra a peçonha do peixe-pedra (*stonefish antivenom* - SFAV)

5.3.1 Ensaio *in vivo*

A capacidade protetora do *Stonefish Antivenom* (SFAV) contra as atividades edematogênica e nociceptiva da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri* foi avaliada. A pré-incubação desta peçonha (SpV) com SFAV foi capaz de neutralizar substancialmente estes efeitos *in vivo*. A intensidade do efeito protetor foi dependente da relação μg de SpV / U de SFAV (fig. 16).

A indução de edema e nocicepção foram reduzidas em $90,3 \pm 1,6 \%$ e $90,8 \pm 1,2 \%$ na proporção de 1/1 e $97,1 \pm 1,7 \%$ e $94,8 \pm 2,2 \%$ na proporção de 1/1,5, respectivamente.

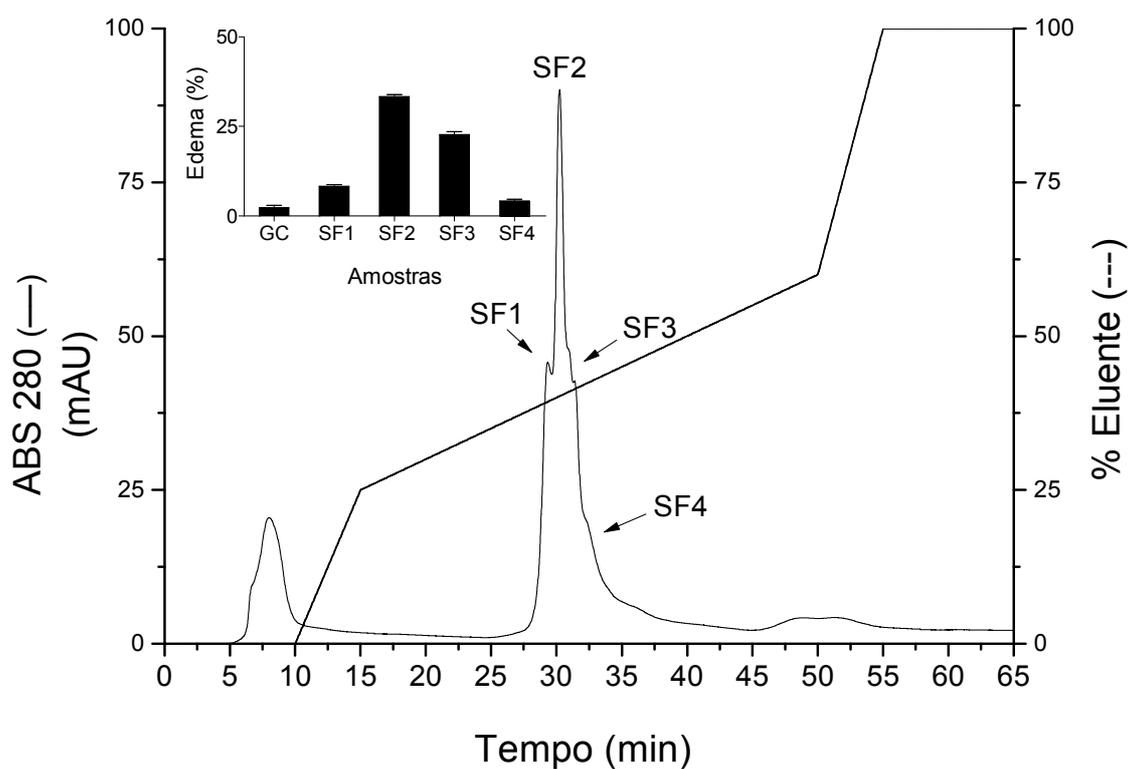


Figura 14: Perfil da cromatografia de troca aniônica da fração edematogênica obtida na filtração. Coluna Eprogen Q *Strong Anion-Exchange* (250 X 4.6 mm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,1 M e eluída com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 1 M. Amostra: 150 µg de proteínas de F2. Fluxo de 0,5 ml/min. O conteúdo protéico do eluato foi detectado pela leitura da absorbância a 280 nm. Em destaque, mapeamento da atividade edematogênica. O edema local foi quantificado de acordo com o item 4.4.1, usando 4 µg de proteína de cada subfração e avaliado após 30 minutos.

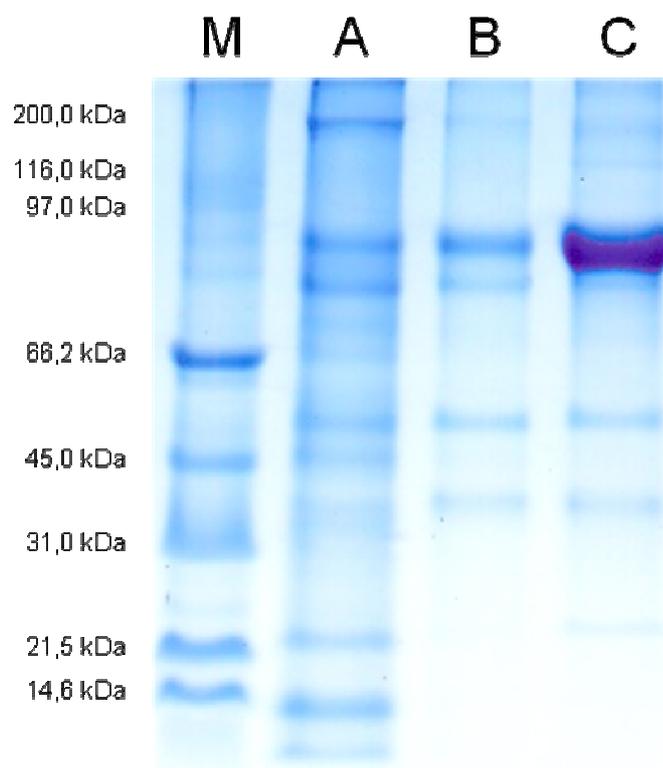


Figura 15: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da peçonha de *S. plumieri* e das frações obtidas nas etapas de purificação. Gel: 8% de acrilamida. (A) peçonha bruta de *S. plumieri*, 20 µg; (B) F2, 10 µg; (C) SF2, 10 µg. As bandas protéicas foram reveladas com azul de Coomassie. Os marcadores protéicos (M) utilizados foram: miosina (200 kDa), β-galactosidade (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soro-albumina bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) e lisosima (14,6 kDa).

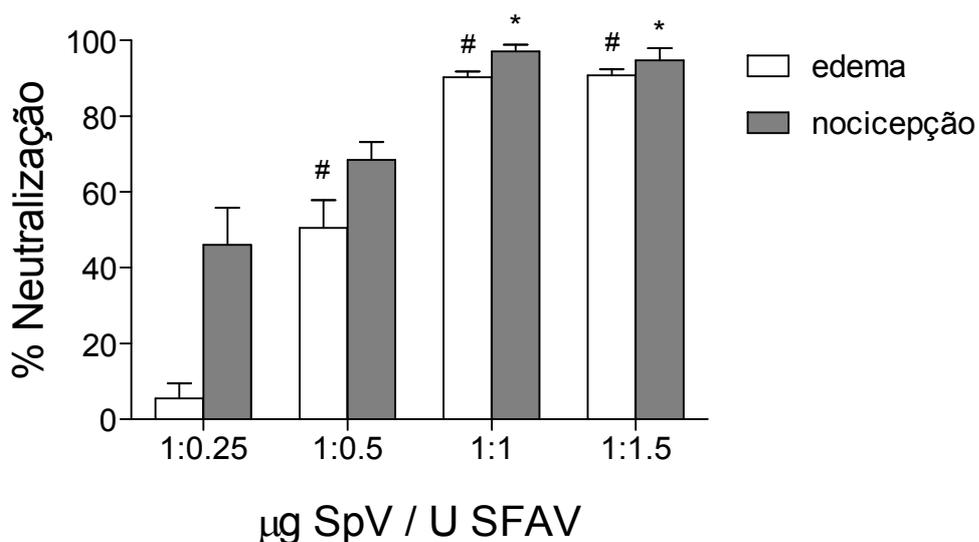


Figura 16: Neutralização da atividade edematogênica e nociceptiva da peçonha de *S. plumieri* com o SFAV. Amostras de 15 µg do SpV foram pré-incubadas com diferentes proporções de SFAV por 30 minutos; em seguida a mistura foi injetada (via i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata traseira direita antes e após 30 minutos da injeção da peçonha. O índice de nocicepção foi quantificado pelo tempo em que o camundongo permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante um período de 30 minutos. O percentual de neutralização foi calculado em relação ao grupo injetado apenas com SpV. [#]/^{*}p<0,05 comparado com o grupo 1:0,25.

5.3.2 Ensaio *in vitro*

Para verificar a reatividade cruzada entre a peçonha de SpV e SFAV foi realizada análise de reconhecimento de proteínas presentes no SpV pelos anticorpos desenvolvidos contra peçonhas de peixes-pedra por *immunoblotting*.

As proteínas da peçonha de *S. plumieri* foram separadas por eletroforese bidimensional, cuja eletrofocalização foi primeiramente realizada numa faixa de pH de 3 a 10 (fig.17A). Posteriormente uma melhor resolução foi obtida usando a faixa de pH de 4 a 7 (fig.17B), a qual foi utilizada para a análise da reatividade cruzada de SpV e SFAV pelo método *Western blotting*. Apenas algumas proteínas com massa molecular aparente em torno de 98 kDa e pI entre 6 e 7, foram reconhecidas pelo soro anti-Synanceja (Fig. 17C).

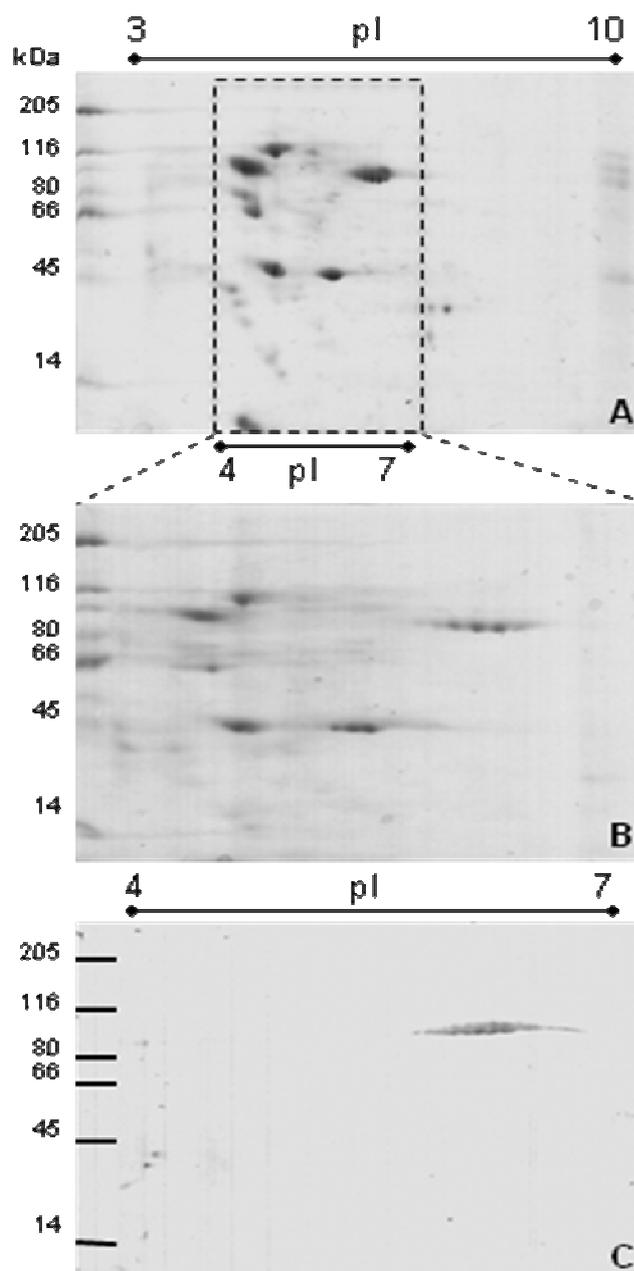


Figura 17: Perfil protéico da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri* (SpV) e reatividade cruzada com o *stonefish antivenom* (SFAV) . A focalização isoeétrica foi realizada com 100 µg de proteína de SpV. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 10%, corado com coomassie G-250. (A) Gel bidimensional utilizando *strip* com pH de 3 a 10. (B) Gel bidimensional utilizando *strip* com pH 4 e 7. (C) *Western blotting* da peçonha de *S. plumieri* (SpV) utilizando o *stonefish antivenom* (SFAV).

6 DISCUSSÃO

O interesse na procura de novas drogas colocou os venenos animais como umas das mais promissoras fontes de compostos bioativos naturais. Os venenos dos animais evoluíram nos sentidos predatórios e de defesa, o que contribuiu para desenvolvimento de moléculas que afetam funções fisiológicas vitais de suas vítimas/presas. Os componentes destes se ligam com alta eficácia a alvos específicos no organismo acometido, desde canais iônicos presentes em tecidos excitáveis até estruturas diversas/complexas dos sistemas cardiovascular e respiratório. Estes componentes isolados constituem instrumento efetivo para manipular sistemas fisiológicos podendo originar modelos de novos compostos químicos/farmacêuticos, e também têm contribuído significativamente para o avanço do conhecimento básico dos processos e/ou etapas que participam de respostas fisiológicas. Além disto, a identificação e investigação de seus efeitos auxiliam na compreensão da sintomatologia decorrente de acidentes pelos animais venenosos, podendo auxiliar no desenvolvimento de terapias eficazes.

Como já descrito anteriormente, a bioprospecção de venenos tem sido realizada principalmente em venenos/peçonhas de animais terrestres (serpentes, escorpiões e aranhas). Entretanto, quando comparado a estes, o estudo de peçonhas de peixes está apenas se iniciando.

Diferente do que acontece nos envenenamentos, com cobras, aranhas e escorpiões que podem levar ao óbito, poucas espécies de peixes peçonhentos são capazes de levar a óbitos humanos. Entretanto o envenenamento causado por estes peixes produzem severas desordens locais e/ou sistêmicas (Church e Hodgson, 2002a), que representam um problema de saúde pública e acarretam problemas sócio-econômicos uma vez que podem ser provisoriamente incapacitantes, mantendo a vítima afastada do trabalho por dias ou semanas (Haddad Jr., 2003).

Este trabalho contribuiu para a caracterização química e farmacológica inicial de um dos efeitos mais marcantes (resposta inflamatória) induzidos pela peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*.

6.1 Estudo da atividade edematogênica e nociceptiva da peçonha de *S. plumieri*

O desenvolvimento de edema local é uma característica comum em envenenamentos ocasionados por animais peçonhentos de diferentes filos. Atividade edematogênica foi descrita em envenenamentos com peçonhas/frações das serpentes *Bothrops asper* (Gutierrez *et al.*, 1980) e *Lachesis muta muta* (Ferreira *et al.*, 2009), do escorpião *Tityus serrulatus* (Nascimento *et al.*, 2005), da lagarta *Lonomia obliqua* (Bohrer *et al.*, 2006), da abelha *Apis mellifera* (Brigatte *et al.*, 2010), das aranhas *Phoneutria nigriventer* (Costa *et al.*, 1997) e *Loxosceles gaucho* (Barbaro *et al.*, 2010), das arraias *Potamotrygon* cf. *scobina* e *Potamotrygon* gr. *orbigny* (Maganhães *et al.*, 2006) e dos peixes *Synanceja horrida* (Poh *et al.*, 1991), *Thalassophryne maculosa* (Sosa-Rosales *et al.*, 2005) e *Scatophagus argus* (Sivan *et al.*, 2007). No Brasil, estudos experimentais de caracterização da resposta inflamatória local induzida por venenos/peçonhas de peixes, somente foram realizados com peçonhas de peixes dos gêneros *Thalassophryne* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998, 2004; Lima *et al.*, 2003; Pareja-Santos *et al.*, 2008; Sosa-Rosales *et al.*, 2005), *Cathorops* (Junqueira *et al.*, 2007) e *Potamotrygon* (Magalhães *et al.*, 2005).

Apesar da atividade edematogênica e da dor local já terem sido descritas por Haddad Jr. *et al.* (2003) em envenenamento humanos causado pela peçonha do peixe escorpião brasileiro *S. plumieri*, esses sinais e sintomas ainda não foram experimentalmente descritos. Estes autores descreveram que em 61% dos casos estudados, os indivíduos apresentaram edema severo no local da injúria podendo persistir por um mês após o acidente (fig. 18); e dor intensa local foi relatada em 100% dos casos.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho demonstraram que peçonha de *S. plumieri* induz um edema local intenso e comportamento característico de nocicepção. A injeção da peçonha nos animais induziu uma resposta edematogênica com todas as doses testadas e o pico máximo dessa atividade foi alcançado após 30 minutos. Doses de 7,5, 15 e 60 µg induzem um aumento máximo na espessura da pata de 58,9, 60,6 e 82,5% e persistência de 6, 24 e 72 horas respectivamente. Estes resultados demonstram que tanto a intensidade do edema quanto sua persistência são dose-dependentes. Resultados semelhantes foram descritos experimentalmente para peçonhas dos peixes *T. nattereri* (Lima *et al.*, 2003) e *S. argus* (Sivan *et al.*, 2007).



Figura 18: Edema na mão esquerda desenvolvido por indivíduo envenenado pelo peixe-escorpião *S. plumieri*. Mão de um pescador de 20 anos de idade após cinco perfurações nos dedos da mão esquerda pelos espinhos dorsais do peixe. Imagem coletada 1 hora após o envenenamento. Note o intenso edema desenvolvido. Fonte: Haddad Jr. *et al.* (2003).

Assim como descrito para peçonhas dos peixes dos gêneros *Thalassophryne* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998 e Sosa-Rosales *et al.*, 2005) e *Potamotrygon* (Magalhães *et al.*, 2006), a peçonha de *S. plumieri* também causa intensa nocicepção local. Imediatamente após a injeção da peçonha (doses de 15, 30, 60 e 100 µg) os animais apresentaram comportamento característico de nocicepção. Entretanto os índices de nocicepção destas doses não foram estatisticamente diferentes. É importante ressaltar que apesar do índice da dose de 7,5 µg não ser estatisticamente diferente do grupo controle, esse índice possui relevância biológica, uma vez que há uma evidente tendência no aumento após a administração dessa dose.

Os índices de nocicepção descritos para a peçonha do peixe *T. maculosa* por Sosa-Rosales *et al.*, 2005, demonstram que essa peçonha é mais potente que a do *S. plumieri* em induzir a nocicepção. Doses de 15 a 100 µg da peçonha de *S. plumieri* e *T. maculosa* respectivamente apresentaram valores de ~140 e 225 segundos para o índice de nocicepção.

6.2 Avaliação da estabilidade das atividades biológicas

A extrema labilidade das atividades biológicas também é uma característica comum de peçonhas de peixes. Algumas dessas atividades são extremamente sensíveis a variações de pH, concentração de sais e temperatura, liofilização, congelamentos e descongelamentos sucessivos (Schaeffer *et al.*, 1971) além da diluição das amostras (Chhatwal e Dreyer, 1992) *apud* (Figueiredo *et al.*, 2009). Esta instabilidade representa um grande obstáculo para o estudo de peçonhas de peixes, retardando a produção de dados sobre estas peçonhas.

Nesse contexto, a peçonha de *S. plumieri* não é exceção. Estudos anteriores demonstraram que ocorrem perdas consideráveis das propriedades cardiovascular, tóxica e hemolítica apenas algumas horas após a extração, mesmo quando a solução da peçonha é estocada em baixas temperaturas (4 e - 20 °C) ou liofilizada (Carrijo *et al.*, 2005).

Para maior confiabilidade dos nossos dados, a labilidade das atividades estudadas foi avaliada e foi demonstrado que o armazenamento de SpV a - 196 °C é efetivo em manter integralmente as atividades de indução de edema e nocicepção. A

estocagem à 4 °C, mantém respectivamente 67,1% e 38,7% da atividade edematogênica e nociceptiva. Entretanto as outras condições testadas (24 °C, -15 °C e liofilizado) acarretam perdas maiores dessas atividades. Dessa forma, o nitrogênio líquido foi escolhido como forma de armazenamento das amostras da SpV utilizadas neste estudo.

A termolabilidade das atividades edematogênica e nociceptiva das peçonhas de *P. cf. scobina* e *P. gr. Orbigny* foi demonstrada pela perda gradual dessas atividades com o aumento da temperatura de armazenamento das amostras de -70 °C para temperatura ambiente, 37 e 56 °C (Magalhães *et al.*, 2006). Schaeffer *et al.* (1971) demonstraram que houve diminuição da atividade letal quando amostras da peçonha de *Scorpaena guttata* foram armazenadas à - 60 °C e liofilizadas. Foi possível observar ainda um aumento significativo no valor da DL₅₀ ao estocar a peçonha em temperaturas acima de 0 °C (5, 27 e 50 °C).

A labilidade das atividades biológicas de peçonhas de peixes tem sido atribuída à desnaturação protéica de moléculas ativas de alta massa molecular presentes nestas peçonhas (Abe *et al.*, 1996). A redução nas atividades edematogênica e nociceptiva quando a SpV foi armazenada a - 15 °C, observada neste trabalho, sustenta esta hipótese pois provavelmente o congelamento lento dessa solução nesta temperatura acarreta perda da conformação nativa destas proteínas, o que não ocorre a - 196 °C, pois o congelamento nesta temperatura é mais rápido. Esta instabilidade também tem sido atribuída à presença de proteases nestas peçonhas (Carrijo *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 1995)

6.3 Estudo da via de formação do edema

Após o envenenamento humano com o peixe *S. plumieri*, o tratamento dos efeitos locais é conduzido apenas com intervenções paliativas, como a imersão do membro afetado em água morna (~45 °C), uma vez que a utilização de medicamentos (anti-histamínicos e anti-inflamatórios) comercialmente disponíveis não melhoram os sinais e sintomas locais. De acordo Haddad *et al.* (2003), a água morna no local da injúria é parcialmente eficaz na redução da dor, mas não é efetiva em reduzir o edema, estes autores sugerem que este procedimento desnature os componentes termolábeis ativos da peçonha.

Neste trabalho foi realizado um estudo para avaliar a via de formação do edema induzido pela peçonha de *S. plumieri*, considerando que um melhor entendimento dos mecanismos que regulam os eventos da resposta local aguda pode levar ao desenvolvimento de condutas terapêuticas mais efetivas para o tratamento dos envenenamentos.

Para este objetivo, animais foram pré-tratados com drogas anti-inflamatórias antes da indução do edema com a injeção de 15 µg proteína da peçonha. Os camundongos que receberam a administração prévia de aprotinina e de HOE-140 apresentaram uma redução significativa do edema (fig. 10). Nos primeiros 30 minutos após a injeção da peçonha observou-se uma redução de ~35% pela aprotinina e ~50% pelo HOE-140, esse efeito redutor foi observado durante todo o período analisado.

Estes resultados sugerem que a gênese do edema agudo induzido pela peçonha de *S. plumieri* está principalmente relacionada com o sistema calicreína-cinina (KKS, *Kallikrein-Kinin System*), enquanto que os eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina) derivados do metabolismo do ácido araquidônico e a histamina apresentam uma menor participação neste fenômeno, ocorrendo principalmente nos primeiros momentos.

O envolvimento do KKS no edema induzido por peçonhas/venenos animais já foi descrito para a de vespa *Vespula vulgaris* (Griesbacher *et al.*, 1998) e da serpente *Bothrops lanceolatus* (Faria *et al.*, 2001). Dados mais recentes foram apresentados por Bohrer *et al.* (2007); estes autores demonstraram que o KKS também está envolvido na resposta edematogênica induzida pelo veneno da lagarta *Lonomia obliqua*, pois de forma semelhante aos nossos dados a formação do edema foi inibida tanto pela aprotinina quanto pelo HOE-140 em aproximadamente 50%.

O KKS está envolvido nos processos de transmissão de dor, controle da pressão arterial e no processo de geração e manutenção do estado inflamatório (Bhoola *et al.*, 1992) principalmente pela produção de bradicinina (BK) e consequente ativação dos receptores B₁ e B₂. A BK é um neuropeptídeo pró-inflamatório liberado durante uma lesão tecidual (Bhoola *et al.*, 1992), o qual induz o relaxamento da musculatura lisa vascular das artérias e arteríolas, promove a expressão das moléculas de adesão celular, migração de leucócitos e formação de fendas entre as células endoteliais, gerando extravasamento de líquido e proteínas nas vênulas pós-

capilares (Cambridge e Brain, 1995; Félétou *et al.*, 1996; Abbott, 2000 *apud* Shigematsu *et al.*, 2002).

Experimentos utilizando modelos animais demonstraram que os receptores B₂ estão envolvidos na fase aguda da inflamação, enquanto que os receptores B₁ participam da resposta de fase crônica (Dray e Perkins, 1993; Dray, 1997) *apud* (Couture *et al.*, 2001). Estes dados foram confirmados por Siebeck *et al.*, (1998), quando demonstraram que os receptores B₂ são encontrados de forma constitutiva em animais experimentais e que os receptores B₁ estavam ausentes em tecidos íntegros e/ou animais saudáveis, detectando-os somente em animais com infecção crônica estabelecida.

Considerando nossos resultados que demonstraram o envolvimento do KKS, podemos sugerir que a resposta edematogênica induzida pela peçonha de *S.plumieri* nesta via pode ser devida à; (i) presença de um componente protéico na peçonha que ativa direta ou indiretamente a calicreína plasmática/tecidual do animal e/ou (ii) presença de uma calicreína-like na peçonha. Estas situações promoveriam um aumento da liberação de cinina a qual ativaria o receptor B₂ acarretando em vaso-dilatação, aumento da permeabilidade vascular induzindo formação de edema (fig. 19).

Outra possibilidade de indução desta resposta seria à presença de mediadores proinflamatórios de baixa massa molecular na peçonha. A observação de atividade edematogênica na fração de menor massa molecular eluída da cromatografia de filtração molecular (Fração 6 – F6) figura 14, e também o efeito bloqueador do edema observado para a prometazina (fig. 10), corroboram com essa hipótese. Adicionado a isto a presença de histamina já foi descrita na peçonha do peixe *Trachinus draco*, (Haavaldsen e Fonom, 1963).

Hecquet *et al.*, em 2000, demonstraram que o receptor B₂ pode também ser ativado de forma direta independente da liberação de BK pelas calicreínas e outras serino proteases. Este dado pode corroborar com os nossos resultados, que demonstram que o efeito protetor do HOE-140 na formação do edema é superior ao da aprotinina, visto que ao bloquear o receptor B₂, o HOE-140 impede a ativação do receptor tanto pelas cininas quanto pelas proteases (fig. 10).

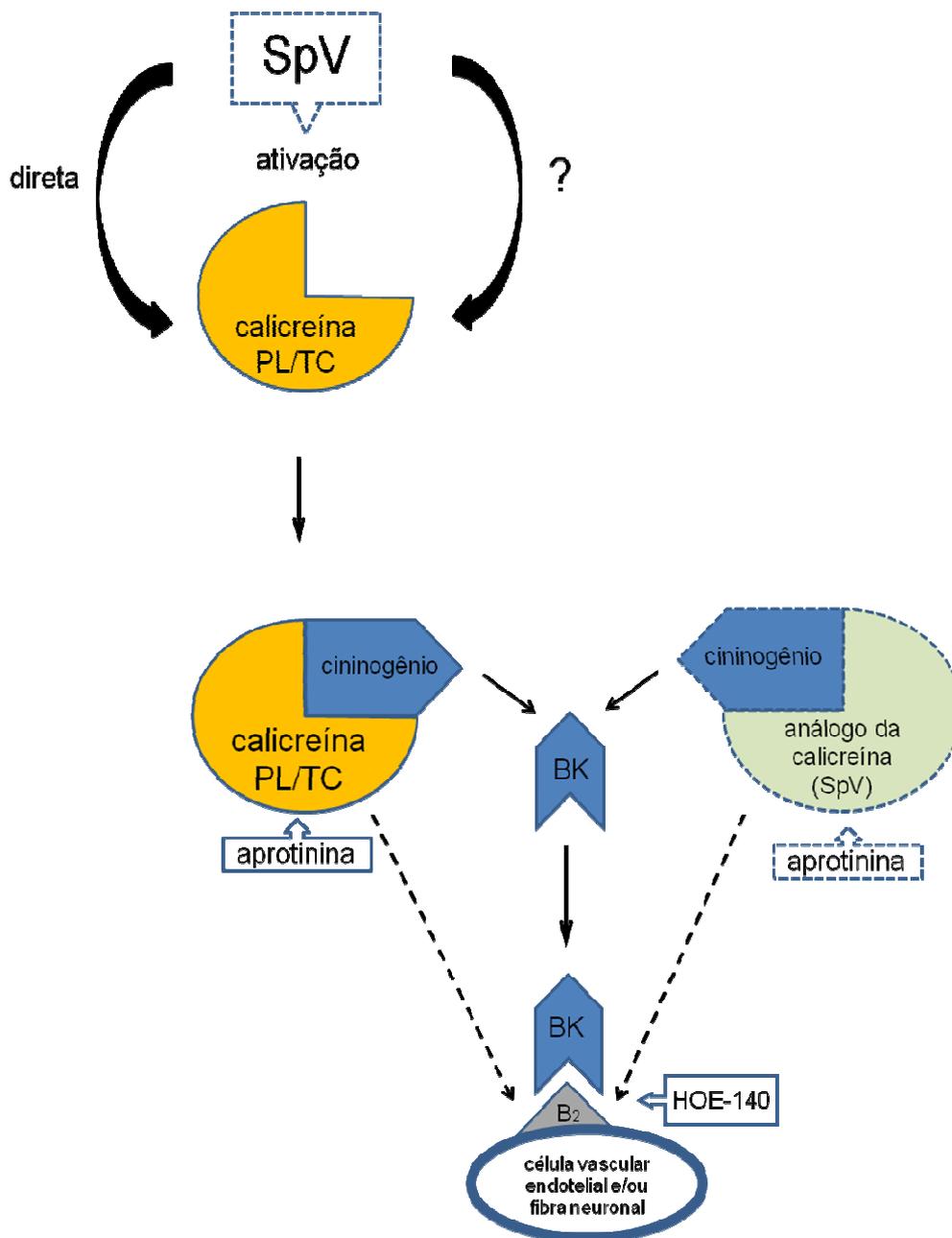


Figura 19: Proposta do mecanismo de ação da peçonha sobre o KKS. A figura representa de forma esquemática a formação de BK a partir da quebra do cininogênio por caliceínas (plasmática - PL/tecidual - TC, ou presente na peçonha). As caixas com setas representam as drogas que utilizadas neste estudo incluindo seus sites de ação: bloqueio do receptor B_2 pelo HOE-140 e inibição das enzimas pela aprotinina. Adaptada de Moreau *et al.* (2005).

O envolvimento do KKS na resposta edematogênica induzida pelo peixe *T. nattereri* (niquim), também foi descrito. Fonseca e Lopes-Ferreira (2000), em um estudo clínico observaram que o tratamento dos acidentados com peixe *T. nattereri* (niquim) com drogas com efeitos antiinflamatórios (dexametasona, indometacina, ciproheptadina) não foram efetivos na redução dos efeitos clínicos locais. Posteriormente Lopes-Ferreira *et al.*, (2004), caracterizaram o processo inflamatório induzido pela peçonha deste peixe, demonstraram que os inibidores de calicreína tecidual (TKI – *phenylacetyl-Phe-Ser-Arg-N-(2,4-dinitrophenyl)-ethyldiamine*) e plasmática (PKSI₅₂₇ – *N-(trans-4- aminomethyl- cyclohexanecarbonyl)-phenylalanine-4-arboxy methylalanilide*) reduziram significativamente as atividades nociceptiva e edematogênica. Estes dados sugeriram o envolvimento de cininogenases, presentes na peçonha, com a resposta inflamatória induzida. Esta hipótese foi confirmada pela observação de liberação de calidina quando a peçonha foi incubada com cininogênio humano e com um derivado sintético do cininogênio.

Levando em consideração a atividade cininogenásica da peçonha do niquim, ensaios enzimáticos preliminares, usando substrato sintético para a calicreína plasmática, foram realizados para detectar a presença dessas proteases na peçonha de *S. plumieri*. Amostras da peçonha foram incubadas com o substrato S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA), na presença e ausência de plasma humano, mas infelizmente os resultados não foram conclusivos.

6.4 Análise histopatológica

Durante o processo inflamatório desenvolvido após uma lesão tecidual, numerosos mediadores pró-inflamatórios são produzidos e liberados no local da lesão por células mononucleares residentes (principalmente mastócitos, macrófagos e células dendríticas); alguns são substâncias quimioatraentes como as citocinas, metabólitos derivados das lipooxigenases e a também a bradicinina (Bhoola *et al.*, 2002; Shigematsu *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2009), que induzem a migração de leucócitos da circulação sanguínea para o local da injúria por diapedese (Granger e Kubes, 1994; Teixeira *et al.*, 2009).

Neste trabalho uma avaliação histopatológica qualitativa foi feita no local da injeção da peçonha e nesta análise foi observada a presença de infiltrado inflamatório,

caracterizado por numerosos leucócitos, principalmente neutrófilos e células mononucleadas, oriundos da circulação sanguínea. Este exudato celular aumentou de forma gradual, atingindo seu pico máximo após 6 horas da injeção e se sustentou até 48 horas (fig. 11 D1,2 e fig. G1,2 respectivamente).

Em estudos realizados com as peçonhas de *Thalassophryne maculosa* e *T. nattereri* também foi descrito a formação de exudato celular no local da injúria. Entretanto, diferente do observado no presente estudo, a migração de leucócitos para o local da lesão ocorreu de forma tardia (7 e 21 dias após a injeção das peçonhas respectivamente), (Pareja-Santos *et al.*, 2008, 2009).

Diversas substâncias quimioatraentes podem estar envolvidas na formação de infiltrado inflamatório. Shigematsu e colaboradores, em 2002, demonstraram o envolvimento de migração de leucócitos com a bradicinina (BK) uma vez que, 60 minutos após a aplicação tópica de BK no leito mesentérico de ratos *Sprague-Dawley*, foi observado um intenso rolamento, adesão e migração de leucócitos. Além disso, o pré-tratamento dos animais com o HOE-140 impediu completamente os eventos da diapedese. A resposta inflamatória aguda também envolve alterações na microcirculação, conduzindo de forma coordenada componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) ao local da lesão. O extravasamento destes componentes ocorre em função de um aumento da permeabilidade dos vasos, formando o edema (Teixeira *et al.*, 2009),

Considerando o forte envolvimento do sistema calicreína-cinina na formação do edema induzido pela peçonha de *S. plumieri*, e o efeito vaso-dilatador característico da bradicinina principalmente através da ativação dos receptores B₂, é possível relacionar a atividade desse peptídeo com algumas alterações observadas na análise histopatológica como a formação do infiltrado inflamatório, o espaçamento tecidual durante a progressão do edema, alta leucocitose intra-vascular e marginalização das células de defesa. A análise histopatológica confirmou que o edema e a nocicepção induzidos pela peçonha, são devido a uma resposta inflamatória local aguda.

Entretanto, é possível que outros mediadores inflamatórios estejam envolvidos no processo de migração de leucócitos, considerando que o HOE-140 não bloqueou totalmente a formação do edema, mesmo aumentando a dose no pré-tratamento (dados não apresentados). Outros estudos relacionam o infiltrado inflamatório

induzido por peçonhas de animais com a produção e/ou liberação de eicosanóides (Pareja-Santos *et al.*, 2008) e citocinas (Lima *et al.*, 2003; Pareja-Santos *et al.*, 2008, 2009).

6.5 Níveis de citocinas eliciadas pela peçonha do peixe *S. plumieri*

As citocinas são mediadores protéicos solúveis que conduzem uma rede complexa de interações celulares, as quais regulam a imunidade celular, a humoral e a resposta inflamatória de fase aguda (Maes *et al.*, 1998).

Um aumento do nível das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e da quimiocina MCP-1 foram detectados no processo inflamatório induzido pela peçonha de *S. plumieri*. Altos níveis dessas substâncias foram observados em 30 minutos e atingiram o máximo em 2 horas após a injeção da peçonha; entretanto não houve alteração nos níveis de IL-10, IL-12p70 e IFN- γ (fig. 12)

Peçonhas de outros animais também foram descritas como indutoras da produção de citocinas/quimiocinas, como a peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) (Cruz *et al.*, 2008), a aranha *Loxocles gaucho* (IL-6, MCP-1 e KC – quimiocina de roedores análoga a IL-8 humana) (Barbaro *et al.*, 2010), e as peçonhas dos peixes *T. nattereri* e *T. maculosa*, as quais induziram a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Lima *et al.*, 2003 e Pareja-Santos *et al.*, 2008 respectivamente).

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda (Balkwill, 2002). A principal função fisiológica local do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos, e monócitos para o local da inflamação, e ativar essas células a erradicar os agentes agressores. Além disso, o TNF- α também induz a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina e VCAM-1 pelas células endoteliais, a secreção de quimiocinas pelo endotélio e por macrófagos, e a produção da citocina IL-1 β por fagócitos mononucleares (Balkwill, 2001), a qual é capaz de induzir a produção de IL-6 (Littlewood *et al.*, 1991).

Neste trabalho, aumento dos níveis de TNF- α no local da inflamação induzida pela peçonha de *S. plumieri* observado neste trabalho, pode também ter contribuído para a elevada migração de células mononucleadas observada nas análises

hitopatológicas (fig. 11). Este aumento também pode ser responsável pela produção significativa de IL-6.

A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular variando entre 20 e 30 kDa. É uma citocina pleiotrópica, ou seja, possui a capacidade de estimular vários tipos celulares e atua na imunidade inata e na adaptativa (Van der Poll e Van de Venter, 1998). A IL-6 não é espontaneamente produzida por células normais e intactas, sendo sua síntese e liberação associadas a um estímulo inflamatório seguido, por exemplo, por ativação celular induzida por outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (Littlewood *et al.*, 1991). Dados da literatura demonstram que a IL-6 forma um complexo com seus receptores solúveis sIL-6R (sigla do inglês *soluble interleukin 6 receptor*), e estes por sua vez coordenam o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, durante a resposta inflamatória aguda (McLoughlin *et al.*, 2004). Além disso, esse complexo IL-6/sIL-6R é capaz de estimular a transição do infiltrado inflamatório de neutrófilos para células mononucleadas (Hurst, *et al.*, 2001).

Também foi observado que a peçonha induz a produção de MCP-1. Esta molécula pertencente à superfamília das quimiocinas, e sua produção é estimulada por vários fatores, que incluem fatores de crescimento derivados de plaquetas e outras citocinas como IL-1- β , IL-4, TNF- α , e Interferon-gama (IFN- γ) (Sheikine e Hansson, 2004). A liberação de MCP-1 também é capaz de recrutar monócitos, células T de memória e células dendríticas para o local da lesão (Xu *et al.*, 1996).

Considerando o exposto acima, tanto o recrutamento elevado de leucócitos observado seis horas após a injeção da peçonha, quanto à presença de células mononucleadas (macrófagos e linfócitos) doze horas após a exposição podem estar associadas com a liberação de cininas e das citocinas TNF- α , IL-6 e MCP-1.

6.6 Purificação da fração protéica responsável pela atividade edematogênica

Utilizando um processo com duas etapas cromatográficas, filtração molecular em coluna de Sephacryl S 200 HR e troca aniônica em coluna Eprogen Q em sistema de alta resolução (HPLC), foi possível obter uma fração semipurificada com atividade inflamatória.

O fracionamento inicial de SpV por filtração molecular gerou 6 frações protéicas principais, e a atividade edematogênica estava principalmente associada ao

segundo pico protéico; esta fração (F2) foi selecionada para dar continuidade ao processo. Quando F2 foi submetida à cromatografia de troca aniônica foram obtidas 4 sub-frações principais; a fração eluída com 0,43 M de NaCl denominada SF2, apresentou maior atividade edematogênica.

A tabela 1 mostra a relação massa protéica com a atividade edematogênica das frações purificadas. F2 apresentou atividade edematogênica quatro vezes maior que a peçonha bruta, entretanto SF2 foi somente duas vezes mais ativa. Esta aparente incoerência na atividade de SF2 pode ser justificada pela alta instabilidade da molécula de interesse, considerando que durante o fracionamento, as amostras foram expostas a condições que acarretam perda da atividade, como: longos períodos de armazenamento a 4 °C, estocagem em tampões com concentração variáveis de sais e também devido a permanência desta amostra à temperatura ambiente durante a cromatografia de troca aniônica.

Tabela 1: Comparação da potência da atividade edematogênica de SpV e frações purificadas.

AMOSTRA	QUANTIDADE INJETADA	AUMENTO DA PATA (%)	% DE AUMENTO / μg DE PROTEÍNA
SpV	15 μg	60	4
FI-1	5 μg	81,5	16,3
FI-2	4 μg	33,2	8,3

O acompanhamento do processo de purificação por SDS-PAGE demonstrou que este foi efetivo em purificar a fração com atividade inflamatória, pois é possível visualizar um aumento na intensidade da banda de ~90 kDa após a execução das etapas cromatográficas. Estes resultados sugerem que esta fração protéica é a principal responsável pela resposta inflamatória eliciada pela peçonha.

É bem conhecido e descrito na literatura que grande parte das atividades farmacológicas das peçonhas de peixes é induzida por um mesmo componente protéico (Khoo, 2002). Algumas destas moléculas multifuncionais já foram purificadas de peçonhas de peixes, por exemplo: a *Stonustoxin* (STNX), toxina isolada da peçonha do peixe-pedra *S. horrida*, além de apresentar atividade letal e

hemolítica, induz distúrbios no sistema cardiovascular e resposta edematogênica local aguda (Poh *et al.*, 1991); a *Dracotoxin*, toxina de 105 kDa isolada da peçonha de *Trachinus draco*, que apresenta atividade letal, hemolítica e neuromuscular (Chhatwal e Dreyer, 1992); e a Sp-CTx, recentemente isolada da peçonha de *S. plumieri*, toxina hemolítica de 121 kDa que também apresenta atividade no sistema cardiovascular (vasodilatação) (Andrich *et al.*, 2010). Devido à propriedade de lisar eritrócitos, estas toxinas são denominadas citolisinas. A tabela 2 mostra propriedades de algumas toxinas isoladas de peçonhas de peixes.

Uma observação interessante é que a atividade inflamatória descrita neste trabalho estava associada à mesma fração protéica na qual anteriormente foram também descritas as atividades cardiovascular e a hemolítica/citolítica (Gomes *et al.*, 2010; Andrich *et al.*, 2010), quando a peçonha bruta foi submetida a cromatografia de filtração em gel em Sephacryl S200 HR, nas mesmas condições. Estes dados podem sugerir que a toxina da peçonha de *S. plumieri* que apresenta atividade cardiovascular e hemolítica Sp-CTx, também é a responsável por grande parte da atividade inflamatória da peçonha do peixe-escorpião.

Considerando os dados acima, pode-se também sugerir, que semelhante às peçonhas de peixes-pedra (*Synanceja* sp.) a peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri* também possui uma toxina multifuncional de alta massa molecular (tabela 2). Entretanto experimentos adicionais são necessários para a confirmação da atividade inflamatória de Sp-CTx.

Tabela 2: Algumas propriedades de toxinas isoladas de peçonhas de peixes.

NOME	ESPÉCIE	ATIV. INFLAMATÓRIA	LETALIDADE (DL ₅₀)	ATIV. CARDIOVASCULAR	HEMÓLISE	REFERÊNCIA
Dracotoxin	<i>Trachinus draco</i>	n.d	1.8 µg/g (i.v.)	n.d.	sim	Chatwal e Drayer, 1992
Verrucotoxin	<i>Synanceja verrucosa</i>	n.d	2.5 µg/g (i.v.)	hipotensão	sim	Garnier <i>et. al.</i> , 1995
Neoverrucotoxin	<i>Synanceja verrucosa</i>	n.d	0,047 µg/g (i.v.)	n.d.	sim	Ueda <i>et al.</i> , 2006
Stonustoxin	<i>Synanceja horrida</i>	edema	0.36 µg/g (i.v.)	vasodilatação, hipotensão	sim	Poh <i>et. al.</i> , 1991
Sp-CTx	<i>Scorpaena plumieri</i>	n.d	n.d.	vasodilatação	sim	Andrich <i>et. al.</i> , 2010
Naterinas 1,2,3,4	<i>Thalassophyne nattereri</i>	dor, edema, migração celular, liberação de citocinas	4.54 mg/g (i.p.)	n.d.	n.d.	Lopes-Ferreira <i>et. al.</i> , 1998 e 2004; Magalhães <i>et.al.</i> , 2005

n.d.: não determinado

6.7 Reatividade cruzada com o Stonefish Antivenom

Como já descrito anteriormente além da resposta inflamatória local aguda, descrita neste trabalho, a peçonha de *S. plumieri* induz alterações cardiovasculares pronunciadas. Essas manifestações são descritas tanto clínica quanto experimentalmente (Haddad Jr. *et al.*, 2003; Carrijo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010) e são qualitativamente similares às aquelas observadas após o envenenamento pelo peixe-pedra (Sutherland, 1983).

A principal estratégia terapêutica de acidentes envolvendo animais peçonhentos é a administração de um anti-veneno específico para cada peçonha, entretanto, como já mencionado, o único disponível comercialmente contra peixes peçonhentos é o SFAV (*Stonefish antivenom*), desenvolvido para neutralizar os principais efeitos nocivos causados pelo envenenamento com o peixe *Synanceja trachynis* (White, 1995).

A similaridade dos sintomas de envenenamento causados pelos peixes-pedra e peixes-escorpião (Kreger, 1991; Khoo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1995; Carrijo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010) motivou a avaliação do potencial de SFAV em neutralizar alguns dos efeitos tóxicos induzidos pela peçonha de *S. plumieri*.

Os resultados obtidos demonstram que SFAV apresenta reatividade cruzada com a peçonha do peixe *S. plumieri* (SpV), uma vez que se mostrou eficaz na neutralização dos efeitos tóxicos locais (nocicepção e edema) induzidos por SpV. Os resultados da análise por *Western Blotting* confirmaram esta reação cruzada, pois o SFAV reconheceu uma região ampla no gel, na faixa de 98 kDa.

Dados recentes publicados por Andrich e colaboradores (2010) demonstraram que o SFAV foi capaz de neutralizar a atividade hemolítica de Sp-CTx, uma glicoproteína citolítica e vasoativa isolada da peçonha de *S. plumieri*. Os valores da massa molecular (~98 kDa) e do pI (6,0-7,0) da(s) proteína(s) reconhecida(s) pelo SFAV são semelhantes aos da SNTX (subunidade α = 71 kDa, subunidade β = 79 kDa, pI = 6,9) e da *Trachynilisin*, TLY (subunidade α = 76 kDa, subunidade β = 83 kDa, pI = 5,7), que são toxinas citolíticas isoladas das peçonhas dos peixes *S. horrida* e *S. trachynis* respectivamente. Estes dados, juntamente com os obtidos, neste trabalho, na avaliação da reatividade cruzada também corroboram com a hipótese que o componente protéico de *S. plumieri* reconhecido pelo SFAV é uma toxina citolítica,

multifuncional, que apresenta atividade inflamatória, cardiovascular e hemolítica, provavelmente a Sp-CTx (tabela 2).

A atividade desta toxina poderia levar a liberação de enzimas proteolíticas intracelulares, as quais poderiam gerar a clivagem/ativação de proteína/enzimas e consequente liberação de BK, desencadeando a resposta inflamatória de maneira indireta. A instabilidade do componente pró-inflamatório ativo da peçonha de *S. plumieri* é uma evidência a mais que corrobora com esta hipótese, já que Sp-CTx é uma molécula marcadamente instável (Andrich *et al.*, 2010).

Este trabalho além de caracterizar experimentalmente a resposta inflamatória local induzida pela peçonha de *S. plumieri*, demonstra que os componentes presentes na peçonha do peixe escorpião responsáveis pela indução do processo inflamatório, são semelhantes àqueles encontrados na peçonha do peixe-pedra. Nossos resultados corroboram com a hipótese de que peixes peçonhentos pertencentes a diferentes gêneros, ou que habitam regiões diferentes, podem compartilhar componentes com propriedades antigênicas semelhantes (Church e Hodgson, 2002a).

7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu para caracterização da resposta inflamatória local induzida pela peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Os resultados obtidos demonstram que a peçonha desse peixe induz uma resposta inflamatória local intensa e sustentável.

1. Esta resposta é caracterizada por:

- nocicepção local
- edema local de intensidade e a persistência dependente da dose.
- liberação das citocinas IL-6 e TNF e da quimiocina MCP-1
- formação exudato celular inflamatório com predomínio de neutrófilos e células mononucleares.

2. A gênese do edema está principalmente associada com o sistema calicreína-kinina.

3. O principal responsável pela indução da resposta inflamatória é de natureza protéica e termolábil, provavelmente uma toxina multifuncional citolítica.

4. O anti-veneno contra o peixe pedra neutraliza a resposta nociceptiva e edematogênica induzidas pela peçonha do peixe escorpião, sugerindo que estas peçonhas compartilham componentes com propriedades antigênicas semelhantes.

5. A fração protéica responsável pela resposta inflamatória foi semi purificada por duas etapas cromatográficas.

8 REFERÊNCIAS

ABE, T., SUMATORA, M., HASHIMOTO, Y., YOSHIHARA, J., SHIMAMURA, Y., FUKAMI, J. Purification and properties of a cardioactive toxin, cardioleputin, from stonefish, *Synanceja verrucosa*. **J. Venom. Anim. Toxins**. 2, 135-132, 1996.

ABBOTT, N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. **Cell Mol. Neurobiology**. 20, 131-147, 2000.

ADAMS, M., BINDOKAS, V.P., HASEGAWA, L., VENENA, V.J. ω -Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. **J. Biol. Chem**. 265, 861-867, 1990.

ALDRED, B., ERICKSON, T., LIPSCOMB, J., 1996. Lionfish envenomations in an urban wilderness. **Wilderness Environ**. 4, 291–296.

ANDRADE, H. M., MURTA, S. M., CHAPEAUROUGE, A., NIRDÉ, P., ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. **J. Proteome. Res**. 7, 2357-67, 2008.

ANDRICH, F., CARNIELLI, J. B., CASSOLI, J. S., LAUTNER, R. Q., SANTOS, R. A., PIMENTA, A. M., DE LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G. A potent vasoactive cytolysin isolated from *scorpaena plumieri* scorpionfish venom. **Toxicon**. 56 (4), 487-496, 2010.

AUDDY, B., ALAM, M.I., GOMES, A. Pharmacological actions of the venom of the Indian Catfish (*Plotosus caninus*, Hamilton). **Indian Journal of Medical Research**. 99, 47-51, 1994.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 13, 135-141, 2001.

BARBARO, K. C., LIRA, M. S., ARAÚJO, C. A., Pareja-Santos, A., TÁVORA, B. C. L., José Pedro PrREZOTTO-NETO, J. P. F., KIMURA, L. F., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**. 56, 972-979, 2010.

BHOOLA, K. D., FIGUEROA, C.D., WORTHY, K.,. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacology Reviews**. 44, 1-80, 1992.

BOLHAS, 2009. Disponível em: <http://bolhasss.blogspot.com/>. Acessado em Setembro de 2009.

BOLETINI-SANTOS, D., KOMEAGAE, E. N., FIGUEIREDO, S. G., HADDAD, V. Jr., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. **Toxicon**. 51(4), 585-596, 2008.

BRIGATTE, P., CURY, Y. SOUZA, B. M., BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B., SAIDEMBERG, D. M., GUTIERREZ, V. P., PALMA, M. S. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*) **Amino Acids**. 40, 101-111, 2010.

BROWN, D. A., PASSMORE, G. M. Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception. **The Journal of Clinical Investigation**. 120 (5), 1380-1383, 2010.

CALIXTO, J. B., CABRINI, D. A., FERREIRA, J., CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. 87, 1-5, 2000.

CALVETE, J.J., SANZ, L., ÂNGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**. 583, 173601743, 2009.

CAMBRIDGE, H., BRAIN, S. D. Mechanism of bradykinin-induced plasma extravasation in the rat knee joint. **Br. J. Pharmacology**. 115, 641-647, 1995.

CARLOS, T. M., HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**. 84, 2068-2101, 1994.

CARLSON, R.W., SCHAEFFER, R.C. Jr., LA GRANCE, R.G., ROBERTS, C.M., RUSSELL, F.E. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**. 9, 379-391, 1971.

CARVALHO-FILHO, A. *Peixes: Costa Brasileira*. Melro 92-94, 1999.

CARRIJO, L. C., ANDRICH, F., DE LIMA, M. E., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**. 45(7), 843-850, 2005.

CASSOLI, J.S. Purificação e caracterização bioquímica parcial de uma hialuronidase presente da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CERVERO F., LAIRD J. M. A. One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. **News Physiological Sciences**. 6, 268-273, 1991.

CHHATWAL, I., DREYER, F. Biological properties of a crude venom extract from the greater weever fish *Trachinus draco*. **Toxicon**. 30, 77-85, 1992.

COHEN, A.S., OLEK, A.J. An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. **Toxicon**. 27, 1367-1376, 1989.

CHENG, J.K., JI, R.R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**. 33, 1970-1978, 2008.

CHURCH, J. E., MOLDRICH, R. X., BEART, P. M., HODGSON, W. C. Modulation of intracellular Ca^{2+} levels by Scorpaenidae venoms. **Toxicon**. 41 (6), 679-689, 2003.

CHURCH, J. E., HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**. 40(8), 1083-93, 2002a.

CHURCH, J.E., HODGSON, W.C. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. **Toxicon**. 40, 787-796, 2002b.

COLASANTE, C., MEUNIER, F.A., KREGGER, A.S., MOLGÓ, J. 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 (*Synansea trachynis*) venom. **Eur. J. Neurosci**. 8, 2149-2156, 1996.

COUTURE, R.; HARRISON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**. 429, 161-176, 2001.

CUMMINS T. R., RUSH, A. M. Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. **Expert Rev. Neurother.** 7(11), 1597-1612, 2007.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest.** 118, 503-508, 2000.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.** 75, 704-712, 1997.

CRUZ, H. A., GARCIA-JIMENEZ, S., MENDONÇA, Z. R., PETRICEVICH, V. L.. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators of Inflammation.** 87, 327-337, 2008.

DRAY, A., PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neuroscience.** 16, 99-104, 1993.

EVANGELISTA, K. S., ANDRICH, F., CORDEIRO, M. N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S. G., EBLE, J. A., Plumieribetin, a fish lectin, homologous to mannose-binding B-type lectins inhibits the collagen-binding $\alpha 1\beta 1$ integrin. **The Journal of Biological Chemistry.** 284, 34747-34759, 2009.

FARIA, L., ANTUNES, E., BON, C., ARAÚJO, A. L. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon.** 39, 825-830, 2001.

FÉLÉTOU, M., BONNARDEL E., CANET, E. Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. **Br. J. Pharmacology.** 118, 1371-1376, 1996.

FERREIRA, T., CAMARGO E. A., RIBELA, M. T. C. P., DAMICO, D. C., MARANGONI, S., ANTUNES, E., DE NUCCI, G., LANDUCCI, E. C. T. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon**. 53, 59-77, 2009.

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

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

FIGUEIREDO, J.L., MENEZES, N.A. 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, 1980.

FONSECA, L. A., LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. Bras. Dermatol.** 75(4), 435-443, 2000.

GARNIER, P., GOUDEY-PERRIÈRE, F., BRETON, P., DEWULF, C., PETEK, F., PERRÈRE, C. Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synansea verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. **Toxicon**. 33, 143-155, 1995.

GHADESSY, F.J., CHEN, D., KINI, R.M., CHUNG, M.C.M., JEYASEELAN, K., KHOO, H.E., YUEN, R. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **J Biol Chem.** 271, 25575-25581, 1996.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain Physician.** 8, 277-290, 2005.

GOMES, H. L., ANDRICH, F., MAUAD, H., SAMPAIO, K. N., LIMA, M. E., FIGUEIREDO, S. G., MOYSES, M. R. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. **Toxicon.** 55, 580-589, 2010.

GRANGER, D. N., KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukocyte Biology.** 55, 662–675, 1994.

GRIESBACHER, T., ALTHUBER, P., ZENZ, M., RAINER, I., GRIENGL, S., LEMBECK, F. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and release of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Euro. J. Pharmacol.** 55, 662–675, 1994.

GRUND, L. Z. **Papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC) induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*.** Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GUTIERREZ, J. M., ARROYO, O., BOLAÑOS, R. Myonecrosis, hemorrhage and edema induced by bothrops asper venom in white mice. **Toxicon.** 18, 603-610, 1980.

GWEE, M. C. E., GOPALAKRISHNAKONE, P., YUEN, R., KHOO, H. E., LOW, K. S. Y. A review of stonefish venoms and toxins. **Pharmacology & Therapeutics**. 64, 509-528, 1994.

HAAVALDSEN, R., FONNUM, F. Weever venoms. **Nature**. 149, 286-287, 1963.

HADDAD, J.J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 353, 217-224, 2007.

HADDAD Jr, V., NETO, D.G., DE PAULA NETO, J.B., DE LUNA MARQUES, F.P., BÁRBARO, K.C. 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, 2004.

HADDAD Jr, V., MARTINS, I. A., MAKYAMA, H. M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Block, 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, 2003.

HADDAD Jr., V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36(5), 591-597, 2003.

HADDAD Jr., V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento**. p. 145, 2000.

HAHN, S.T., O'CONNOR, J.M. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. **Toxicon**. 38, 79-89, 2000.

HARVEY, A.L., BRADLEY, K.L., COCHRAN, S.A., PRATT, J.A., JERUSALINSKY, D.A. What can toxins tell us for drug discovery?. **Toxicon**. 36, 1635-1640, 1998.

HARVEY, V.L., DICKENSON, A.H. Mechanisms of pain in nonmalignant disease. **Current Opinion Support. Palliat. Care** 2, 133-139, 2008.

HECQUET, C., TAN, F., MARCIC, B.M., ERDÖS, E.G. Human bradykinin B2 receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. **Molecular Pharmacology**. 58, 828-836, 2000.

HOPKINS, B.J., HODGSON, W.C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). **Toxicon**. 36, 973–983, 1998.

HOPKINS, B.J., HODGSON, W.C., SUTHERLAND, S. K. An in vitro pharmacological examination of venom from the soldierfish *Gymnapistes marmoratus* . **Toxicon**. 35, 1001-1011, 1997.

HOPKINS, S., J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**. 5, 45-57, 2003.

HUANG, J., XIANG, X., McNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Curr. Neuropharmacol**. 4(3), 197-206, 2006.

HUBBARD, A., ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**. 28, 1379-1386, 2000.

HURST, S. M., WILKINSON, T. S., McLOUGHLIN, R. M., JONES, S., HORIUCHI, S., YANAMOTO, N., ROSE-JOHN, S., FULLER, G. M., TOPLEY, N., JONES, A. S. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**. 14, 705-711, 2001.

HUNSKAAR, S., FASMER, O.B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**. 14, 69-76, 1985.

JUNQUEIRA, M.E.P., GRUND, L.Z., ORII, N.M., SARAIVA, T.C., LOPES, C.A.M., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. **Toxicon**. 49, 909-919, 2007.

KAPLANSKI, G., MARIN, V., MONTERO-JULIAN, F., MANTOVANI, A., FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunology**. 24, 25–29, 2003.

KHOO, H. E. Bioactive proteins from stonefish venom. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 29(9), 802-806, 2002.

KOH, D.C.I., ARMUGAM, A., JEYASSELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sciences**. 63, 3030-3041, 2006.

KREGGER, A.S. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). **Toxicon**. 29 (6), 733–743, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680-685, 1970.

LITTLEWOOD, A. J., RUSSEL, J., HARVEY, G. R., HUGHES, D. E., RUSSEL, R. G. G., GOWEN, M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts *in vitro*. **Endocrinology**. 129, 1513-1520, 1991.

LIMA, C., CLISSA, P. B., PIRAN-SOARES, A. A. TANJONI, I., MOURA-DA-SILVA, M. M., LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response

induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model tissue injury. **Toxicol.** 42, 499-507, 2003.

LOPES-FERREIRA, M., EMIM, J. A., OLIVEIRA, V., PUZER, L., CEZARI, M. H., ARAÚJO, M. D. A., JULIANO, L., LAPA, A. J., SOUCCAR, C., MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochemical Pharmacology.** 68(11), 2151-2157, 2004.

LOPES-FERREIRA, M., NÚÑES, J., RUCAVADO, A. M., FARSKY, S. H. P., LOMONTE, B., ÂNGULO, Y., MOURA-DA-SILVA, A. M., GUTIERREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **Int. J. Experimental Pathology.** 82, 55-64, 2001.

LOPES-FERREIRA, M., MOURA-DA-SILVA, A. M., MOTA, I., TAKEHARA, H. A. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicol.** 36, 405-410, 1998.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.I., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin fenol reagent. **Journal of Biological Chemistry.** 193, 265-275, 1951.

MAES, M., SONG, C., LIN, A., JONGH, R., GASTEL, A. V., KENIS, G. The effects of psychological stress on humans increased production of pro-inflammatory cytokines and Th1-like in stress induced anxiety. **Cytokine.** 10 (4), 313-318, 1998.

MAGALHÃES, G. S., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, M. I. L., LOPES-FERREIRA, M., LORENZINI, D. M., HO, P. L., MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analysis of

expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**. 86, 2006.

MAGALHÃES, G. S., LOPES-FERREIRA, M., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, M. I. L., SPENCER, P. J., ARAÚJO, M. S., PORTARO, F. C. V., MA, L., VALENTE, R. H., JULIANO, L., FOX, J. W., HO, P. L., MOURA-DA-SILVA, A. M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon**. 87, 687-699, 2005.

MARETIC, Z. Fish venoms. **Handbook of Natural Toxins: Marine Toxins and Venoms**. 445–477, 1988.

McINTOSH, M., CRUZ, L. J., HUNKAPILLER, M. W., GRAY, W. R., OLIVEIRA, B. M. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. **Arch. Biochem. Biophys**. 454, 428-435, 2008.

McLOUGHLIN, R. M., HURST, S. M., NOWEL, M. A., HARRIS, D. A., HORIUCHI, S. MORGAN, L. W., WILKINSON, T. S., YAMAMOTO, N., TOPLEY, N. JONES, S. A. Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. **The Journal of Immunology**. 172, 5676-56-83, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454, 428-435, 2008.

MONDIN, A. C. **Caracterização toxinológica de peçonhas do bagre marinho *Cathorops Spixii* (Ariidae)**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOREAU, M. E., GARBACKI, N., MOLINARO, G., BROWN, N. J., MARCEAU, F., ADAM, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Sciences**. 99, 6-38, 2005.

NAIR, M.S.R., CHEUNG, P., LEONG, I., RUGGIERI, G.D. A non-proteinaceous toxins from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). **Toxicon**, v.23, 525-527, 1985.

NASCIMENTO Jr, E. B., COSTA, K. A., BERTOLLO, C. M., OLIVEIRA, A. C., ROCHA, L. T., SOUZA, A. L, GLÓRIA, M. B., MORAES-SANTOS, T., COELHO, M. M. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, 45, 585-593, 2005.

NELSON, J.S. Fishes of the World. **Wiley**, 1984.

NOMURA, H. *Dicionário dos peixes do Brasil* (Dictionary of the Brazilian fishes). Editerra Editorial, 286-287, 1984.

NUIJEN, B., BOUMA, M., HENRAR, RE., MANADA, C., BULT, A., BEIJNEN, J. H. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. **Anticancer Drugs**. 10(10), 879-887, 1999.

OLIVEIRA, B.M., RIVIER, J., CLARK, C., RAMILO, R. C., CORPUZ, G. P., ABOGADIE, F. C., MENA E. E., WOODWARD, S. R., HILLYARD, D. R., CRUZ, L. J. Diversity of *Conus* neuropeptides. **Science**. 243, 257-263, 1990.

PAREJA-SANTOS, A., SARAIVA, T. C., COSTA, E. P., SANTOS, E. M., ZORN T. T., SOUZA, V. M., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C. Delayed local inflammatory

response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Pathol.** 90, 34-43, 2009.

PAREJA-SANTOS, A., BRUNI, V. M. SOSA-ROSALES, J. I., SOUZA, V. M., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C. Delayed local inflammatory leukocyte infiltration in an important component of *Thalassophryne maculosa* venom. **Toxicon.** 52, 103-114, 2008.

POH, C.H., YUEN, R., KHOO, H.E., CHUNG, M.C.D., GWEE, M.C.E., GOPALAKRISHNAKONE, P. Purification and partial characterization of Stonustoxin (lethal factor) from *Synansea horrida* venom. **Comp. Biochem. Physiol.** 99, 793-798, 1991.

RITCHIE, J.M. Tetrodotoxin and saxitoxin, and the sodium channels of excitable tissue. **TIPS.** 1, 275-279, 1980.

RITTNER, H.L., BRACK, A., STEIN, C. Pain and the immune system. **British Journal of Anaesthesia.** 101, 40-44, 2008a.

ROCHA E SILVA, M, BERALDO, W. T., ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms by trypsin. **American Journal of Physiology.** 156(2), 261-273, 1949.

RUSSELL, F. E. The Venomous and Poisonous Marine Invertebrates of the Indian Ocean. **Enfield, NH: Science Publishers.** 28, 1-14, 1996.

RUSSELL, F.E. Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. In: RUSSELL, F.E. (Ed.): *Advances in Marine Biology*, **Academic Press.** 2, 137-141, 1965.

SAUNDERS, P.R., ROTHMAN, S., MEDRANO, V.A., CHIN, P. Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanseja horrida*. **Am. J. Physiol.** 203, 429-432, 1962.

SCHAEFFER, R. C. JR., CARLSON, R. W., RUSSELL, F. E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon.** 9, 69-78, 1971.

SERHAN, C. N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology.** 6, 1191-1197, 2005.

SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.** 166, 368-379, 1986.

SHEIKINE, Y., HANSSON, G. K. Chemokines and atherosclerosis. **Ann. Med.** 36,98-118, 2004.

SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S., GUTE, D. C., KORTHUIS, R. J. Bradykinin-induced Proinflammatory signaling mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 283, 2676-2687, 2002.

SHIOMI, K., HOSAKA, M., FUJITA, S., YAMANAKA, H., KIKUCHI, T. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. **Marine Biology.** 103, 285-289, 1989.

SIVAN, G. Fish venom: Pharmacological features and biological significance . **Fish and fisheries.** 10, 159-172, 2009.

SIVAN, G., VENKETESVARAN, K., RADHAKRISHNAN, C.K. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. **Toxicon**. 50, 563–571, 2007.

SIEBECK, M., SCHORR, M., SPANNAGL, E., LEHNER, M., FRITZ, H., CHERONIS, J. C., WHALLEY, E. T., B1 kinin receptor activity in pigs associated with pre-existing infection. **Immunopharmacology**. 40, 49-55, 1998.

SMITH, W.L.; WHELEER, W.C. Venom evolution widespread in fishes: A road map for the bioprospecting of piscine venoms. **Journal of Heredity**. 97, 206–217, 2006.

SOSA-ROSALES, J.I., PIRAN-SOARES, A.A., FARSKY, S.H., TAKEHARA, H.A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**. 45, 155-161, 2005.

SUTHERLAND, S.K., TIBBALLS, J. *Australian Animals Toxins: the creatures, their toxins and care of the poisoned patient*. **Oxford University Press**. 2001.

TERAMOTO, T., KUWADA, M., NIIDOME, T., SAWADA, K., NISHIZAWA, Y., KATAYAMA, K. A novel peptide from funnel web spider venom, ω -Aga-TK, selectively blocks P-type calcium channels. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 196, 134-140, 1993.

TEIXEIRA, C., CURY, Y., MOREIRA, V., PICOLO, G., CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**. 54, 988-997, 2009.

THULESIUS, O., AL-HASSAN, J.M., CRIDDLE, R.S., THOMSOM, M. Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). **General Pharmacology**. 14, 129-132, 1983.

UEDA, A., SUZUKI, M., HONMA, T., NAGAI, H., NAGASHIMA, Y, SHIOMI, K. Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. **Biochim. Biophys. Acta.** 1760, 1713–1722, 2006.

VAN DER POLL, T. VAN DEVENTER, S. J. The role of interleukin 6 in endotoxin-induced inflammatory responses. **Prog. Clin. Biol. Res.** 397, 365-377, 1998.

VAN-KESTEREN, C., TWELVES, C., BOWMAN, A., HOEKMAN, K., LOPES-JAZARO, J.J., GUZMÁN, C., MATHOT, R. A., SIMPSOM, A., VERMORKEN, J. B., SMYTH, J., SHELLENS, J. H., HILLEBRAND, M. J., ROSING, H., BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacology of the novel marine derived anticancer agent ecteinascidin in a phase I study. **Anticancer drugs.** 13, 381-393, 2002.

VASKO, M. R., CAMPBELL, W. B., WAITE, K. J.. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **J. Neuros.** 14, 4987-4997, 1994.

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

WHITE, J. Antivenom Handbook. Melbourne: CSL Ltd. 1995.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine.** 140, 441-451, 2004.

XU, L. L., WARREN, M. K., ROSE, W. L., GONG, W., WANG, J. M. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. **J. Leukoc. Biol.** 60, 365-371, 1996.

Os seguintes resumos foram originados com os resultados obtidos neste trabalho:

Anexo I – Resumos publicados em anais de congressos

1. GOMES, H.L., MENEZES, T.N., CARNIELLI, J.B.T., EVANGELISTA, K.S., FIGUEIREDO, S.G. Stonefish antivenom neutralizes the inflammatory and cardiovascular effects of *Scorpaena plumieri* fish venom. 10th Meeting of Pan American Section of the International Society on Toxicology, 2010, San José. Abstracts Book, 2010.

2. MENEZES, T. N. ; DOBROVOSKY, O. F. ; LEMOS, P. H. ; FIGUEIREDO, S. G. . Local inflammatory response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom. In: 10th Meeting of Pan American Section of the International Society on Toxicology, 2010, San José.

3. MENEZES, T.N., GOMES, H.L., LEMOS, P.H., VASSALO, D.V., CARNIELLI, J.B.T., EVANGELISTA, K.S., FIGUEIREDO, S.G. Assessment of efficacy of stonefish antivenom in the neutralization of inflammatory and cardiovascular effects of *Scorpaena plumieri* fish venom. XI Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx), 2010.

STONEFISH ANTIVENOM NEUTRALIZES THE INFLAMMATORY AND CARDIOVASCULAR EFFECTS OF *Scorpaena Plumieri* FISH VENOM

Helena L. Gomes¹, Thiago N. de Menezes¹, Juliana Brambila Carnilei Trindade², Karla de Santana Evangelista³, Suely G. Figueiredo¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-090. Vitória, ES, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-091. Vitória, ES, Brazil

³ Fundação Ezequiel Dias, R. Conde Pereira Carneiro, Bairro Gameleira 80, 30510-010 Belo Horizonte. MG, Brazil.

Fish are often involved in human accidents and symptoms of envenomation may include local (intense pain and swelling) and systemic effects (cardiovascular and neurological disorders). Antivenom therapy is the major therapeutic option for envenoming, however, the only available commercial antivenom is against stonefish *S. trachynis* (SFAV). The effectiveness of SFAV in neutralizing the activity of some others piscine venoms is explained by the fact that venomous fish belong to different genus may share similar venom compounds. Therefore, the aim of the current study was to investigate the cross-reactivity of *S. plumieri* venom with SFAV using a range of binding and neutralization *in vivo* and *in vitro* studies. Cross-neutralization experiments were performed in order to determine if stonefish antivenom (SFAV) is able to neutralize the hyperalgesic, edematogenic and cardiovascular effects induced by *S. plumieri* venom (SpV). For inflammatory activity assays, samples of 30 μ l containing 15 μ g of *S. plumieri* venom (SpV) and different proportions of SFAV (1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:1.5) were injected (i.pl.) in the right footpad of Swiss mice (20 – 25 g). The edema was measured periodically and the increase percentage was calculated by comparison of paw thickness before and after venom administration. The amount of time spent licking or biting the right footpad was recorded during 30 min after injection and it was taken as the index of nociception. Full protection of pain ($97.1 \pm 1.7\%$) and edema ($90.3 \pm 1.6\%$) was achieved when pre-incubated with SFAV at 1 μ g of venom / 1U of antivenom. Effects of the venom on blood pressure and heart rate were evaluated in male Wistar rats (250-300 g) anesthetized with urethane (140 mg/100g i.p.). A midline incision was made in the cervical region and polyethylene catheters were implanted into the carotid artery and jugular vein for cardiovascular recordings and venom injections, respectively. A bolus dose (300 μ g/kg) of the SpV and a bolus dose of pre-mixed venom with SFAV were performed. The pressor response and the chronotropic response were reduced approximately 90 and 80%, respectively, in the presence of SFAV. These reductions (of both cardiovascular activities) were achieved at 1 μ g of venom / 1U of antivenom. Immunostaining of *S. plumieri* venom with SFAV displayed a small number of detected proteins by Western Blotting, which support the results obtained *in vivo*. These presented data suggest for the first time that the *S. plumieri* venom compounds responsible for inflammatory and cardiovascular effects are similar to those found in stonefish venom.

Financial Support: CAPES, CNPq, FACITEC, INCTTOX.

Keywords: *Scorpaena plumieri*, fish venom, stonefish antivenom.

LOCAL INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY *Scorpaena plumieri* FISH VENOM

Thiago N. Menezes¹, Junko Tsukamoto¹, Olavo F. Dobrovosky¹, Pedro H. Lemos¹, Suely G. Figueiredo¹

¹Laboratório de Química de Proteínas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES – Vitória, ES – Brazil,

Symptoms of envenomation of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*, a venomous fish often involved in human accidents in the southeastern Brazilian coast, include local (intense pain and swelling) and systemic effects (cardiovascular and neurological disorders) observed both clinically and experimentally. Albeit local clinical manifestations are well established, its mechanism of action remains unknown. Therefore the aim of this work was to investigate the local inflammatory response in mice induced by *S. plumieri* venom (SpV). Different doses of SpV (0.4 - 5.0 mg of protein/kg) were injected (i.pl.) in the right footpad of mice. The edema was measured periodically and the results were expressed as a percentage increase of paw thickness after venom administration. The amount of time spent licking or biting the right footpad was recorded during 30 min after injection and it was taken as the index of nociception. Edema, erythema and nociception were observed in all doses tested. The venom induced an intense and sustained dose-dependent edema, with a maximal response (observed 30 min after injection) of 58% to 0.4, 61% to 0.8, 68% to 1.5, and $\approx 82\%$ to 3.0 and 5.0 mg of protein/kg. Using doses ≥ 3.0 mg/Kg, SpV edematogenic effect persisted until 72 h after injection. In addition, a significant nociceptive response was observed: the venom induced an increase in paw licking duration, which reached its maximum (159.5 ± 10.8 s) using 3.0 mg/Kg doses. The mechanism of the edema formation was studied and, for this purpose, mice received 0.8 mg/Kg of SpV (i.pl.) 30 min after administration (i.p.) of a cyclooxygenase inhibitor (1 mg/Kg, sodium diclofenac), a histamine H₁ receptor antagonist (1 mg/Kg, promethazine), a plasma kallikrein inhibitor (8 mg/Kg, aprotinin) and a specific bradykinin B₂ receptor antagonist (100 μ mol/Kg, Hoe-140). Two hours after SpV administration, aprotinin and Hoe-140 significantly attenuated the venom-induced edema in 35 and 54 %, respectively, whereas the inflammatory response was only slightly reduced in the groups treated with antihistaminic agent and COX inhibitor. These data suggest that kallikrein-kinin system is involved in the inflammatory response induced by *S. plumieri* venom. The present work contributes to a better understanding of the local effects observed in human accidents/envenomation by this scorpionfish.

Financial Support: CNPq, CAPES, INCTTOX.

Keywords: *Scorpaena plumieri*, fish venom, inflammatory response, edema, kallikrein.

ASSESSMENT OF EFFICACY OF STONEFISH ANTIVENOM IN THE NEUTRALIZATION OF INFLAMMATORY AND CARDIOVASCULAR EFFECTS OF *Scorpaena plumieri* FISH VENOM

Thiago N. de Menezes¹, Helena L. Gomes¹, Pedro H. Lemos¹, Dalton V. Vassallo², Juliana B. T. Carnielli¹, Karla S. Evangelista¹, Suely G. Figueiredo¹.

¹ *Laboratório de Química de Proteínas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES, Vitória – ES, Brazil*

² *Laboratório de Eletromecânica Cardíaca, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES, Vitória – ES, Brazil*

The scorpionfish *Scorpaena plumieri* is one of the most venomous fish found along the Brazilian coast. Despite of the large number of venomous fish, the only antivenom available commercially is against Indo-Pacific stonefish *Synanceja trachynis* (Stonefish antivenom - SFAV). The aim of the current study was to investigate the cross-reactivity between *S. plumieri* venom (SpV) and SFAV through a range of binding and neutralization *in vivo* and *in vitro* inflammatory and cardiovascular assays. The SFAV ability to neutralize the effects induced by SpV was evaluated by pre-incubating the venom with antivenom before the assays. For inflammatory activity assays, samples of 15 µg of SpV were pre-incubated with SFAV (1/0.25, 1/0.5, 1/1 and 1µg venom/1.5 unit for 30 min at 25°C) and injected (i.pl.) in the right hind paw of male mice (20 – 25g). Edematogenic and nociceptive responses were measured 30 min after injection. Full protection of pain (97.1 ± 1.7%) and edema (90.3 ± 1.6%) was achieved by prior incubation of the SpV with SFAV (1µg/1U). In anaesthetized male rats (250-300g), SpV (300µg/kg, i.v.) produced immediate and transient increase in arterial blood pressure and decrease in heart rate. After pre-incubation with antivenom (1U/1µg SpV for 5 min at 25°C) the cardiovascular effects were significantly attenuated: both the pressor response and the chronotropic response were reduced (~90 and 80%, respectively). An immunoblot analysis of SpV separated by 2D-SDS-PAGE and probed with SFAV detected few proteins spots of ~98kDa and pI of 6-7. This recognition supports the results obtained in the *in vivo* assays, and suggests that scorpionfish *S. plumieri* venom compounds responsible for inflammatory and cardiovascular effects are similar to those found in stonefish venom. This is the first detection of venom similarities between Indo-Pacific and Atlantic venomous fish, corroborating that fish belonging to different genera or inhabiting different regions may share similar venom compounds.

Financial Support: CAPES, CNPq, INCTTOX.

Keywords: *Scorpaena plumieri*, fish venom, stonefish antivenom.

Anexo II – Artigo aceito para publicação

Manuscrito relatando a neutralização dos efeitos inflamatórios e cardiovasculares da peçonha de *S. plumieri*. Aceito em 05/04/2011 no periódico de circulação internacional *Toxicon* (atualmente em fase de revisão).

GOMES, H.L., MENEZES, T.N., CARNIELLI, J.B.T., ANDRICH, F., EVANGELISTA, K.S., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., VASSALLO, D.V., FIGUEIREDO, S.G. Stonefish antivenom neutralizes the inflammatory and cardiovascular effects of *Scorpaena plumieri* fish venom

Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom.

Helena L. Gomes¹, Thiago N. Menezes¹, Juliana B. T. Carnielli², Filipe Andrich¹, Karla S. Evangelista³, Carlos Chávez-Olórtegui⁴, Dalton V. Vassallo¹, Suely G. Figueiredo¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

² Núcleo de Doenças Infecciosas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

³ Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil.

⁴ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Abstract

Venomous fish are often involved in human accidents and symptoms of envenomation include local (intense pain and swelling) and systemic effects (cardiovascular and neurological disorders). However the only commercially available antivenom is against the Indo-Pacific stonefish *Synanceja trachynis* (Stonefish Antivenom - SFAV). The aim of the present study was to evaluate the potential of SFAV in neutralising the *in vivo* effects of some toxic activities of scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom (SpV), and the *in vitro* immuno cross-reactivity. The SpV (7.5 -100 µg/animal) caused nociceptive and dose-dependent edematogenic responses in the mice footpad. In rats SpV (300 µg/kg, i.v.) produced immediate and transient increase in arterial blood pressure and decrease in heart rate. Prior incubation of SpV with SFAV (1 µg SpV/1 U SFAV) abolished the inflammatory response, and significantly attenuated the cardiovascular effects induced by SPV. Western blotting analysis on two-dimensional SDS-PAGE of *Scorpaena plumieri* venom proteins using SFAV proved that the epitopes recognized by SFAV are shared with the ~98kDa proteins. This is the first report of venom similarities between Indo-Pacific and Atlantic venomous fish, suggesting that the SpV compound responsible for inflammatory and cardiovascular effects possesses similar biochemical and antigenic properties to those found in stonefish venom.

Keywords

Scorpionfish, Cardiovascular activity, inflammatory activity, stonefish antivenom

1. Introduction

A large number of venomous fish are encountered in freshwater and marine environments worldwide. As described for the terrestrial venomous animals, the development of an arsenal of noxious substances by some aquatic animals was an important adaptation that aids these species in their fight for survival in a highly competitive ecosystem (Russell, 1971; Magalhães *et al.*, 2006).

Among the aquatic animals often involved in human accidents, a special attention is devoted to fish belonging to the *Scorpaenidae* (lionfish and scorpionfish) and *Synanceiidae* (stonefish) families due to the severe injuries caused, which include local and systemic manifestations. The venom apparatus of these fish comprises 11-17 dorsal, 3 anal and 2 pelvic fin spines with venomous glandular tissue of different morphology located in grooves along opposing sides of each spine (Gwee *et al.*, 1994; Haddad, 2000; Smith and Wheeler, 2006).

All venomous fish use their venom primarily for defensive purposes. This can be deadly for any human unlucky enough to step on them. Therefore, human envenomation occurs when swimmers or fishermen mishandle or step on the spines of the dorsal fin (Halstead, 1951; Roche and Halstead, 1972). The intensity of the clinical features triggered by fish envenomation is related to the amount of venom injected in the puncture wounds; and patients can be stung by one or several spines present in the dorsal region of the fish (Gwee *et al.*, 1994).

Only a few studies have been dedicated to the venom of specimens of *Scorpaena* genus scorpionfish. Some works were performed using the venom of *Scorpaena guttata*, the sculpin or California scorpionfish (Carlson *et al.*, 1971, 1973; Schaeffer *et al.*, 1971; Coats *et al.*, 1980). However there is little information about the venom of *Scorpaena plumieri*, one of the most abundant scorpionfish found along the Brazilian coast (Figueiredo and Menezes, 1980; Carvalho-Filho, 1999).

In previous works, we have found that *S. plumieri* venom is lethal (LD₅₀ in mouse 0.28 mg/kg, i.v.) displaying hemorrhagic, hemolytic and proteolytic activities (Carrijo *et al.*, 2005). Injections of the venom in the footpad or peritoneal cavity of mice lead to deposition of venom in the lung, endothelial barrier dysfunction and microvascular hyperpermeability (Boletini-Santos *et al.*, 2008).

In addition, the fresh venom was able to induce cardiovascular effects (changes in mean arterial pressure and heart rate) in anaesthetized rats (Carrijo *et al.*, 2005). Recently, we have demonstrated that *S. plumieri* venom induces coronary vasoconstriction, positive

chronotropic, lusitropic and inotropic effects on isolated rat hearts (Gomes *et al.*, 2010). A new vasoactive cytolytic toxin, referred to as Sp-CTx, has been purified from this venom. This protein has proved to possess a potent hemolytic activity on washed rabbit erythrocytes and induces vasorelaxation followed by constriction on rat aortic rings (Andrich *et al.*, 2010).

In spite of the low risk of death, the envenomation caused by scorpionfish is serious and the symptoms are similar to those observed in accidents with stonefish and lionfish. The clinical manifestations of accidents with *S. plumieri* and *S. brasiliensis* include intense pain, irradiation of the pain, edema, erythema, occasional skin necrosis, adenopathy, nausea, vomiting, agitation, malaise, sweating, diarrhea, tachycardia and arrhythmias (Haddad Jr. *et al.*, 2003). The treatment protocol of the victims is symptomatic and antivenom therapy for fish envenoming is only available against stonefish (*Synanceia trachynis*) envenomation.

Commercial Stonefish Antivenom (SFAV) is a horse Fab'2 preparation made by CSL in Melbourne, Australia (White, 1995) which is effective in neutralising all known clinical effects of serious *S. trachynis* envenomation, annulling the lethal, vascular permeability-increasing and hemolytic properties of the venom (Church and Hodgson, 2003).

It is also known that SFAV neutralises the hemolytic and toxic effects of other stonefish (*S. verrucosa*) and lionfish (*Pterois volitans*, *P. lunulata*, *P. antennata* and *Dendrochirus zebra*) (Shiomi *et al.*, 1989). It has been reported that the endothelium-dependent relaxation activity in porcine coronary arteries, the inotropic and chronotropic responses in rat atria, and the biphasic cardiovascular responses in anaesthetized rat produced by *Gymnapistes marmoratus* and *P. volitans* venoms are abolished by SFAV (Church and Hodgson, 2001; 2002a). Recently, we demonstrated that the potent hemolytic activity of Sp-CTx is strongly reduced after treatment with SFAV (Andrich *et al.*, 2010). The effectiveness of SFAV in neutralizing the activity of some other piscine venoms is explained by the notion that venomous fish belonging to different genus may share similar venom compounds (Church and Hodgson, 2002b). Consequently, it has been proposed that the venoms of most venomous fish are chemically and pharmacologically similar and that their effects only differ quantitatively (Church and Hodgson, 2002b).

Therefore, the aim of the current study was to investigate the cross-reactivity between the venom of the Atlantic scorpionfish *S. plumieri* and the commercial antivenom raised against the venom of Australian stonefish *Synanceja trachynis* (SFAV) through an array of binding and neutralisation studies *in vivo* and *in vitro*. This work also attempts to characterize and document the edema-inducing and nociceptive activities of *S. plumieri* venom.

2) Material and Methods

2.1) Venom extraction

Venom was obtained from wild specimens of *S. plumieri*, collected on shallow water beaches on the coast of Espírito Santo State — Brazil, and maintained alive in oxygenated seawater. The venom extraction was carried out according to the batch method, previously described by Schaeffer *et al.* (1971). The whole venom apparatus or 15 spines from a medium size fish (about 20 cm in length and ~400 g weight) yielded an average of 10-16 mg of protein. The fresh venom extract (SpV) was immediately used for cardiovascular, edema-inducing and nociceptive assays. The protein concentration of the *S. plumieri* venom was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.2) *In vivo* assays

All procedures were conducted in accordance with the Biomedical Research Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (1996), as stated by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

2.2.1) Edema-inducing activity

The ability of *S. plumieri* venom to induce edema was studied in male Swiss mice (20 – 25 g) according to Lima *et al.* (2003). Samples of 30 µl of sterile phosphate buffer saline (PBS) containing different doses of SpV (7.5, 15, 60 µg of protein/animal) were injected via intraplantar (i.pl.) route in the right hind paw of mice. Local edema was quantified periodically in 0.5, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after injection (N = 4) by measuring the thickness of injected paws with a digital caliper (Zaas Precision). Mice injected with sterile PBS were considered as control group. Results were expressed as percentage increase of paw thickness after venom administration.

2.2.2) Nociceptive activity

Nociceptive activity of the SpV was assayed according to Hunskaar *et al.* (1985). Each mouse (20 - 25 g) was kept in a chamber mounted on a mirror. After an adaptation period (10 min), 30 µl of sterile PBS containing different doses of *S. plumieri* venom (7.5, 15, 30, 60 and 100 µg of protein/animal) were injected (i.pl.) in the right hind paw of mice (N = 4). Afterwards, each animal was returned to the observation chamber and the period of time spent licking or biting the right hind paw was recorded during 30 minutes and taken as index of nociception. Mice injected with sterile PBS were considered as control group (N = 4).

2.2.3) Cardiovascular assays

Effects of SpV on blood pressure and heart rate were evaluated in male Wistar rats (250 - 300 g, N = 7) anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.). A midline incision was made in the cervical region and polyethylene catheters (PE-50) were implanted into the carotid artery and jugular vein of rats for cardiovascular recordings and venom injections, respectively. During all procedures, depth of anesthesia was checked through the pinch of the rear paw. When necessary, additional doses of anesthetic were injected. During all experiments, animals breathed spontaneously. The venom extract was administered *in bolus* in a dose of 300 µg protein/kg in 100 µL of saline. The dose used was selected according to our previous work (Gomes et al, 2010). The pulsatile arterial pressure (PAP) was recorded through a blood pressure transducer (Grass Instrument Div., Warnick, USA) and signals were processed using the BIOPAC-System (MP100, Model PT300, Santa Barbara, USA). The mean arterial pressure (MAP) and the heart rate (HR) recordings were obtained simultaneously from the PAP signal. After the injection of the *S. plumieri* venom, the peak values of MAP and HR were measured.

2.2.4) Estimation of neutralisation of *S. plumieri* venom pharmacological activities

Cross-neutralisation experiments were performed in order to determine if stonefish antivenom (SFAV, obtained from CSL, Melbourne, Australia) was able to neutralise the nociceptive, edematogenic and cardiovascular effects induced by SpV. For neutralisation of nociceptive and edematogenic activities, samples of SpV were incubated at 25 °C for 30 min with SFAV at different ratios (1:0.25, 1:0.5, 1:1.0 and 1:1.5 µg of SpV/U of SFAV). After that, 30 µl of each mixture containing 15 µg of SpV were injected in the right hind paw of mice. Nociceptive and edematogenic activities were evaluated after 0,5 h according to items 2.2.1 and 2.2.2 (N = 4).

For the cardiovascular assays, *S. plumieri* venom was pre incubated with SFAV (1:1 SpV/U of SFAV for 5 min at 25 °C), and subsequently, the mixture was administered *in bolus* (300 µg protein of SpV/kg) according to item 2.2.3 (N = 7).

Samples of *S. plumieri* venom (15 µg and 300 µg), in appropriate vehicle, were submitted to the same incubation conditions (25 °C for 30 or 5 min) and used as positive control for inflammatory and cardiovascular assays, respectively.

2.3) Two-dimensional (2D) electrophoresis

SpV (100 µg of protein) was applied to each of 7 cm immobilized linear pH gradients (pH 3 – 10 and 4 – 7) strips (IPG, Bio-Rad), with Deastreak rehydration solution (Amersham,

Uppsala, Sweden) for 12 h, 50 V at 20 °C. Isoelectric focusing (IEF) was performed in an IEFCell system (Bio-Rad, Hercules, CA). Electrical conditions were set as described by the supplier. After the first-dimension run, the IPG gel strip was incubated at room temperature for 15 min in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 2% SDS, 30 % glycerol and traces of bromophenol blue) containing 125 mM DTT, followed by a second incubation step (15min at room temperature) in equilibration buffer containing 125 mM iodacetamide instead of DTT. The second dimension electrophoresis was performed in a vertical system with uniform 10 % separating gel (mini PROTEAN 3 cell; Bio-Rad) at 25 °C, according to the method described by Laemmli (1970). Protein spots in the gel were stained with colloidal coomassie blue brilliant CBB G-250 following procedures described elsewhere (Neuhoff *et al.*, 1988).

2.4) Western Immunoblotting

S. plumieri proteins separated by 2D electrophoresis (according to item 2.3) were transferred to a nitrocellulose membrane for 1 h at 350 mA/100 V. Membrane was blocked in 5% low fat milk, 0.3% tween 20 in phosphate buffered saline (PBS). Following blockade, membrane was washed with PBS and probed (1 h at 25 ° C) with a 1:500 dilution of stonefish antivenom. Another washing step was performed and the bound antibodies were probed (1 h, 25° C) with a diluted peroxidase-conjugated antibody (1:5000 in PBS containing 0.05% tween 20). Immunodetection was carried out using hydrogen peroxide as substrate in the presence of diaminobenzidine and 4-chloro-1-naphthol.

2.5) Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

ELISA was used with the aim of evaluating the antigenic cross-reactivity of *S. plumieri* whole venom with Stonefish antivenom. The assays were performed as described previously by Chávez-Olórtegui *et al.*, 1991.

Falcon flexible microtitration plates purchased from Becton Dickinson Labware Europe (Becton Dickinson France S.A.) were coated with 100 µl of a 5 µg/ml solution of the *S. plumieri* venom in 0.02 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 5°C. After blocking non-specific sites with 2% (w/v) casein solution for 1h at 37°C, the immobilized venom proteins were titrated with decreasing concentrations of stonefish antivenom (from 1:200 to 1:204800 dilution) and incubated at 37°C for 1h. Non-specific binding was measured in the presence of pre-immune horse serum at the same conditions. Bound IgG was detected via peroxidase conjugated antibody raised against horse IgG diluted 1:1000. Wells coated with 2% casein were taken as blank and subtracted from all values. Absorbance values were determined at 492 nm with a Titertek Multiscan

spectrophotometer. All measurements were made in triplicate and the results expressed as the mean of two assays.

2.6) Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm SEM (Standard Error of the Mean) and were evaluated using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey *post hoc* test. Results were also evaluated by Student's t-test. In all cases, differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1) *S. plumieri* venom edematogenic and nociceptive activities in mice

For determination of the edematogenic response induced by *S. plumieri* venom, doses of 7.5, 15 and 60 μg of venom/animal were used. Figure 1A shows the time-course evaluation of edematogenic effect. It is possible to observe that the venom induced an intense and sustained dose-dependent edematogenic response with a maximal activity observed 30 min after injection of $58 \pm 6\%$ with 7.5 μg , $61 \pm 6\%$ with 15 μg , and $82 \pm 2\%$ with 60 μg of protein/animal. The edema remained significantly elevated compared to control group over 6h at the dose of 7.5 μg , 24 h at the dose of 15 μg and 72 h at the dose of 60 μg . Higher doses were unable to increase the edematogenic response compared to the response induced by 60 μg of SpV (data not shown).

Likewise, a significant nociceptive response was observed. Figure 1B shows that the SpV induced an increase of paw licking duration that reached its maximum with 15 μg of protein/animal (124.5 ± 29.3 s). Doses $> 15 \mu\text{g}$ of *S. plumieri* venom were unable to increase the paw licking duration in a dose-related way, nevertheless each dose presented significant values (Figure 1B).

The vehicle control (PBS) had no significant effect on the experiment

3.2) Neutralisation of *S. plumieri* venom edematogenic and nociceptive effects using stonefish antivenom

The ability of SFAV in neutralizing the inflammatory activity induced by *S. plumieri* venom was evaluated by pre-incubation of SpV with SFAV. Figure 2 shows that SFVA succeeded in neutralizing the *in vivo* edematogenic and nociceptive effects of SpV. The intensity of the protective effect of SFAV was achieved in a dose-dependent ratio. At ratios of

1/1 and 1/1.5 μg protein of venom/U of antivenom almost a complete neutralisation of edema ($90.3 \pm 1.6\%$ and $90.8 \pm 1.2\%$, respectively) and nociception responses ($97.1 \pm 1.7\%$ and $94.8 \pm 2.2\%$, respectively) were observed. At lower ratios (1/0.5 and 1/0.25 μg of SpV/U of antivenom) only a partial neutralisation of edema ($68.4 \pm 4.8\%$ and $46.1 \pm 9.8\%$, respectively) and nociception responses ($50.5 \pm 7.3\%$ and $5.6 \pm 3.9\%$, respectively) was observed.

3.3) Neutralisation of *S. plumieri* venom cardiovascular effects using stonefish antivenom

In the cardiovascular assays, systolic pressure, diastolic pressure and HR values of anesthetized rats prior to the start of the experiments were 120 ± 4.5 mmHg, 80 ± 7.0 mmHg and 320 ± 20 bpm respectively. SpV (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) caused a pressor response of 36.9 ± 4.0 mmHg increase in mean arterial pressure and bradycardia of 65.6 ± 9.2 bpm decrease in heart rate in anaesthetized rats (Figure 3). These effects were immediate and transient, and the values of MAP and HR returned to the basal levels after 2-6 minutes. When the same dose of SpV was pre-mixed with SFAV (1 μg of SpV/1 U of SFAV during 5 min at 25°C), the pressoric and bradycardic responses were reduced in 88 % (4.6 ± 0.8 mmHg increase in MAP) and 87 % (8.3 ± 2.2 bpm decreased in HR), respectively (Figure 3).

3.4) Cross-reactivity of *S. plumieri* venom and stonefish anti-venom

Titration of SpV with SFAV demonstrated that SFAV sera displayed consistent immunoreactivity with the *S. plumieri* venom antigens coated to the microtiter plate (Figure 4). Under our experimental conditions, SpV showed cross-reactivity with anti-stonefish antiserum at 1:1000 dilution, whereas pre-immune sera did not react significantly.

3.5) Protein profile of *S. plumieri* venom and immunoreactivity to stonefish anti-venom.

When the crude venom of *S. plumieri* was subjected to 2D-PAGE, distinct protein spots possessing masses between 6 and 120 kDa were identified using Coomassie Blue staining, and the majority of these spots reached the isoelectric point between pH 4 and 7 (Figure 5A). In order to achieve a better separation profile, an attempt of focalization using a narrow pH gradient range (4 to 7) strip was performed. As it is possible to see in Figure 5B, this new IEF improved the resolution of the acidic protein spots. This gel was used for a further Western blot cross-reactivity analysis with SFAV where only few protein spots, with apparent molecular mass around 98kDa and pI ranging from 6 to 7 were recognized by the anti-*Synanceja* serum (Figure 5C).

4. Discussion

Both clinical and experimental envenomation with the Atlantic black scorpionfish (*S. plumieri*) venom caused pronounced cardiovascular effects, intense pain and edema (Haddad Jr. *et al.*, 2003; Carrijo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010). These symptoms are qualitatively similar to those observed after envenomation by stonefish (Sutherland, 1983). The treatment protocol of scorpionfish victims is symptomatic, and some of the local symptoms are alleviated by immersing the affected member in warm water and administering local anesthetics or analgesics, resulting in slight decrease of the symptoms of the envenomation (Haddad Jr. *et al.*, 2003, Haddad Jr., 2000).

In life-threatening accidents involving poisonous animals, the antivenom administration is the major therapeutic option. However, commercial antiserum against venomous fish is only available for the stonefish *Synanceja trachynis* (StoneFish AntiVenom, SFAV), which together with *Synanceja verrucosa* and *Synanceja horrida*, are the deadliest fish in the world (Khoo *et al.*, 1992; Church and Hodgson, 2001).

The similarities between the envenomation symptoms and the pharmacological activities induced by stone- and scorpionfish venoms (Kreger, 1991; Khoo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1995; Carrijo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010), prompted us to investigate whether *in vivo* cardiovascular and inflammatory activities of *S. plumieri* venom could be neutralized by SFAV.

After injection of *Scorpaena plumieri* venom in hind paw of mice, a local inflammatory lesion, characterized by intense edema and pain, was observed. The intensity and persistence of the edema were dose-dependent. For all doses tested, the maximal edematogenic response occurred 30 min after venom injection and it remained significantly elevated over 6, 24 or 72h according to the dose administered. In addition, we observed a pronounced nociceptive response which reached its maximum at doses $\geq 15 \mu\text{g/paw}$. This local reaction is similar to that observed on human victims of accidents with scorpionfish *S. plumieri* (Haddad Jr. *et al.*, 2003).

Similar inflammatory responses have also been observed in previous studies with other fish venoms. Magalhães *et al.* (2006) described that both stingrays *Potamotrygon cf. scobina* and *P. gr. orbigny* venoms induce significant edematogenic activity, which was sustained up to 10 h after injection. Experimental studies carried out with *Thalassophryne nattereri* and *T. maculosa* venoms showed that doses $\leq 30\mu\text{g}$ of venom/paw induce intense edema and nociception (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa-Rosales *et al.*, 2005b). The

Scatophagus argus fish venom also produces dose-dependent edema until 48 h after venom injection (Sivan *et al.*, 2007).

Besides the inflammatory response, *S. plumieri* venom caused profound alterations on the cardiovascular system *in vivo* as reported previously (Carrizo *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010). The cardiovascular response was characterized by a hypertensive response and bradycardia.

Both inflammatory and cardiovascular responses induced by SpV were neutralized by SFAV. The same assays were carried out with antiothropic antivenom, which was not able to neutralize the SpV cardiovascular effects, suggesting the SFAV specificity (data not shown). Pre-mixing the *S. plumieri* venom with the stonefish antivenom resulted in a protective effect, which was achieved at ratios of 1/1 and 1/1.5 μg protein of venom/U of antivenom. This neutralisation activity demonstrates that the pro-inflammatory and cardioactive venom compounds are mainly proteins.

These results are in accordance with those of Carlson *et al.* (1971), which suggested that the cardiovascular effects induced by the *Scorpaena guttata* venom are probably mediated by the release of endogenous stores of neurotransmitters by protein compounds, rather than the presence of either transmitter in the venom. However, we cannot exclude the possible presence of neurotransmitters or low molecular mass mediators in the *S. plumieri* venom, since they have been found in *S. verrucosa* and *S. horrida* stonefish venoms (Garnier *et al.*, 1996).

The two-dimensional SDS-PAGE analyses showed that the majority of the *S. plumieri* venom components are in the mass range of 6 to 120 kDa and are predominantly anionic proteins (pI 4 – 7). A similar MW range has been described for the protein components of other fish venoms: 20 to 295 kDa in *Synanceja trachynis* (Hopkins and Hodgson, 1998), 11 to 109 kDa in *Gymnapistes marmoratus* (Hopkins and Hodgson, 1998), 14 to 100 kDa in *Thalassophryne maculosa* (Sosa-Rosales *et al.*, 2005a), 15 to 130 kDa in *Potamotrygon falkneri* (Haddad Jr. *et al.*, 2004).

Despite the fact that various proteins are found in the SpV, only the major spot observed in the two-dimensional electrophoretic profile of *S. plumieri* venom was recognized by the SFAV after immunoblotting analysis. These *in vitro* observations correlate well with the results obtained in the *in vivo* assays and also corroborate that *S. plumieri* venom compounds responsible for inflammatory and cardiovascular effects are similar to those found in stonefish venom. In addition, ELISA analysis of *S. plumieri* venom proteins

suggested that the epitope(s) detected by the neutralizing polyclonal SFAV antibody is (are) shared by proteins present in both fish venoms.

Interestingly, Andrich *et al.* (2010) demonstrated that SFAV was able to cross-react and neutralise the hemolytic activity of Sp-CTx, a dimeric (73 kDa/subunit) cytolytic and vasoactive glycoprotein isolated from *S. plumieri* venom (Andrich *et al.*, 2010). Thus, due to its MW it is possible that the SFAV-recognized spot in the present work is the previously identified scorpionfish venom cytolsin. The isoelectric point variation of the SFAV-recognized protein spot could be due to the different glycosilation levels exhibited by Sp-CTx (Andrich *et al.*, 2010), being an additional evidence that the SFAV-recognized spot is the scorpionfish cytolsin.

Both the molecular mass (98 kDa) and isoelectric point (6.0-7.0) values of SFAV-recognized protein spot are similar to the stonustoxin (SNTX; α subunit = 71 kDa, β subunit = 79 kDa, pI 6.9) and trachynilysin values (TLY; α subunit = 76 kDa, β subunit = 83 kDa, pI 5.7), the dimeric cytolytic toxins isolated from *Synanceja horrida* and *S. trachynis* venoms, respectively (Poh *et al.*, 1991; Kreger, 1991; Colasante *et al.*, 1996). The cytolsins from fish venoms are reported as multifunctional toxins, triggering an array of biological actions, including *in vitro* hemolysis, increase in vascular permeability, cardiovascular disorders and death (Perriere *et al.*, 1988; Poh *et al.*, 1991; Kreger, 1991; Chhatwal and Dreyer, 1992; Garnier *et al.*, 1995; Colasante *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 2006), probably as the result of a non-specific cell membrane disturbing action (Kreger, 1991; Chen *et al.*, 1997). Albeit few pharmacological activities were described for Sp-CTx (hemolysis and vascular tonus modulation) (Andrich *et al.*, 2010), the neutralisation of the local inflammatory and cardiovascular effects of crude *S. plumieri* venom by SFAV-treatment offers evidence that this scorpionfish cytolsin may possess other pharmacological actions. However, further studies are necessary to assess such potential features of this cytolsin.

The results obtained demonstrated that the stonefish antivenom evoked an immune cross-reactive response with scorpionfish venom. SFAV is efficient in neutralising the most prominent toxic effects of scorpionfish venom. This is in accordance with the hypothesis that venomous fish belonging to different genera or inhabiting different regions may share venom compounds with similar antigenic properties (Church and Hodgson, 2002b). This resemblance may rely on the fact that piscine venoms have evolved for a same defensive purpose and possess similar multifunctional cytolytic toxins (Saunders, 1960; Russell, 1965; Kreger, 1991; Church and Hodgson, 2002b; Andrich *et al.*, 2010).

Finally, the study of such venoms and/or toxins may be useful for developing new and more specific antivenoms (or even antibodies) targeting specifically the fish venoms

membrane-disturbing toxins and helping in alleviating the major symptoms of scorpionfish envenomation.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - 477514/06-5), DAAD-CAPES (Probral 250/06), INCTTOX (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas) and FACITEC (Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória). We would like to express our gratitude to Dr. Michael Richardson for revising this manuscript. The authors are indebted to M.L.B. Goze for capturing the fishes.

References

Andrich, F., Carnielli, J.B.T., Cassoli, J.S., Lautner, R.Q., Santos, R.A.S., Pimenta, A.M.C., de Lima, M.E., Figueiredo, S.G., 2010. A potent vasoactive cytolysin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon* 56, 487-496.

Boletini-Santos, D., Komegae, E.N., Figueiredo, S.G., Haddad, Jr. V., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., 2008. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. *Toxicon* 51, 585–596

Carlson, R.W., Schaeffer, Jr. R.C., La Grance, R.G., Roberts, C.M., Russell, F.E., 1971. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata* — I. *Toxicon* 9, 379–391.

Carlson, R.W., Schaeffer, Jr., R.C., Whigham, H., Weil, M.H., Russell, F.E. 1973. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata* — II. *Toxicon* 11, 167–180.

Carrijo, L.C., Andrich, F., de Lima, M.E., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Figueiredo, S.G., 2005. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon* 45, 843–850.

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

Chávez-Olórtegui, C., Amara, D.A., Rochat, H., Diniz, C., Granier, C., 1991. *In vivo* protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine* 9 (12), 907-910.

Chen, D., Kini, R.M., Yuen, R., Khoo, H.E., 1997. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. *The Biochemical Journal* 325, 685-391.

Chhatwal, I., Dreyer, F., 1992. Isolation and characterization of Dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. *Toxicon* 30, 87-93.

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

Church, J.E., Hodgson, W.C., 2002a. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon* 40, 787-796.

Church, J.E., Hodgson, W.C., 2002b. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon* 40, 1083–1093.

Church, J.E., Hodgson, W.C. 2003. Stonefish (*Synanceia trachynis*) antivenom: *in vitro* efficacy and clinical use. *Journal of Toxicology, Toxin Reviews* 22 (1), 69-76.

Coats, J.A., Pattabhiraman, T.R., Russell, F.E., Gonzalez, H., 1980. Some physiopharmacologic properties of scorpion fish venom. *Proc West Pharmacol Soc.* 23, 113.

Colasante, P., Meunier, F.A., Kreger, A.S., 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.

Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 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., Grosclaude, J.M., 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., Goudey-Perriere, F., Breton, P., Dewulf, C., Petek, F., Perriere, C. 1995. Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*, Bloch and

Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon* 33, 143-155.

Gomes, H.L., Andrich, F., Mauad, H., Sampaio, K.N., de Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Moysés, M.R., 2010. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon* 55, 580-589.

Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone, P., Yuen, R., Khoo, H.E., Low, K.S., 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 Jr., V., Martins, I.A., Makyama, H.M., 2003. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 42, 79–83.

Haddad Jr., V., Neto, D.G., de Paula Neto, J.B., de Luna Marques, F.P., Barbaro, K.C., 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 (3), 287-94.

Halstead, B.W., 1951. Injurious effects from the sting of the scorpionfish *Scorpaena guttata* with report of a case. *California Med.* 74, 395–396.

Hopkins, B.J., Hodgson, W.C., 1998. Enzyme and biochemical studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) and soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venoms. *Toxicon* 36 (5), 791-793.

Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods* 14, 69–76.

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

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

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lima, C., Bianca, C.P., Piran-Soares, A.A., Tanjoni, I., Moura-Da-Silva, A.M., Lopes-Ferreira, M., 2003. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon* 42 (5), 499-507.

Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K.C., Cardoso, D.F., Moura-Da-Silva, A.M., Mota, I., 1998. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralisation of its toxic activities. *Toxicon*. 36 (2), 405-410.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.I., Faar, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.

Magalhães, K.W., Lima, C., Piran-Soares, A.A., Marques, E.E., Hiruma-Lima, C.A., Lopes-Ferreira, M. 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Toxicon* 47 (5), 575-583.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.K, 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255 – 262.

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, C.H., Yuen, R., Khoo, H.E., Chung, M.C.D., Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone, P., 1991. Purification and partial characterization of Stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 99, 793–798.

Roche, E.T., Halstead, B.W., 1972. Fish Bulletin of the Department of Fish and Game of State of California, vol. 156 pp. 1–49.

Russell, F.E., 1965. In: Russell, F.E. (Ed.), *Advances in Marine Biology. Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals*, vol. 2. Academic Press, London pp. 137–151

Russell, F.E., 1971. *Venom Poisoning. Ration Drug Ther.* 5 (8), 1-7

Saunders, P.R., 1960. Pharmacological and chemical studies of the venom of the stonefish (genus *Synanceja*) and other scorpionfishes. *Ann N Y Acad Sci.* 17, 90, 798-804.

Schaeffer Jr., R.C., Carlson, R.W, Russell, F.E., 1971. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon* 9 (1), 69-78.

Shiomi, K., Hosaka, M., Fujita, S., Yamanaka, H. Kikuchi, T., 1989. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralisation by commercial stonefish antivenom. *Marine Biology* 103 (3), 285-289.

Sivan, G., Venketesvaran, K., Radhakrishnan, C.K., 2007. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon* 50 (4), 563-71.

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

Smith, W.L., Wheeler, W.C., 2006. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *J Hered.* 97(3), 206-217.

Sosa-Rosales, J.I., Piran-Soares, A.A., Farsky, S.H., Takehara, H.A., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2005b. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon* 45(2),155-161.

Sutherland, S.,1983. *Australina Animal Toxins*. Oxford University Press.

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.

White, J., 1995. *Antivenom Handbook*. Melbourne: CSL Ltd.

Figure Captions

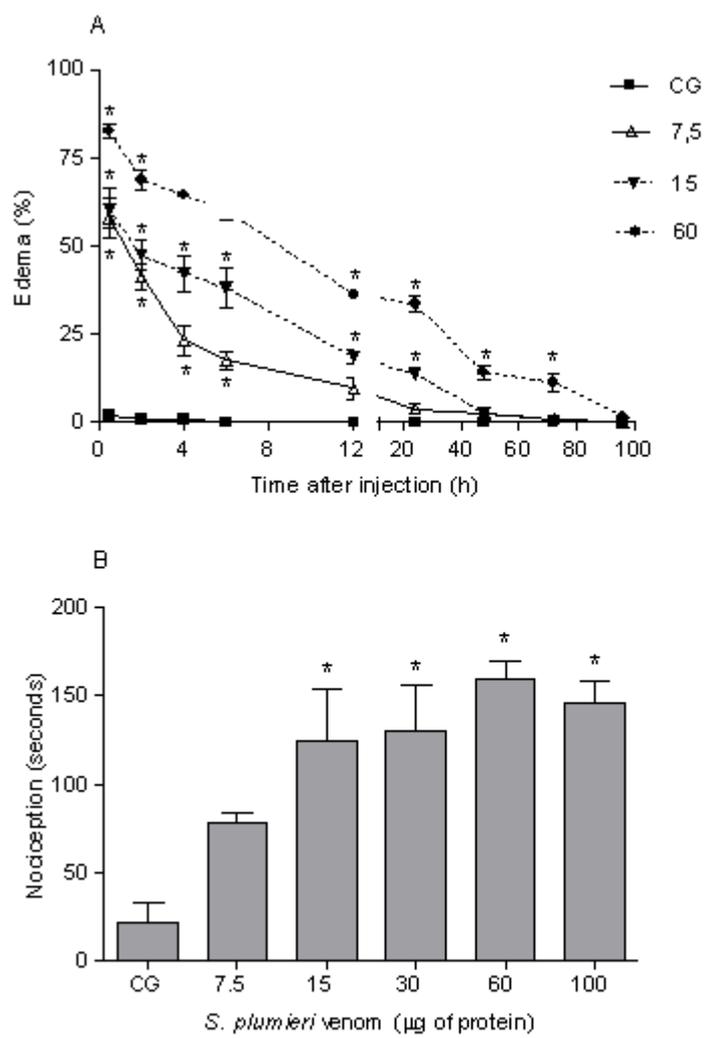
Figure 1. Edematogenic and nociception-inducing activities of *S. plumieri* venom in mice. Different doses of *S. plumieri* venom (SpV) were injected i.pl. route and local edema (A) and nociception (B) were quantified. The results were expressed as percent increase in paw thickness or the amount of time spent licking or biting the injected hind paw. Control-group (CG). * $p < 0.05$ compared with control group.

Figure 2. The effect of stonefish antivenom on edematogenic and nociceptive responses induced by scorpion fish venom in mice hind paw. Sample of *S. plumieri* venom (SpV) were prior incubated with different amounts of stonefish antivenom (SFAV) and than injected (i.pl.) in mice. Local edema and nociception were then quantified. * and # $p < 0.05$ compared with respective 1:0.25 group.

Figure 3. Alterations induced by scorpionfish venom (SpV) observed upon the mean arterial blood pressure - MAP (A) and heart rate HR (B) and the reduced effect of the *in bolus* injection of the venom premixed with stonefish antivenom (SFAV, 1 U/ μ g SpV). * $p < 0.05$ compared to SpV injection alone. Bpm: beats per minute.

Figure 4. Characterization by ELISA of the reactivity of *S. plumieri* venom with *Synanceja* antivenom. Microtiter plates were coated with *S. plumieri* venom. Horse anti-serum-against stonefish venom (●) was tested at a 1:1000 dilution. The pre-immune serum (□) was used as negative control. The reaction was visualized by incubation with peroxidase-coupled anti-horse IgG.

Figure 5. Two-dimensional gel electrophoresis patterns obtained for venom of *Scorpaena plumieri* (SpV). (A) Gel covering pH 3,0 – 10; (B) gel covering pH 4,0 – 7,0; (C) Western immunoblot of SpV with stonefish antivenom (SFAV).

**Figure 1**

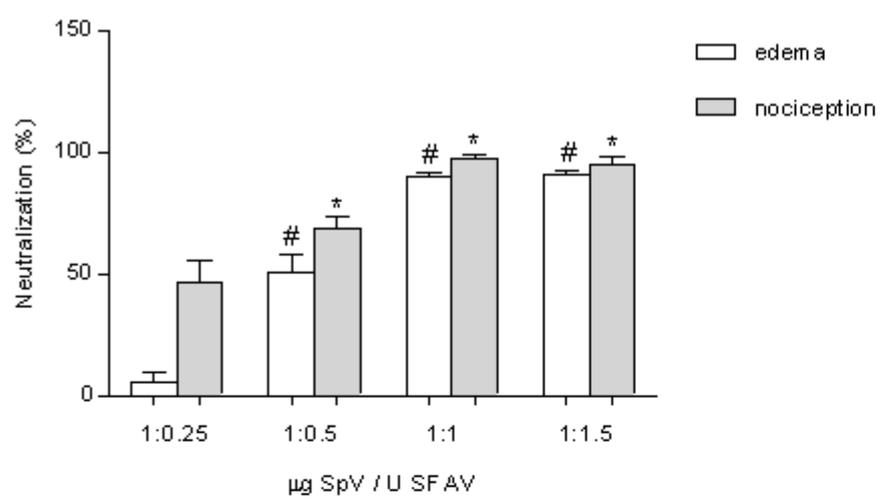
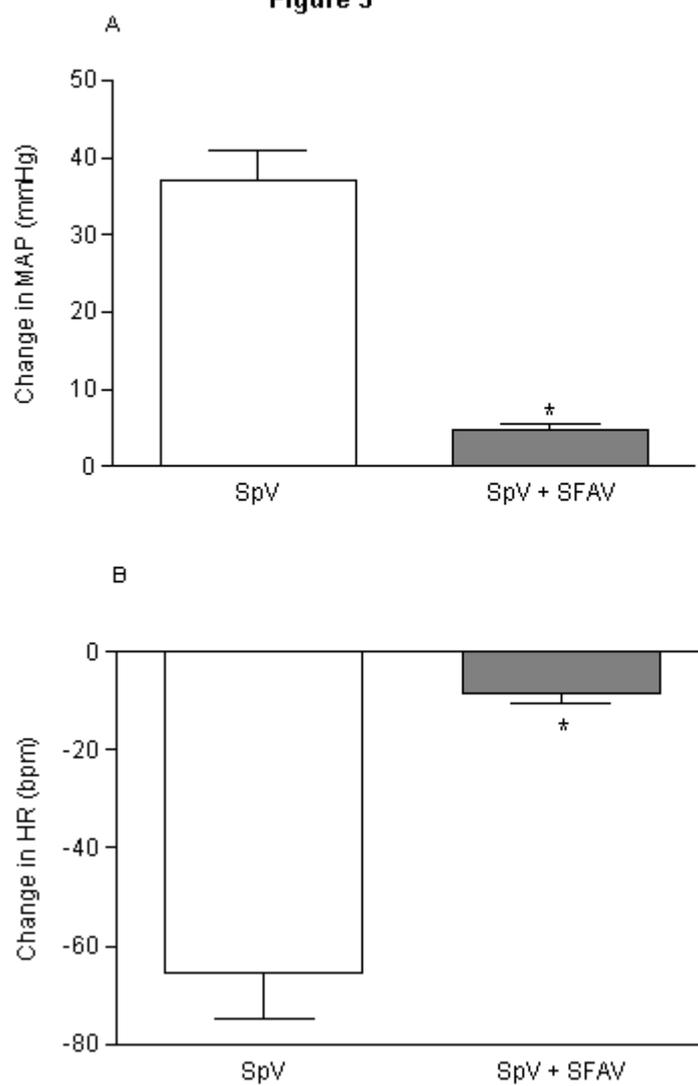
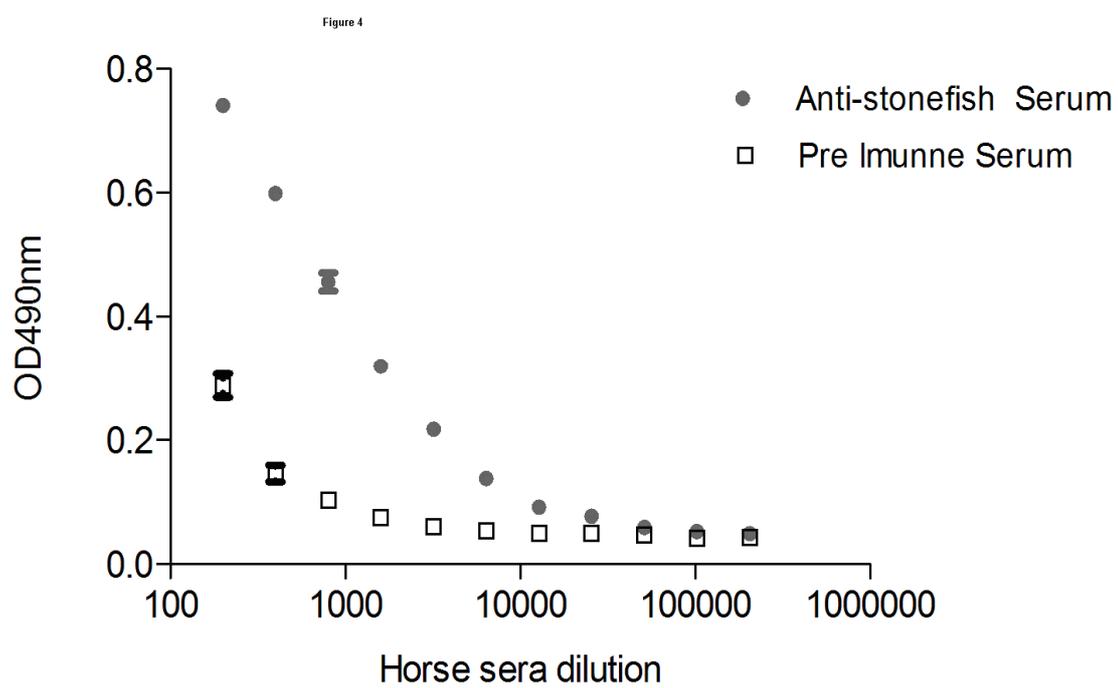
**Figure 2**

Figure 3





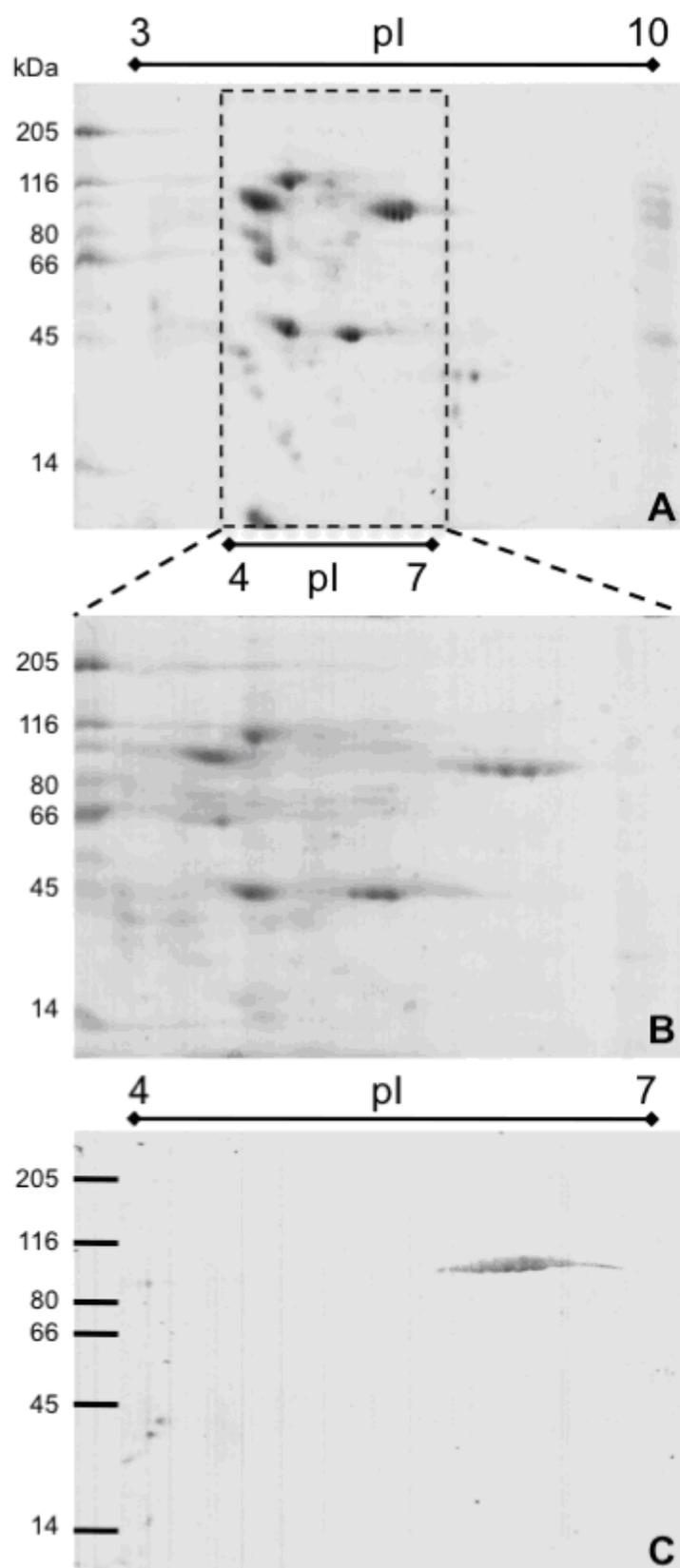


Figure 5