

1. Introdução

O fascínio humano por animais venenosos e seus venenos data da antiguidade e está cercado por fatos místicos. Da lendária serpente que teria causado a morte de Cleópatra, até a cobra "swamp adder" que intriga Sherlock Holmes em "The Adventure of the Speckled Band" de Conan Doyle, criaturas peçonhentas estimulam a imaginação pela ameaça que representam.

Os estudos sobre as peçonhas se iniciaram principalmente com o objetivo de gerar alternativas terapêuticas para as vítimas do envenenamento. Uma das primeiras informações da literatura sobre experimentos com venenos animais foi publicada em 1664 pelo italiano Francesco Redi (1626-1696). Nesse relato o autor descreveu a cor amarelada e a consistência do veneno de serpentes, bem como a morfologia dos seus dentes, narrando minuciosamente suas observações sobre os canais por onde escorre a peçonha (revisado por Brodie, 2009). No Brasil, as investigações sobre as propriedades dos venenos animais datam de 1884. A história da toxinologia neste país foi descrita por Lima, e colaboradores (2010). Os autores relatam que essas primeiras investigações foram conduzidas por João Batista de Lacerda (1846–1915), o qual, em 1884, realizou a coagulação do leite e a dissolução de fibrina e da gema de ovo com veneno de *Bothrops*, ou, como popularmente conhecida, jararaca. Além disso, Lacerda descreveu a deformação e lise de eritrócitos pelo veneno de surucucu (serpente do gênero *Lachesis*).

De Lima e colaboradores relatam ainda que, em 1895, Vital Brazil contribuiu de forma extraordinária para o estudo da toxinologia ao examinar de forma ampla casos de envenenamentos por acidentes ofídicos em Botucatu (São Paulo). Assim, os sintomas do envenenamento por *Bothrops jararaca*, edema hemorrágico e gangrena, e aqueles do envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) que incluem predominantemente sinais neurotóxicos como ptose e asfixia, foram observados.

Apesar de a sintomatologia ter sido o centro inicial das atenções no que se concerne às pesquisas envolvendo peçonhas, o seu potencial biotecnológico tem sido o principal objetivo dos pesquisadores na atualidade. O interesse na procura de novas drogas colocou os venenos animais e suas toxinas como uma das mais promissoras fontes de compostos bioativos naturais.

1.1. Peçonhas

As peçonhas, substâncias tóxicas que são introduzidas na vítima através de aparatos especializados, são constituídas de vários componentes incluindo aminas, alcaloides, aminoácidos, peptídeos, proteínas, sais e minerais (Brodie, 2009). Estes componentes se ligam com alta eficiência a alvos específicos no organismo acometido, desde canais iônicos presentes em tecidos excitáveis até estruturas diversas e complexas dos sistemas cardiovascular e respiratório. A alta especificidade e eficiência fazem destes compostos instrumentos efetivos na manipulação de sistemas fisiológicos podendo originar modelos de novos compostos químicos e farmacêuticos potencialmente patenteáveis, os quais têm sido amplamente utilizados por companhias de pesquisa em bioprospecção. Além disso, contribuem significativamente para o avanço do conhecimento básico dos processos e/ou etapas das respostas fisiológicas.

Em geral, as peçonhas evoluíram de forma independente dentro de linhagens filogenéticas divergentes. Assim, a exata composição do veneno, o aparato peçonhento e o alvo em qual atua, pode variar de forma significativa entre as espécies venenosas ou até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Fry *et al.*, 2009). Porém, as finalidades com as quais as peçonhas são utilizadas não costumam variar, sendo habitualmente empregadas como forma de defesa, predação ou mesmo para dominar um indivíduo da mesma espécie (Russell, 1965).

Acredita-se que os venenos animais surgiram de duplicações gênicas, as quais funcionam como fontes para o surgimento de novas funções (revisado por Conant and Wolfe, 2008). As duplicações gênicas em organismos eucariontes podem surgir durante a replicação do DNA, retrotransposição e “crossingover” desigual. Uma vez duplicado, algumas cópias de certos genes podem ser retidas por seleção natural ou por derivação genética, enquanto outras podem ser perdidas devido ao acúmulo de mutações deletérias (Lynch and Conery, 2000).

Os genes duplicados podem atuar cooperativamente de forma a induzir efeitos sinérgicos na vítima (Kordis and Gubensek, 2000). Por exemplo, o veneno do *Conus purpurascens*, uma espécie de caramujo, causa uma resposta bifásica no peixe vítima do envenenamento. De maneira geral, a primeira fase, induzida por um grupo de toxinas, consiste em choque excitatório impedindo os canais de sódio dependentes de voltagem de se fecharem, aumentando assim o influxo celular deste íon. A segunda fase da resposta, induzida por outro grupo de toxinas, consiste na supressão do circuito motor da presa pela inibição do efluxo celular de potássio. O primeiro grupo de toxinas causa uma notável despolarização da membrana plasmática no local do envenenamento, o que está associado à imobilização da vítima. O segundo grupo de toxinas causa a paralisia irreversível da presa através do bloqueio neuromuscular (Olivera *et al.*, 1985; Terlau *et al.*, 1996).

Tratando-se do filo dos artrópodes, as peçonhas dos animais da classe *Arachnida* (aranhas e escorpiões) são as mais estudadas, tendo em vista o grande número de sequências de aminoácidos de proteínas/peptídeos purificados de peçonhas destes animais depositadas no UniProt (figura 1). A composição química das peçonhas das aranhas é diversa. Além de proteínas e peptídeos, estas peçonhas contêm outros compostos orgânicos de baixo peso molecular, como as acilpoliaminas. Estas provocam uma rápida paralisia na presa, pois agem em receptores ionotrópicos de glutamato pós-

sinápticos de vertebrados e invertebrados, e bloqueiam a sinapse na junção neuromuscular (revisado por Estrada *et al.*, 2007). Dos peptídeos e proteínas presentes nas peçonhas de aranhas, aproximadamente 800 sequências de aminoácidos foram descritas (figura 1). Estes peptídeos possuem efeitos biológicos diversos, sendo que a maior parte modula correntes dos canais para K^+ , Na^+ e Ca^{2+} voltagem-dependentes presentes nos neurônios periféricos ou do sistema nervoso central (Estrada *et al.*, 2007, King, 2007, de Lima *et al.*, 2007).

Como as peçonhas das aranhas, as dos escorpiões também consistem de uma mistura complexa de moléculas bioativas como peptídeos neurotóxicos que também agem em canais iônicos para Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Diversas enzimas (metaloproteinasas, enzimas lipolíticas, lisozima e hialuronidase), nucleotídeos, lipídeos e aminas biogênicas também foram descritos nestas peçonhas (Batista *et al.*, 2007; Rodriguez de la Vega e Possani, 2005; 2004; Soudani *et al.*, 2005; Valdiva e Possani, 1998).

O grupo de animais cujo veneno gera o terceiro maior número de entradas no *UniProt* (figura 1) é o das serpentes. O veneno de serpentes também constitui uma mistura complexa de substâncias apresentando grande proporção de proteases, serinoproteases e metaloproteases. A ação destas enzimas sobre componentes de membrana basal do endotélio vascular, além da ação sobre fatores de coagulação como fibrinogênio e fator Von Willebrand, são as principais responsáveis pela interrupção da hemostasia e pelos efeitos danosos do veneno sobre os tecidos da vítima (Cominetti, 2007; revisado por Takeda *et al.*, 2012).

Assim como as peçonhas dos animais terrestres, as peçonhas de peixes apresentam uma enorme diversidade estrutural quanto farmacológica incluindo enzimas, peptídeos, proteínas, aminas biogênicas e outras substâncias desconhecidas. (Carrijo *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Russell, 1971).

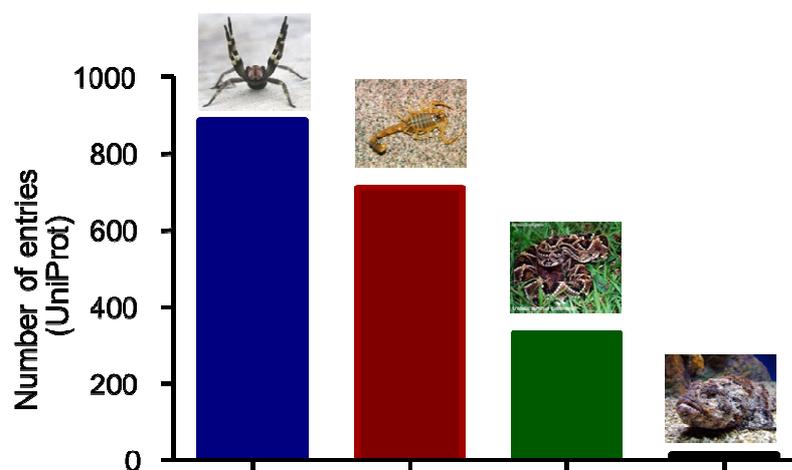


Figura 1 - Número de estruturas primárias de proteínas/peptídeos depositadas no banco de dados *UniProt* para venenos de aranhas, escorpiões, cobras e peixes.

Enquanto que as propriedades dos venenos produzidos por animais terrestres são extensamente investigadas, poucas pesquisas são realizadas com peçonhas de peixes marinhos (figura 1). Isso se deve, comumente, ao diminuto impacto epidemiológico causado por estes animais, à grande dificuldade de obtenção e estocagem do veneno e principalmente à sua extrema labilidade (Schaeffer *et al.*, 1971; Church and Hodgson, 2002a)

1.2. Peixes venenosos

Ao longo do processo evolutivo diversas espécies de peixes desenvolveram táticas eficazes de predação e defesa, incluindo poderosas peçonhas. A produção de veneno pelos animais aquáticos é uma importante estratégia que lhes garante sobreviver em ecossistemas tão competitivos, pois o veneno faz desses animais caçadores ou defensores muito bem sucedidos.

Dentre as espécies de peixes encontradas em ecossistemas de água doce e marinha um grande número é venenoso. De acordo com Russel (1965) apenas 200 espécies de peixes eram reconhecidas como peçonhentas. Entretanto, em uma pesquisa recente de análise filogenética foi demonstrado que mais de 1200 espécies de peixes são peçonhentas (Smith e Wheeler, 2006), representando, portanto, mais de 50% dos vertebrados peçonhentos conhecidos.

Os peixes venenosos marinhos estão classificados na ordem dos peixes-gato (Siluriformes) e em seis ordens de peixes com espinhos raiados: Batrachoidiformes (*Batrachoididae*), Scorpaeniformes (*Scorpaenoidei*) e Perciformes (*Acanthuroidei*, *Blennioidei*, *Percoidei*, *Trachinoidei*). A subordem *Scorpaenoidei* possui uma das histórias naturais melhor documentada, relativa à venomologia de peixes, sendo aquela que contem maior quantidade de espécies com tal característica. Essa ordem é dividida em dois grupos: o grupo dos “sirobins” (inclui duas famílias, *triglidae* e *peristediidae*) e o grupo

dos peixes-escorpião e seus parentes (Halstead, 1966; Nelson, 1984). Estes, por sua vez, estão classificados em doze famílias: Apstidae, Aploactinidae, Caracanthidae, Congiopodidae, Gnathanacanthidae, Neosebastidae, Pataecidae, Scorpaenidae, Sebastidae, Setarchidae, Synanceiidae e Tetrarogidae. Os indivíduos dessas famílias possuem numerosos espinhos e tamanhos corporais variados, que vão de 2 a 100 cm. Comumente apresentam colorações exuberantes que tendem a mimetizar o ambiente em que vivem, como recifes de corais (Smith, 2003). Dentre essas doze famílias, os representantes das famílias Scorpaenidae e Synanceiidae são os mais estudados.

Nestas famílias, o peixe-pedra (*Synanceja*), o peixe-leão (*Pterois*) e o verdadeiro peixe-escorpião (*Scorpaena*) provocam a maioria dos envenenamentos graves em humanos (figura 2). O peixe-pedra do oceano Pacífico e do oceano Índico estão relacionados com uma série de mortes humanas devido às complicações causadas por seus venenos. Os peixes-escorpião são os mais venenosos do Atlântico e frequentemente estão envolvidos em acidentes com humanos no Brasil (Haddad *et al*, 2003; 2004) . Segundo o Catálogo das Espécies de Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil (Buckup e Menezes, 2003) vinte espécies da família Scorpaenidae são encontradas na costa brasileira.

A



B



C



Figura 2 – Espécimes de peixes venenosos em seus habitats naturais. A) Peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Fonte: cifonaouta.cebimar.usp.br. b) Peixe-pedra *Synanceja verrucosa*. Fonte: <http://australianmuseum.net.au/image/Reef-Stonefish-at-Baldwins-Bommie>. C) Peixe-leão *Pterois volitans*. Fonte: <http://australianmuseum.net.au/Common-Lionfish-Pterois-volitans>.

1.3. O peixe-escorpião do Oceano Atlântico

Em meio às espécies pertencentes à família *Scorpaenidae*, as mais ocorrentes no litoral brasileiro são: *Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 (peixe-escorpião preto, figura 3-A) e *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829 (peixe-escorpião vermelho) (Figueiredo e Menezes, 1980; Carvalho-Filho, 1999). Essas duas espécies são distinguidas pela coloração da região axilar das nadadeiras peitorais. O *S. brasiliensis* apresenta pontos negros sobre fundo branco e a espécie *S. plumieri*, cuja peçonha é objeto de nosso estudo, possui pontos brancos sobre fundo negro (figura 3-B).

Estas duas espécies são características de águas tropicais, costeiras e rasas, com fundo coralino ou rochoso. Apresentam hábitos bentônicos, são solitários e territorialistas, nadam pouco, costumam ficar parados mimetizando o ambiente e se alimentam de peixes menores e pequenos crustáceos. O aparato de veneno dos peixes-escorpião *Scorpaena* consiste de treze espinhos dorsais, dois pélvicos e três anais (Moyle e Cech, 1996). Os espinhos são grandes, fortes e pontudos e cobertos por uma bainha tegumentar moderadamente grossa (figura 4-A). As glândulas veneníferas do peixe-escorpião são encontradas nas cavidades anterolaterais destes espinhos, em uma camada alongada e fusiforme de tecido acinzentado (figura 4-B) (Haddad, 2000; Russel, 1965), diferente do peixe-pedra que possui glândulas de veneno pronunciadas (figura 4-C).

Os peixes-escorpião utilizam sua peçonha com o propósito de defesa (Gwee *et al*, 1994; Church e Hodgson, 2002a) e geralmente o envenenamento ocorre por pressão mecânica ao serem pisados. Os espinhos tornam-se eretos, perfuram os tecidos da vítima e a bainha tegumentada é rompida ou deslocada para baixo, permitindo que a peçonha

A



Figura 3 - O peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. A) Vista lateral, destaque para os espinhos na região do dorsal do animal. B) Vista ventral, destaque para as manchas, características da espécie, da região axilar do animal.

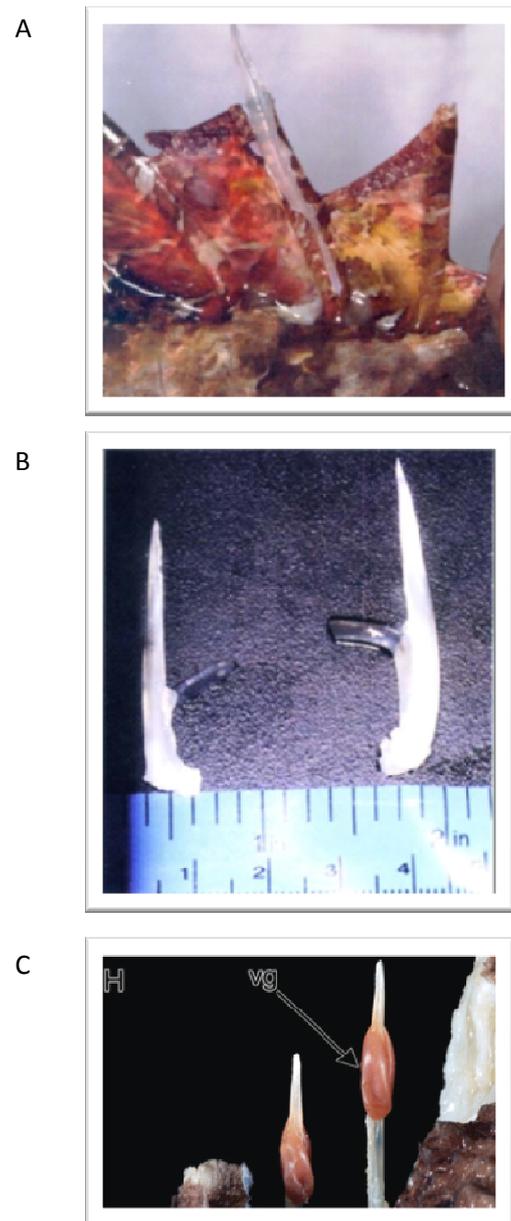


Figura 4 - Aparato peçonhento de peixe-escorpião e de peixe-pedra. A) Espinhos no dorso do peixe *S. plumieri* revestidos pela membrana tegumentar. B) Espinhos dorsais dissecados do peixe escorpião *Scorpaena plumieri* mostrando o tecido acinzentado produtor de peçonha. Fonte: Haddad Jr. 2000. C) Espinhos dorsais dissecados do peixe-pedra *Synanceia verrucosa* com glândula produtora de veneno pronunciada (vg) Fonte: Smith e Whiler, 2006.

penetre no ferimento (Gwee *et al* , 1994; Haddad *et al* 2003, Halstead, 1951; Roche e Halstead, 1972; Russel, 1965; Schaeffer *et al* 1971).

Os sintomas do envenenamento provocados por esses peixes incluem, em geral, manifestações locais, como dor, edema, eritema, necrose e sistêmicas tais como febre, sudorese, agitação, diarreia e distúrbios respiratórios (Haddad *et al*, 2003; Kizer *et al*, 1985). Entretanto, o principal efeito dessas peçonhas é sobre o sistema cardiovascular e neuromuscular (Calrson *et al*, 1971; Carrijo *et al.*, 2005; Church and Hodgson, 2002b; Gwee *et al*, 1994).

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

1.4. Principais atividades farmacológicas induzidas por venenos písceos

A maioria dos estudos descrevendo as propriedades biológicas e químicas dos venenos de peixes são principalmente focados nos peixes-pedra *Synanceja trachynis*, *S. horrida*, *S. verrucosa* (Austin *et al.*, 1961; Church and Hodgson, 2000a; 2000b; Garnier *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 1994; Kreger, 1991; Kreger *et al.*, 1993; Liew *et al*, 2007; Low *et al.*, 1990; Poh *et al.*, 1991; Saunders, 1959; Saunders *et al.*, 1962; Wang *et al*, 2007) e no peixe-leão *Pterois volitans* (Choromansky *et al.*, 1984; Church and Hodgson, 2002b; Cohen and Olek, 1989; Nair *et al.*, 1985; Saunders, 1959;). Estes estudos revelaram que essas peçonhas induzem uma gama de atividades farmacológicas que incluem toxicidade e letalidade, efeitos inflamatórios, neuromusculares, citolíticos e cardiovasculares.

A letalidade e toxicidade das peçonhas de peixes variam entre diferentes espécies (tabela 1). As peçonhas dos peixes *Synanceja* ($LD_{50}= 0,30 \mu\text{g/Kg}$, i.v.) são extremamente tóxicas e até mesmo letais quando comparadas com as do *Scorpaena plumieri* ($LD_{50}= 0,28 \text{ mg/Kg}$, i.v.) e do *Pterois volitans* ($LD_{50}= 42,5 \mu\text{g/Kg}$ i.p.) (Carrijo *et al.*, 2005; Poh *et al.*, 1991). Entretanto, como descrito anteriormente, uma característica comum entre os venenos písceos, é a extrema labilidade e, assim, algumas de suas atividades biológicas são perdidas com o armazenamento. Este fato dificulta a comparação entre as atividades farmacológicas dessas peçonhas, pois diferentes métodos de extração e estocagem são descritos na literatura.

1.4.1. Atividade inflamatória

Os venenos de peixes são capazes de induzir resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais e no envenenamento humano, sendo que a formação de edema, eritema e a presença da dor são sinais e sintomas constantemente observados.

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

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

Tabela 1 – Algumas propriedades de peçonhas de peixes e de suas toxinas de peixes.

Espécie	DL ₅₀ da peçonha	Toxina purificada	Aspectos estruturais	Atividade	Referencias
<i>Synanceja horrida</i>	0,30µ/Kg (i.v)	Stonustoxina (SNTX)	148 kDa composta por duas subunidades α (71 kDa) e β (79 kDa), pI 6.9	Toxina letal Cardiovascular, hemolítica, neuromuscular, nociceptiva, edematogénica.	Khoo <i>et al</i> , 1991 Low <i>et al</i> , 1994; Poh <i>et al</i> , 1993. 1991
		SFHYA1	52 kDa Glicoproteína, pI 9.2	Hialuronidásica	Poh <i>et al</i> , 1992,
<i>Synanceja trachynis</i>	1,60mg/Kg (i.p)	Trachynilysina (TLY)	158 kDa composta por duas subunidades α (76 kDa) e β (83 kDa), pI 5.7	Toxina letal Cardiovascular, hemolítica, neuromuscular, edematogénica.	Kregeer, 1991; <i>et al</i> , 1997. Colassante <i>et al</i> 1996
<i>Synanceja verrucosa</i>	2,5µg/Kg (i.p)	Verrucotoxina (VTX)	322 KDa composta por duas subunidades 2α (83 kDa) e 2β (78 kDa) Glicoproteína	Toxina letal - LD50 < 40 ng/g (i.v. camundongo). Cardiovascular, hemolítica.	Garnier <i>et al</i> , 1995
		Neoverrucotoxina (neoVTX)	166 kDa composta por duas subunidades α (75 kDa) e β (80 kDa)	Toxina letal Hemolítica	Ueda <i>et al</i> , 2006
		<i>S. verrucosa</i> hyaluronidase	463 resíduos de aminoácidos	Hialuronidásica	Madokoro, <i>et al.</i> , 2011
<i>Pterois volitans</i>	42,5µg/Kg (i.p)	peptídeo FV	7.6 kDa	Indutora seletiva de apoptose em células neo-plásicas.	Balasubashin <i>et al</i> , 2006.
		Patoxin	Dimérica, subunidade α (699 resíduos de aminoácidos) β (698 resíduos de aminoácido).	Toxina hemolítica e letal	Kiriake e Shiomi, 2011.
		Pvtoxin	Dimérica, subunidade α (699 resíduos de aminoácidos) β (698 resíduos de aminoácido).	Toxina hemolítica e letal	Kiriake e Shiomi, 2011.
<i>Scorpaena plumieri</i>	0,28mg/Kg (i.v)	Sp-GP	80 kDa	Proteolítica (Gelatinolítica).	Carrizo <i>et al</i> , 2005
		Sp-H	76.92 kDa , glicoproteína	Hialuronidásica	Cassoli, 2008
		Sp-CTx	121 kDa, glicoproteína	Vascular, toxina hemolítica	Andrich <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1 - Continuação

<i>Trachinus draco</i>	1,80 µg/Kg (i.v)	Dracotoxina	105 kDa	Toxina letal hemolítica, neuromuscular	Chhatwal, I., Dreyer; 1992
<i>Trachinus vipera</i>	-	Trachinina	324 kDa composta por duas subunidades (81 kDa) cada	Toxina letal	Perriere <i>et al</i> , 1988
<i>Nothestes robusta</i>	-	Nocitoxina	170 kDa	Nociceptiva.	Hahn e O'Connor, 2000.
<i>Plotosus canius</i>	3,90mg/Kg	Toxina-PC	15 kDa	Letal, Cardiotóxica, hemolítica, neuromuscular.	Auddy <i>et al</i> , 1994; 1995
<i>Scatophagus argus</i>	9,30mg/Kg (i.v)	SA-HT	18 kDa	Neuromuscular, hemorrágica, nociceptiva, edematogénica	Karmakar <i>et al</i> , 2004; Muhuri <i>et al</i> 2005
<i>Tlassophyne maculosa</i>	4,93mg/Kg (i.p)	TmC4-47.2	15161 Da 15154 Da	Neuromuscular, miotóxica	Sosa-Rosales <i>et al</i> , 2005b
<i>Talassophryne nattereri</i>	4,54mg/Kg (i.p)	Família Natterin 1, 2, 3, 4	~ 35 - 38kDa	Proteolítica Edematogénica, Nociceptiva	Magalhães <i>et al</i> , 2005; Lopes- Ferreira 1998; 2004.

Adaptado de Figueiredo et al., 2009. Em: Animal Toxins: State of the Art.

demonstram que o envenenamento induz infiltração de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos. Magalhães e colaboradores (2006) descreveram resposta inflamatória, edematogênica, nociceptiva, infiltração leucocitária e aumento da adesão de células ao endotélio do músculo cremaster após a aplicação dos venenos dos peixes *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi*. Resposta semelhante foi encontrada com a administração do veneno do peixe *Scatophagus argus* na cavidade peritoneal e na pata de camundongos. (Ghafari *et al.*, 2013; Sivan *et al.*, 2010)

A capacidade de induzir resposta inflamatória foi igualmente descrita para o veneno do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Em camundongos, o envenenamento por este peixe resulta no acúmulo da peçonha nas vias aéreas e inicia uma resposta inflamatória pulmonar sustentada, caracterizada por infiltrado neutrofilico, áreas de hemorragia pulmonar, edema e ativação de macrófagos alveolares dentro de 24h após a administração do veneno. Essas modificações histopatológicas estão associadas ao aumento agudo da concentração de proteínas do líquido bronquialveolar e indução de citocinas, quimocinas e metaloproteinases nos pulmões (Boletini-Santos *et al.*, 2008).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa também relatou o efeito do veneno de *S. plumieri* sobre a resposta inflamatória. Quando administrado por injeções intraplantares em camundongos, induz um aumento sustentado da espessura das patas devido à formação de edema na derme do local da injeção. Observa-se também a presença de dor, vermelhidão, e aumento da concentração de leucócitos, MCP-1, TNF e IL-6, caracterizando a reação inflamatória. O tratamento prévio dos animais com inibidor de serinoproteases (aprotinina) ou com antagonista do receptor B2 de bradicinina (HOE-140) reduziu significativamente a resposta edematogênica, demonstrando o envolvimento direto do sistema caliceína-cinina no efeito pró-inflamatório induzido por esta peçonha (Menezes *et al.*, 2012)

1.4.2. Atividade Neuromuscular

Em adição às respostas inflamatórias, alguns sintomas clínicos observados após o envenenamento por peixes demonstram evidências de atividade neurotóxica destes venenos. Muitos sintomas neurotóxicos, incluindo paralisia dos membros, fraqueza muscular, cessação respiratória, piloereção, movimentos rotacionais e convulsões violentas, são observados quando os venenos dos peixes *P. volitans*, *S. plumieri*, *T. nattereri*, *G. marmoratus*, *P. lineatus*, *S. trachynis* e *S. verrucosa* são administrados em animais experimentais (Schaeffer *et al.*, 1971; Nair *et al.*, 1985; Carrijo *et al.*, 2005; Lopes-Ferreira *et al.*, 1998;).

A atividade neuromuscular do veneno de peixe-pedra *S. trachynis* foi caracterizada por microscopia eletrônica e por estudos eletrofisiológicos em músculo isolado de rã. Baixas concentrações do veneno atuam pré-sinápticamente causando a liberação e depleção dos neurotransmissores do terminal nervoso. Essa resposta, além de requerer a presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} , é resistente à tetrodotoxina e à neurotoxina botulínica, indicando que a liberação de acetilcolina ocorre através de um mecanismo que não envolve exocitose. Contudo, altas concentrações do veneno atuam pós- e pré-sinápticamente causando despolarização irreversível da membrana muscular e mudanças patológicas acompanhadas de prejuízo aos terminais nervosos e às fibras musculares (Kreger *et al.*, 1993). Hopkins e colaboradores (1994) usando o veneno do *S. trachynis* sugeriram que esta peçonha induz a liberação de acetilcolina, substância P e produtos da ciclo-oxigenase ou contém componentes que atuam diretamente nos receptores dessas moléculas. Foi demonstrado também que o veneno do *S. horrida* pode estimular a liberação de acetilcolina no cérebro de ratos além de afetar a síntese de neurotransmissores inibindo a recaptação dos precursores dessas substâncias (Khoo *et al.*, 1992).

Estudos com a peçonha dos peixes *G. marmoratus* e *P. volitans* revelam atividades neuromusculares pronunciadas. A atividade neuromuscular do veneno do *G. marmoratus* envolve a participação dos receptores muscarínicos sugerindo a presença ou a capacidade de liberação de neurotransmissores desse veneno. O veneno do *P. volitans* induz fibrilação muscular seguida de bloqueio da transmissão neuromuscular (Cohen e Olek, 1989; Kreger *et al.*, 1993; Colasante *et al.*, 1996; Church *et al.*, 2003).

1.4.3. Atividade hemolítica e citotóxica

Além dos efeitos neuromusculares, outra propriedade das peçonhas de peixes é a marcante atividade hemolítica *in vitro*. Um potente efeito citolítico sobre eritrócitos já foi demonstrado para o veneno dos peixes *S. verrucosa*, *T. draco*, *S. plumieri*, *T. nattereri*, *P. volitans*. (Chhatwal e Dreyer, 1992; Kreger, 1991; Poh *et al.*, 1991; Carrijo *et al.*, 2005). Essa atividade hemolítica parece ser espécie-específica. O veneno do *S. guttata* produz hemólise sobre eritrócitos de ovelha (Carlson *et al.*, 1971). Já os venenos do *T. nattereri* e do *N. robusta* induzem hemólise em camundongos e humanos, respectivamente (Hahn e O'Connor, 2000; Sivan *et al.*, 2007). A peçonha do peixe *T. draco* apresenta marcante atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho, mas fraca atividade sobre eritrócito bovino e de camundongo, não induzindo hemólise nos eritrócitos humanos e suínos (Chhatwal e Dreyer, 1992). Outras peçonhas com potente ação hemolítica são aquelas dos peixes-leão *Pterois volitans*, *P. lunulata* e *P. antennata* (Kiriake e Shiomi, 2011).

Devido à ausência de atividade fosfolipásica (A2) nesses venenos, a atividade hemolítica pode ser atribuída a hemólise direta (Khoo *et al.*, 1992, Hopkins e Hodgson 1998, Lopes-Ferreira *et al.*, 1998, Sivan *et al.*, 2007). Para ação hemolítica do veneno do *T. draco* é sugerido uma ligação do componente hemolítico a uma proteína receptora na superfície dos eritrócitos (Chhatwal e Dreyer, 1992).

Alguns relatos demonstram que os venenos de peixes possuem ação citolítica também em outros tipos celulares. O veneno do peixe-gato *P. lineatus* é citotóxico para células do tumor- Ascites de Ehrlich (Fahim *et al.*, 1996). Os venenos do *Hypodytes rubripinnis* e *S. verrusa* apresentam atividade mitogênica e citotóxica sobre células esplênicas e leucêmicas P388 de murinos (Satoh *et al.*, 2002).

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

1.4.4. Atividade cardiovascular

A atividade cardiovascular certamente é o efeito dominante e mais potente das peçonhas de peixes e historicamente tem sido o objetivo da maioria das pesquisas. Estudos *in vivo* revelam que os venenos dos peixes produzem, em sua maioria, efeito bifásico (revisado por Church e Hosgson, 2002a).

O veneno do peixe-gato *Heteropneustes fossilis* produz resposta hipotensiva em gatos anestesiados, a qual não é afetada por bloqueio dos receptores muscarínicos e histamínicos (Datta *et al.*, 1982). Este veneno também induz efeito inotrópico positivo sobre corações isolados de cobaias. Resposta hipotensiva também é gerada pelo veneno do peixe *P. motoro*, efeito atribuído à ativação de receptores muscarínicos e intensa vasodilatação periférica (Rodrigues *et al.*, 1972). O veneno do peixe-leão *P. volitans* também produz resposta hipotensiva relacionada com a formação de NO e ativação de receptores muscarínicos em coelhos (Church e Hodgson, 2000c). Em átrios isolados de

rato este veneno produz resposta cronotrópica positiva acompanhada por resposta inotrópica negativa seguida de positiva (Church e Hodgson, 2000c).

Diferente do veneno do *P. volitans*, o veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) produz hipertensão em coelhos e ratos anestesiados. Essa resposta é bifásica, constituída de uma resposta pressora menor, seguida de outra resposta pressora maior e sustentada. A primeira fase é atenuada por bloqueadores dos receptores adrenérgicos, porém os mecanismos envolvidos na segunda fase ainda não foram esclarecidos (Hopkins et al., 1996). Esses resultados, entretanto, foram atribuídos à utilização do veneno degradado, e experimentos posteriores com o veneno “in natura” do peixe *S. trachynis* demonstraram que a primeira fase da resposta é na verdade constituída de resposta hipotensora (Hopkins et al., 1996, Church e Hodgson, 2000a). Contudo, em cachorros anestesiados o veneno do *S. trachynis* induziu primeiro uma resposta hipertensora para depois induzir a resposta hipotensora (Weiner, 1959). Estudos com veneno do peixe-pedra de outra espécie (*S. horrida*) também demonstram resposta hipertensora seguida de resposta hipotensora (Austin et al., 1961).

Em preparações *in vitro*, a peçonha do *S. horrida* induz respostas cronotrópica e inotrópica negativas sobre corações isolados de ratos (Austin et al., 1961), enquanto que a peçonha do *S. verrucosa* e do *S. trachynis* produz efeitos inotrópico e cronotrópico positivo sobre átrios de ratos, os quais são reduzidos pelo propranolol (Church e Hodgson, 2000a; Hopkins et al., 1994; 1996; Sauviat et al., 1995).

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

A resposta bifásica também é observada em estudos que utilizam o veneno do peixe *G. marmoratus* (Hopkins e Hogson, 1998). A fase hipotensora não é alterada pela atropina, entretanto, é atenuada pelo bloqueio da produção de NO e da ação da ciclooxigenase, evidenciando a participação da vasodilatação periférica na resposta. Por outro lado, os mecanismos envolvidos na fase hipertensora não foram elucidados (Hopkins e Hogson, 1998).

O veneno do peixe-escorpião *Scorpaena guttata* também gera resposta bifásica em coelhos, gatos, e cachorros. Porém, diferente do efeito causado pelo veneno do *G. marmoratus*, a atropina é eficiente no bloqueio da fase hipotensora (Carlson et al., 1973). Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu os efeitos cardiovasculares veneno do peixe-escorpião *S. plumieri* em ratos. Doses de 108 a 338 mg/kg deste veneno induzem efeito pressórico caracterizado pelo aumento da pressão arterial média. Entretanto, quando doses maiores (338 mg/kg) são administradas observa-se uma resposta bifásica constituída de aumento inicial seguido de redução pronunciada da pressão até a morte do animal. Concomitante ao efeito sobre a pressão arterial, também é observado taquicardia seguida de bradicardia quando as menores doses do veneno são administradas (Gomes et al., 2010).

Sobre corações isolados de ratos, o veneno do *S. plumieri* induz efeito cronotrópico, inotrópico e lusitrópico positivos, além de induzir o aumento da pressão coronariana de perfusão. Todos esses efeitos são reduzidos na presença do beta-bloqueador propranolol o que sugere a participação do sistema adrenérgico nessas respostas (Gomes et al., 2010).

1.5. Toxinas purificadas de veneno písceos

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

A stonustoxina (SNTX – Stonefish National University of Singapore), a traquinilisina (TLY), a verrucotoxina (VTX) e a neoverrucotoxina (NeoVTX) foram isoladas da peçonha dos peixes-pedra *S. horrida*, *S. trachynis* e *S. verrucosa* respectivamente. Essas são as toxinas mais estudadas de peçonhas de peixes e algumas características estruturais e propriedades farmacológicas foram descritas (Colasante *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1995; 1997; Ghadessy *et al.*, 1996; Kreger, 1991; Poh *et al.*, 1991) (tabela 1).

Com exceção da VTX, que é uma proteína tetramérica, essas toxinas são proteínas diméricas. A estrutura primária das subunidades de SNTX, NeoVTX e da subunidade β da VTX foram deduzidas através da clonagem e sequenciamento do cDNA. Embora a completa sequência de aminoácidos da TLY não tenha sido determinada, os primeiros 37 resíduos da região N-terminal de uma das subunidades são idênticos aos encontrados nas outras três toxinas (Colassante *et al.*, 1996), demonstrando a semelhança estrutural entre elas.

A primeira toxina purificada de peçonha de peixe e melhor caracterizada em nível molecular foi a SNTX. Essa toxina letal (DL_{50} 17 ng/g i.v em camundongo) possui implicações, hemolíticas, neuromuscular, nociceptiva, edematogênica e cardiovasculares.

A intensa hipotensão é considerada a causa primária da morte atribuída a SNTX (Khoo *et al.*, 1992, Low *et al.*, 1993, 1994). Esse efeito parece estar relacionado com as

células endoteliais vasculares e liberação de óxido nítrico, juntamente com ativação de canais de potássio que causam vasorelaxamento (Sung *et al.*, 2002).

A TLY também possui atividade hemolítica e, além desta atividade, esta toxina possui efeito cardiovascular que parece estar associada à liberação de acetilcolina nos terminais nervosos atriais, promovendo efeito inotrópico negativo e alterações na atividade de vários canais de transporte catiônico no músculo atrial de rãs (Sivan *et al.*, 2000; Ouanounou *et al.*, 2002). A NeoVTX e a VTX também exercem efeitos cardiovasculares, hemolíticos e também são letais (Garnier *et al.*, 1995, 1997).

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

Do veneno dos peixes-leão *P. volitans* e *P. antennata* foram isoladas duas toxinas (Pvtoxina e Patoxina, respectivamente) as quais são letais e apresentam atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelhos. A Patoxina é quatro vezes mais letal que a Pvtoxin, porém, é menos potente levando o efeito hemolítico em consideração.

Recentemente, Andrich e colaboradores (2010) isolaram a toxina hemolítica da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, referida como *Scorpaena plumieri* Citotoxic Toxin, ou Sp-CTx. Os autores descreveram que essa toxina é uma glicoproteína dimérica de alto peso molecular (120 kDa) constituída de duas subunidades de aproximadamente 65 kDa cada. A Sp-CTx apresenta atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho, sendo que esse efeito foi reduzido quando a toxina foi previamente incubada com o anti-veneno para o peixe –pedra, SFAV (do inglês, *StoneFish Anti-Venom*). Outra atividade relatada foi a resposta bifásica induzida pela Sp-CTx sobre anéis de aorta de ratos, caracterizada por

um relaxamento inicial associado à produção de óxido nítrico, seguido de aumento da tensão de contração.

A tabela 1 mostra dados farmacológicos e bioquímicos de toxinas purificadas de peçonhas de peixes. Outras atividades, além das descritas acima, também foram demonstradas. Um peptídeo, o FV (7,6 kDa), com atividade antitumoral, antimetastático e hepatoprotetiva foi purificado da peçonha do *Pterois volitans* (Sri Balasubashini *et al*, 2006). Duas miotoxinas, a TmC4 - 7.2 e a AS-HT de 18 kDa, foram purificadas de *T. maculosa* e do *Scatophagus canius*, respectivamente. Essas toxinas possuem, além da atividade muscular, atividade hemorrágica e nociceptiva (Karmakar *et al*, 2004; Sosa-Rosales *et al*, 2005).

Adicionalmente às toxinas listadas acima, algumas atividades enzimáticas são encontradas nas peçonhas de peixes. Uma enzima proteolítica, a Sp-GP, (80 kDa) e a hialuronidase Sp-H, (76 kDa) foram purificadas do veneno do peixe-escorpião *S. plumieri* (Carrijo *et al*, 2005, Cassoli, 2008). A presença de enzimas pode estar associada com alguns dos efeitos locais observados nas vítimas de envenenamento, como dor intensa, edema, eritema e necrose. Essas enzimas são consideradas importantes fatores de dispersão, capazes de hidrolisar constituintes da matriz extracelular de tecidos conectivos.

Como já mencionado, a principal atividade das peçonhas de peixes é sobre o sistema cardiovascular, alterando a contratilidade muscular cardíaca e lisa. Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da Sp-CTX, bem como algumas de suas características bioquímicas, não foram elucidados. Sendo assim, o presente trabalho consta na caracterização bioquímica e farmacológica desta citolisina.

Considerando que o assunto explorado nesse trabalho é a atividade cardíaca do veneno do *S. plumieri* e da Sp-CTX, a seguir temos uma breve revisão sobre os mecanismos envolvidos na contratilidade e no processo de acoplamento excitação-contracção miocárdica.

1.6. O coração

Claudius Galenus, considerado “o pai da fisiologia experimental”, no ano de 2000 AD já conhecia a função do coração de bombear o sangue. Entretanto, o conceito moderno da fisiologia cardíaca foi baseado na publicação de William Harvey realizada séculos mais tarde, em 1628. Esta publicação, intitulada de “Anatomical treatise on the motion of the heart and blood in animals”, talvez seja o mais importante tratado na história da cardiologia. De acordo com Shepherd e Vanhoutte (1979), os conceitos de Harvey ofereceram fundamentos para a nossa atual compreensão sobre os fenômenos basais da circulação.

O coração é um órgão muscular dividido em duas metades, direita e esquerda, por um septo dirigido obliquamente, e cada uma das metades apresenta duas cavidades denominadas de átrio e ventrículo. A superfície interna dos ventrículos é marcadamente irregular em virtude da presença de projeções de feixes musculares, que podem apresentar-se sob a forma de cristas, de pontes e de pilares. As mais evidentes são as que se apresentam como pilares cônicos e são denominadas músculos papilares. As células musculares do coração (cardiomiócitos) correspondem à maior parte da massa e volume cardíacos e são responsáveis por gerar a força de contração. O restante se constitui basicamente de marca-passo, tecido de condução, vasos sanguíneos, matriz extracelular e fibroblastos (revisado por Sirker e Shah, 2002).

O suprimento sanguíneo no coração é fornecido pelas artérias coronárias, localizadas no epicárdio. Estas se ramificam em artérias menores que penetram no miocárdio até se dividirem em capilares. As células endoteliais dos capilares das coronárias estão intimamente associadas aos cardiomiócitos. Esta camada endotelial além de revestir as coronárias também modula a função cardíaca através da liberação de diferentes fatores como o óxido nítrico e endotelina (Brenner *et al.*, 1989; Vane *et al.*, 1990; Vanhoutte, 1989 e revisado por Marti *et al.*, 2012).

Os fibroblastos são as células mais numerosas do coração e são responsáveis pela produção contínua da matriz extracelular. Esta matriz, formada principalmente por colágeno do tipo I e III, fornece suporte estrutural para os componentes celulares do coração, e também permite a propagação apropriada das forças mecânicas geradas pelos cardiomiócitos (revisado por Zeisberg *et al.*, 2010).

Os cardiomiócitos estão conectados uns aos outros através de junções especializadas do tipo GAP, formadas por proteínas da família de conexinas. Essa conexão providencia o acoplamento elétrico entre essas células e permite a propagação do potencial de ação para cardiomiócitos adjacentes pelo movimento citoplasmático de íons, o que é vital para a contração sincronizada destas células (revisado por Salameh e Dhein, 2013).

1.6.1. As propriedades eletrofisiológicas do coração e o acoplamento excitação- contração.

O potencial de ação cardíaco é um evento de membrana que ocorre de forma transiente com duração variando de 200 a 800 milissegundos, de acordo com os diferentes tipos de miócitos. Este potencial de ação é dividido em cinco fases: fase zero, ou fase de despolarização; fase 1, ou fase de repolarização inicial; fase 2, também referida como platô, fase 3, ou fase de repolarização tardia e fase 4, ou retorno ao potencial de repouso. Correntes iônicas específicas (I_{Ca} , I_k e I_{Na}) contribuem para cada fase do potencial e para sua magnitude (Morad e Tung, 1982).

Resumidamente, ao longo da fase 4, durante o relaxamento muscular (diástole), a corrente efetiva transmembrana, nas células que não possuem propriedade de marca-passo, é determinada principalmente pela corrente de efluxo I_{K1} , e também pelo balanço entre as discretas correntes “background” que incluem as correntes geradas pelos trocadores Na^+/K^+ e Na^+/Ca^{2+} (NCX). Como resultado, o potencial de repouso da

membrana é usualmente vários milivolts mais positivo do que potencial de equilíbrio do K^+ (≈ -95 mV) e muito mais negativo que o potencial de equilíbrio do Na^+ e Ca^{2+} ($> +70$ mV) nas concentrações fisiológicas.

A fase 0, ou despolarização, é normalmente iniciada pela propagação de uma corrente passiva de uma região ativa a qual pode levar a célula a um ponto limiar onde um número suficiente de canais de Na^+ são ativados de tal forma que a corrente de influxo deste íon (I_{Na}) exceda a I_K (Morada e Tung, 1982; Roden e George, 1997). A rápida elevação do potencial é basicamente devida à ativação regenerativa da I_{Na} , ou seja, a abertura dos canais de sódio leva a uma conseguinte despolarização que, por sua vez, ativa canais de Na^+ adicionais. A fase 1 do potencial de ação está associada a diversos fatores. Entre eles a inativação da I_{Na} e a ativação da I_{to} , corrente de efluxo de K^+ ativada por voltagem. A fase 2, durante a qual o potencial de membrana não muda rapidamente, é caracterizada principalmente pela corrente de influxo de cálcio do tipo-L (I_{caL}) que culmina na contração cardíaca. O Ca^{2+} entra no citoplasma via canais ativados por despolarização, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação característico de miócitos ventriculares. A fase 3 tem início quando o efluxo de K^+ começa a exceder o influxo de Ca^{2+} e pelo menos três correntes (I_{to} , I_K e I_{K1}) contribuem para a repolarização final (revisado Jaye *et al.*, 2010).

A participação do Ca^{2+} na contração cardíaca já havia sido descrita por Sydney Ringer em 1883 e atualmente, o papel deste íon neste processo é bem estabelecido (revisado por Bers, 2002). Os miofilamentos são os responsáveis pelo processo de contração e relaxamento muscular e são constituídos por filamentos grossos, contendo actina, e filamentos finos, contendo miosina, e pelos componentes contráteis do citoesqueleto (Page *et al.*, 1971; Page, 1978). Cada filamento grosso é constituído por aproximadamente 300 moléculas de miosina, e outras proteínas tais como a titina e a proteína C. Cada cadeia pesada de miosina tem uma longa cauda α -helicoidal, que forma

o eixo principal do filamento grosso, e uma cabeça globular (Warshaw, 1996). As cabeças de miosinas formam as chamadas pontes cruzadas com a actina para a gênese da contração. Estas cabeças contêm sítios para a hidrólise do ATP, e estão associadas a duas cadeias leves. Uma cadeia leve é crítica para a atividade ATP-ásica da miosina (cadeia leve essencial, LC-1), a outra pode influenciar a cinética de ligação miosina-actina sob algumas condições. Por vezes, esta cadeia é referida como cadeia leve regulatória.

O filamento fino é constituído por duas cadeias de monômeros globulares, G-actina, as quais formam a dupla hélice do polímero F-actina. A tropomiosina, proteína longa e flexível, se aloja nas fendas formadas pelos filamentos de actina. A esta proteína está acoplada a troponina (revisado com Bers, 2002).

A troponina é formada por três subunidades: a troponina T, ou subunidade de ligação da tropomiosina, a troponina I, subunidade inibitória que se liga à actina, e a troponina C, a subunidade de ligação ao cálcio. A região carboxil da troponina T se estende ao longo da tropomiosina sobre cerca de três monômeros de actina (Ohtsuki, 1979; Flicker *et al.*, 1982). A troponina I interage especificamente com as regiões carboxil tanto da troponina T quanto da C. A forte interação da porção amino-terminal da troponina I com a C depende da ligação de cálcio ou magnésio aos sítios carboxi-terminal da troponina C (figura 5).

Na condição de repouso, ou relaxamento muscular, a porção carboxi-terminal da troponina I também se liga à actina, e evita que a cabeça de miosina interaja com a actina. Quando o Ca^{2+} se liga a região amino-terminal da troponina C, esta porção se liga a região carboxi-terminal da troponina I induzindo a dissociação desta subunidade da actina. Com isso, a troponina T induz um movimento da tropomiosina o qual, por sua vez, permite a interação da miosina com a actina e, assim, a contração muscular (sístole) (Solaro e Rarick 1998, Rayment *et al.*, 1993) (Figura 5).

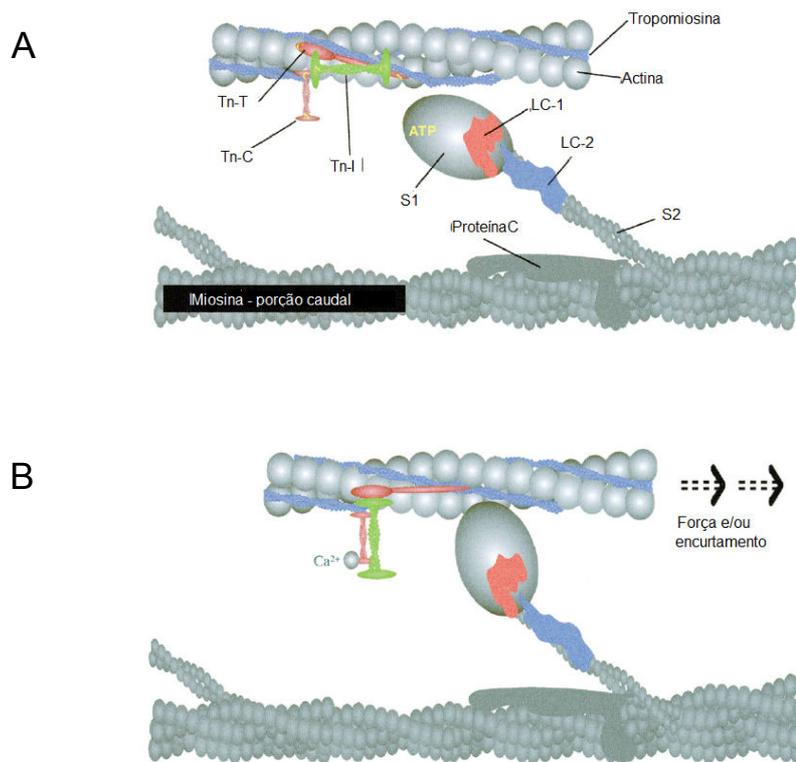


Figura 5 – As principais proteínas envolvidas na ativação e regulação da contração durante a diástole (A) e sístole (B). Os miofilamentos finos são compostos por actina, tropomiosina e troponina. A troponina é composta por troponina- T (Tn-T), troponina-C (Tn-C) e troponina-I (Tn-I). O filamento espesso é composto por miosina que, por sua vez, é composta por uma porção globular (S1), uma haste articulada (S2) e uma porção caudal. A porção S1 está associada com dois heterodímeros, a cadeia leve de miosina 1 e 2 (LC-1 e LC-2, respectivamente). A porção caudal da miosina está associada com a proteína C. A ligação do Ca^{2+} à Tn-C induz mudanças conformacionais nesta, e causa o fortalecimento da associação Tn-C:Tn-I enquanto que enfraquece a relação Tn-I:Tn-T. O movimento da tropomiosina expõe o sítio de ligação da actina permitindo a formação da ponte cruzada. Isso resulta no desenvolvimento da força e/ou encurtamento do sarcômero. Adaptado de Tombe, 2003.

O acoplamento excitação-contração compreende os processos de ativação elétrica dos cardiomiócitos, durante o potencial de ação, que levam à contração celular. O envolvimento do Ca^{2+} neste mecanismo foi descrito em 1907 por Locke e Rosenheim (revisado por Bers, 2002). A onda de despolarização culmina no influxo de Ca^{2+} o qual induz a liberação dos estoques intracelulares deste íon, principalmente do retículo sarcoplasmático através dos receptores de rianodina, fenômeno referido como liberação de cálcio induzida por cálcio. Assim, a concentração intracelular de cálcio resulta do influxo pelo sarcolema e da liberação pelo retículo levando à contração muscular (figura 6).

Após a contração observa-se o relaxamento muscular, necessário para o enchimento cardíaco o qual é governado pela redução da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e sua consequente dissociação da troponina C e o desfazimento da interação actina-miosina. Esses fenômenos envolvem o transporte ativo do cálcio de volta para o lúmen do retículo sarcoplasmático (através da Ca^{2+} -ATPase, SERCA) e extrusão pelo sarcolema, através dos NCX e, com menor significância, pela Ca^{2+} -ATPase sarcolemal. A mitocôndria também acumula cálcio, particularmente quando as concentrações citoplasmáticas se tornam excessivamente altas, como por exemplo, durante um estado de isquemia severa. Adicionalmente à redução do cálcio citosólico o estiramento dos componentes elásticos, especialmente as moléculas de titina, no miócito também podem estar envolvidos no processo de relaxamento (revisado por Sirker e Shah, 2002).

Em situações não patológicas, a função contrátil cardíaca é regulada por diversos fatores como a capacidade de enchimento, influência autonômica e vários agentes autócrinos ou parácrinos. Esses fatores alteram a força contrátil por duas maneiras, modulando o transiente de cálcio nos cardiomiócitos e/ou modificando a sensibilidades dos miofilamentos ao cálcio (Bers, 2002; Kobayash e Solaro, 2005).

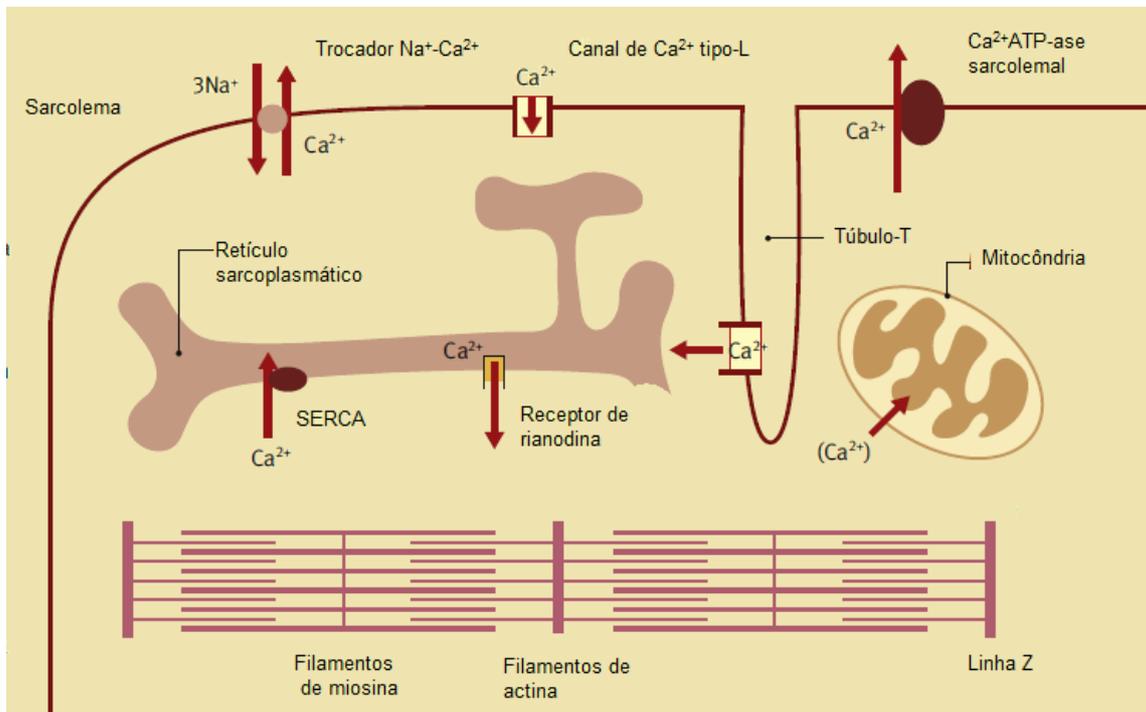


Figura 6 – Influxo e efluxo do cálcio no miócito cardíaco. A onda de despolarização se propaga pelo sarcolema e túbulos-T e dão início à entrada de cálcio via canais do tipo-L, entrada essa que estimula a subsequente liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático culminando na contração muscular. Após a contração a concentração de Ca^{2+} é reduzida ativamente pela $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ do retículo sarcoplasmático (SERCA) ou do sarcolema. Adaptado de Sirker e Shah, 2002.

1.6.2. Principais estruturas celulares envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração.

Além dos miofilamentos, outras estruturas celulares estão envolvidas no processo de acoplamento excitação-contração nos miocárdios. Podemos destacar o sarcolema, os túbulos transversos, retículo sarcoplasmático e os receptores cardíacos.

1.6.2.1. Sarcolema e túbulos transversos

A membrana plasmática dos cardiomiócitos possuem invaginações que formam uma rede extensa de túbulos transversos, túbulos-T. A superfície do sarcolema é fisicamente continua com a membrana dos túbulos-T e, dessa forma, as duas se combinam para formar uma barreira de permeabilidade entre o interior da célula e o meio extracelular. Assim, os túbulos-T aumentam a área de superfície da célula em pelo menos 30%, facilitando que o estímulo excitatório se propague para dentro da célula. Esta rede explica o curto período (40 ms) necessário para que a excitação seja conduzida a partir da membrana plasmática até o centro celular (Hill, 1984; Peachey e Huxley, 1962).

Nos cardiomiócitos, como já mencionado, a contração é iniciada pela despolarização mediada pela entrada de Ca^{2+} via membrana plasmática pelos canais de cálcio do tipo-L. Essa entrada de Ca^{2+} culmina na liberação desse mesmo íon do retículo sarcoplasmático através dos canais de rianodina (revisado por Bers, 2002).

Os canais do tipo L cardíacos ($\text{Ca}_{v.1.2}$), os quais são sensíveis a di-hidropiridina, apresentam grande magnitude de sua condutância unitária com decaimento lento da corrente. Esses canais são formados pelas subunidades α_{1c} , β , $\alpha_{2\delta}$ e a subunidade γ (revisado por Catterall, 2011).

A subunidade α_{1c} forma o poro do canal e possui sensibilidade à voltagem. Esta subunidade possui sítios de interação com subunidades acessórias, de ligação a várias

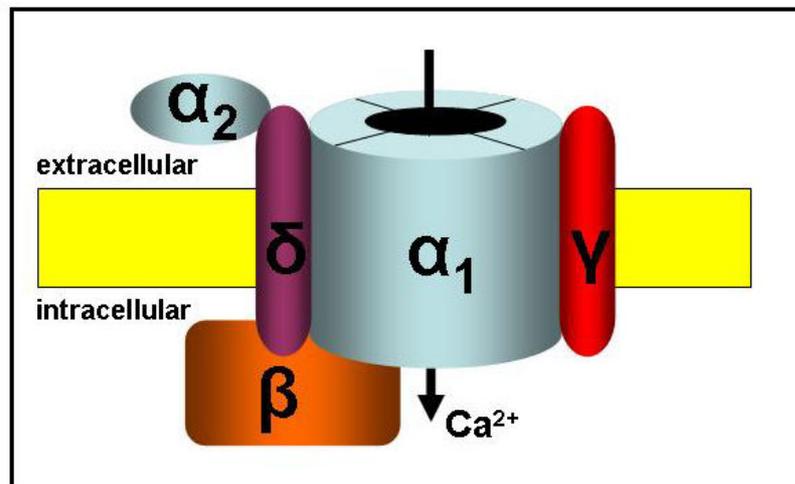
drogas (ativadoras e bloqueadoras), de ligação com a proteína G e também possui resíduos passíveis de serem fosforilados. Assim, os canais do tipo-L podem ser modulados por proteínas cinases, em especial a PKA. A subunidade β é localizada intracelularmente sendo que as variantes β_{2a} e β_{2b} são abundantemente expressas no coração (Hullin *et al.*, 1992).. Esta subunidade afeta as propriedades biofísicas do canal para cálcio, como também modifica a interação da subunidade α_{1c} com agentes bloqueadores do $Ca_{v.1.2}$ (figura 7). A subunidade referida como $\alpha_2\delta$ é formada por uma proteína transmembrana δ e uma extracelular α_2 ligadas por pontes dissulfeto. Já a subunidade γ é formada por uma proteína cujas alfa-hélices atravessam a membrana, sendo que as porções amino e carboxi-terminais são intracelulares (figura 8) (revisado por Catterall, 2011).

A justaposição dos canais de cálcio tipo-L do sarcolema com os canais de rianodina formam uma díade, dependente da estrutura do túbulo-T, a qual garante a liberação adequada de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (figura 8) (Franzini-Armstrong *et al.*, 1999). A rede de túbulos-T é responsável pela maior parte (75 a 80%) do influxo de Ca^{2+} pelos canais tipo-L que induz a liberação dos estoques sarcoplasmáticos. Esse fato se deve à alta concentração de canais tipo-L nos túbulos-T, a qual é aproximadamente nove vezes maior nestas estruturas do que na superfície celular (Brette *et al.*, 2006).

Os túbulos-T também participam da extrusão do Ca^{2+} . O NCX é encontrado em maior concentração nessas estruturas e possuem acesso privilegiado ao Ca^{2+} liberado pelo retículo (revisado por Ibrahim *et al.*, 2011).

Este trocador é uma proteína com nove segmentos transmembranares, que transporta Na^+ e Ca^{2+} , regulada pelo PIP2 (fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato) e por fosforilação. Sua atividade é maior no músculo cardíaco (apesar de também existir nos músculos esquelético e liso), onde é um importante regulador da contratilidade, ao enviar, por transporte ativo secundário, um íon Ca^{2+} para o meio extracelular em troca de três

A



B

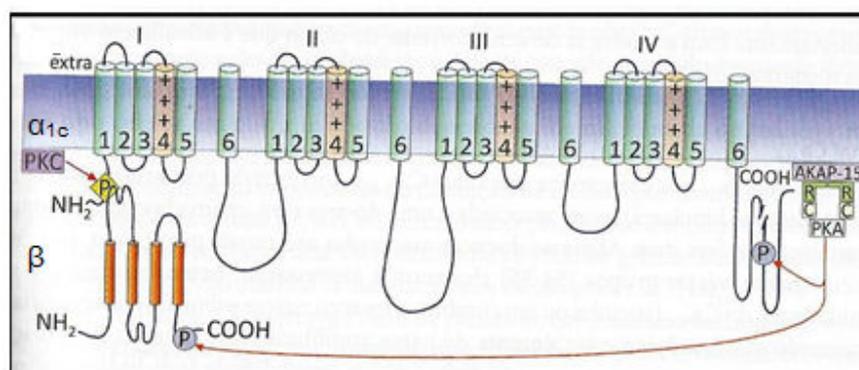


Figura 7 – (A) Estrutura básica dos canais para cálcio dependentes de voltagem. Adaptado de Iftinca, 2011. (B) Topologia das subunidades α_{1c} e β_{2a} do canal $Ca_{v1.2}$ e os sítios de fosforilação pelas proteínas cinase A e C. Fonte: Del Corso, *et al.*, 2012. Em: Sinalização de cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares.

íons Na^+ , permitindo, assim, a diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, o relaxamento do músculo (figura 9). A direção do movimento de íons através do NCX depende do potencial de membrana e do gradiente químico para estes íons, o que, por sua vez, se correlaciona com a atividade da bomba Na^+-K^+ . Por exemplo, em casos de hipóxia (devido à queda dos níveis de ATP) a atividade da bomba Na^+-K^+ diminui, levando ao aumento da $[\text{Na}^+]_i$. Nestas condições, o trocador expulsa o excesso de íons Na^+ para o meio extracelular, em troca de íons Ca^{2+} , que adentram o citoplasma culminando no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Blaustein, 1988). A SERCA se localiza em regiões do retículo próximas ao NCX, indicando que a via de extrusão é conectada com a via de influxo por estas estruturas. E ainda, evidências recentes sugerem que o efluxo de Ca^{2+} pela ATP-ase sarcolemal aconteça exclusivamente nos túbulos-T (Chase e Orchard, 2011; revisado por Ibrahim *et al.*, 2011).

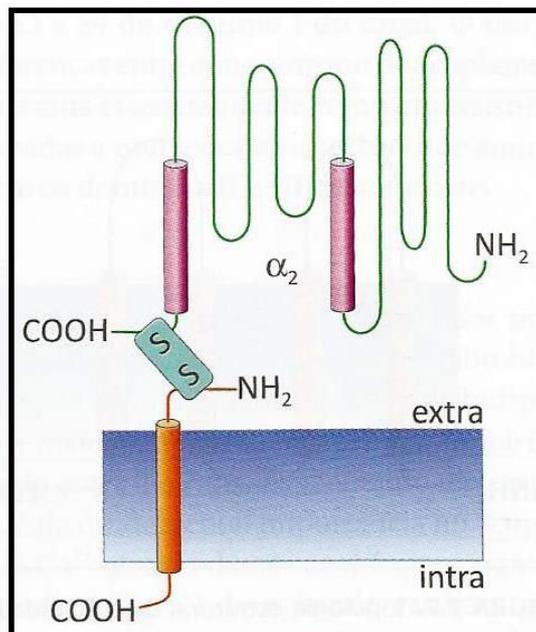
1.6.2.2 Reticulo sarcoplasmático

Anatomicamente, o retículo sarcoplasmático se constitui de uma rede de membrana espalhada através dos miócitos, demarcada por sua bicamada lipídica similar à bicamada do sarcolema. Essa organela é o principal estoque de cálcio e, assim, um regulador central do acoplamento excitação-contração e da contratilidade cardíaca.

O retículo sarcoplasmático pode ser dividido em pelo menos dois tipos: o retículo sarcoplasmático longitudinal e o juncional. O longitudinal é composto por vários túbulos interconectados uns aos outros formando uma rede em torno dos miofilamentos. O longitudinal se estende em sacos largos, chamados de cisternas terminais que representam o retículo juncional, onde se encontram os receptores de rianodina, responsáveis pela liberação de cálcio para o citoplasma dos cardiomiócitos.

Os receptores de rianodina são proteínas homotetraméricas com monômeros de aproximadamente 565 kDa. Em tecidos de mamíferos já foram isoladas três isoformas

A



B

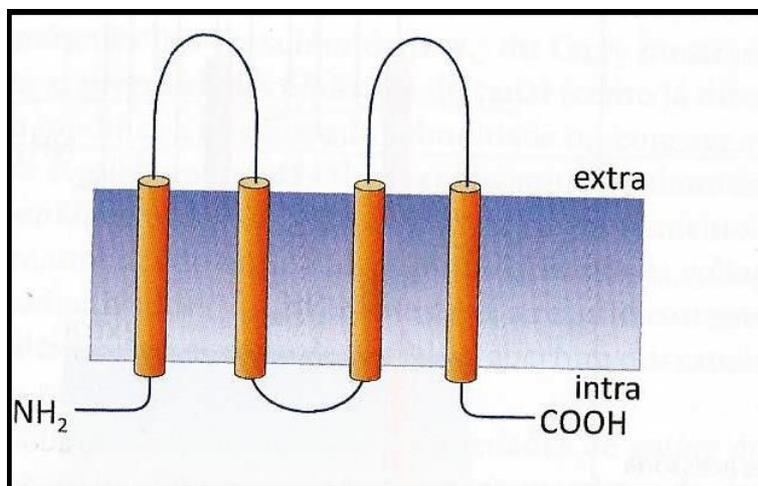


Figura 8– Topologia da subunidade acessória $\alpha_2\delta$ (A) e γ (B) do canal de Ca^{2+} tipo-L.

Fonte: Del Corso, *et al.*, 2012. Em: Sinalização de cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares.

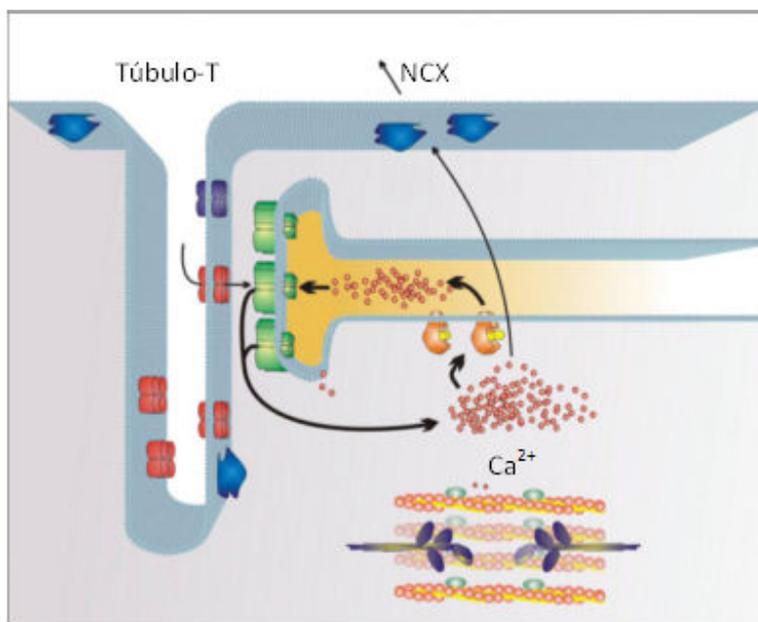


Figura 9 – Representação da díade e do fenômeno de liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} . Vermelho: canais de cálcio tipo-L. Verde: canais de rianodina tipo-2. NCX: trocador Na^+ - Ca^{2+} . Adaptado de Ibrahim *et al.*, 2011.

desse receptor, sendo que a isoforma do tipo 2 é a mais abundante no músculo cardíaco (revisado por Zalk e Lehnart, 2007).

Como descrito anteriormente, a chegada do potencial de ação e o consequente aumento do influxo de cálcio para o citosol do cardiomiócito faz com que este íon ligue-se ao receptor de rianodina promovendo sua abertura, desencadeando maior liberação de Ca^{2+} do retículo, o que culmina na contração muscular (revisado por Gyorke e Terentyev, 2008). Embora grande parte do receptor esteja situada na porção citoplasmática da membrana do retículo, uma parte se estende para o lúmen desta organela. No lúmen, o receptor se encontra complexado com grande número de proteínas e dentre estas, podemos destacar a calsequestrina, a triadina e a junctina, que assim como o ATP, atuam como moduladoras deste receptor. A triadina, juntamente com a junctina, forma um complexo quaternário com o receptor de rianodina e a calsequestrina, que funciona como ancora para esta proteína (Gyorke *et al.*, 2004, revisado por ter Keurs, 2012). A calsequestrina, além de atuar como moduladora da atividade dos receptores de rianodina, é a principal proteína tamponante de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e assim, atua como um reservatório destes íons (Mitchell *et al.*, 1988; Park *et al.*, 2004).

Além do receptor de rianodina, o retículo longitudinal é enriquecido de a Ca^{2+} -ATP-ase (SERCA), a qual é responsável pela rápida remoção do cálcio citoplasmático para o lúmen. A SERCA, que é formada por uma única cadeia polipeptídica contendo um domínio transmembrane e três domínios citoplasmáticos, é codificada por três genes que dão origem a três isoformas. A diversidade dessas isoformas é acentuada pelo *splicing* alternativo do RNA resultando em 11 variantes da SERCA, sendo que no coração a principal é a SERCA2a (Brini *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 1989; MacLennan *et al.*, 1985).

Nesse órgão, a atividade dessa proteína pode ser regulada por diversos fatores, mas podemos destacar as fosfoproteínas fosfolamban e sarcolipina. A fosfolamban possui três domínios, dois citoplasmáticos (Ia e Ib) e um transmembrânico, sendo que no

domínio la estão localizados três sítios de fosforilação, serina-16, treonina-17 e serina-10. A região la da fosfolamban quando desfosforilada forma um complexo com a região N-terminal da SERCA2a causando sua inibição, o que não ocorre quando a fosfolamban está fosforilada, e a bomba fica ativa. Esse fenômeno culmina no aumento da recaptação de Ca^{2+} pelo retículo. Por essa razão, a fosfolamban é uns dos principais determinantes na contratilidade e relaxamento muscular cardíaco. A sarcolipina é uma proteína contendo 31 resíduos de aminoácidos, expressa no ventrículo e principalmente no átrio que atua de maneira semelhante à da fosfolamban (revisado por Cerra e Imbrogno, 2012).

A fosforilação da fosfolamban pode ocorrer via sistema adrenérgico através da proteína cinase A (PKA), a qual fosforila o resíduo Ser16 desta molécula e pela proteína cinase 2 dependente de Ca^{2+} /calmodulina, que promove a fosforilação no resíduo Thr17. Também pode ocorrer a fosforilação do resíduo serina-10, que é modulada pela proteína cinase dependente de fosfolipídio ativado por cálcio (PKC) (Mattiuzzi *et al.*, 2005; Tada e Toyofuke, 1998;)

1.6.3. Fatores que afetam a contratilidade miocárdica

A ativação dos receptores adrenérgicos está relacionada aos efeitos inotrópicos e lusitrópico do musculo cardíaco. Dois subtipos de adrenoreceptores foram isolados de corações de mamíferos, os receptores α (classificados em 1-a, b e d e 2-a, b e c) e β (classificados e 1, 2 e 3) (revisado por Brodde e Michel, 1999).

A ativação do receptor β -adrenérgico é particularmente importante por ser o meio fisiológico através do qual os estados inotrópicos e lusitrópico do coração são controlados pela estimulação simpática. Em corações humanos, a razão $\beta_1:\beta_2$ nos ventrículos variam de 70 a 80%:30 a 20% (Brodde, 1991).

Quando os receptores β 1 e 2 são estimulados, ocorre a ativação da proteína G e sua subunidade α se dissocia e ativa a enzima adenilato ciclase. Esta, por sua vez,

aumenta as concentrações intracelulares de AMPc. Este aumento culmina na ativação da PKA, a qual fosforila diversas proteínas no sarcolema incluindo os canais para Ca^{2+} tipo-L, receptores de rianodina, a fosfolamban e a troponina I (Tsien *et al.*, 1972; Walsh e Van Patten, 1994; Kaumann e Molenaar, 1997). Como já discutido, a fosforilação dos canais de cálcio promove o influxo deste íon para o meio intracelular e, assim, a contração. A fosforilação da fosfolamban está envolvida com o relaxamento durante a diástole cardíaca por induzir o aumento da recaptção do cálcio para o lúmen do retículo sarcoplasmático (Figura 10) (Brittsan e Kranias, 2000; revisado por Bers, 2002).

Alterações na responsividade ao cálcio também afetam a contratilidade miocárdica. Elas podem ocorrer por modificações da afinidade da troponina C a este íon e pela fosforilação da cadeia leve da miosina. Vale ressaltar que diversas situações, fisiológicas e patológicas, são capazes de diminuir a afinidade da troponina C ao cálcio. Podemos citar a hipóxia, a anóxia, a acidose, o aumento intracelular de fosfato inorgânico e o aumento da atividade das cinases (revisado por Bers, 2002; Kobayashi e Solaro, 2005).

A modulação da força de contração também se dá pelo estiramento dos sarcômero através mecanismo de auto-regulação heterométrica do coração, mais conhecido como lei de Frank-Starling. Dessa forma, diante do aumento do retorno venoso e da pressão diastólica final do ventrículo, geração de força suficiente é proporcionada ao músculo cardíaco para bombear mais sangue em resposta a esta situação (Konhilas *et al.*, 2002).

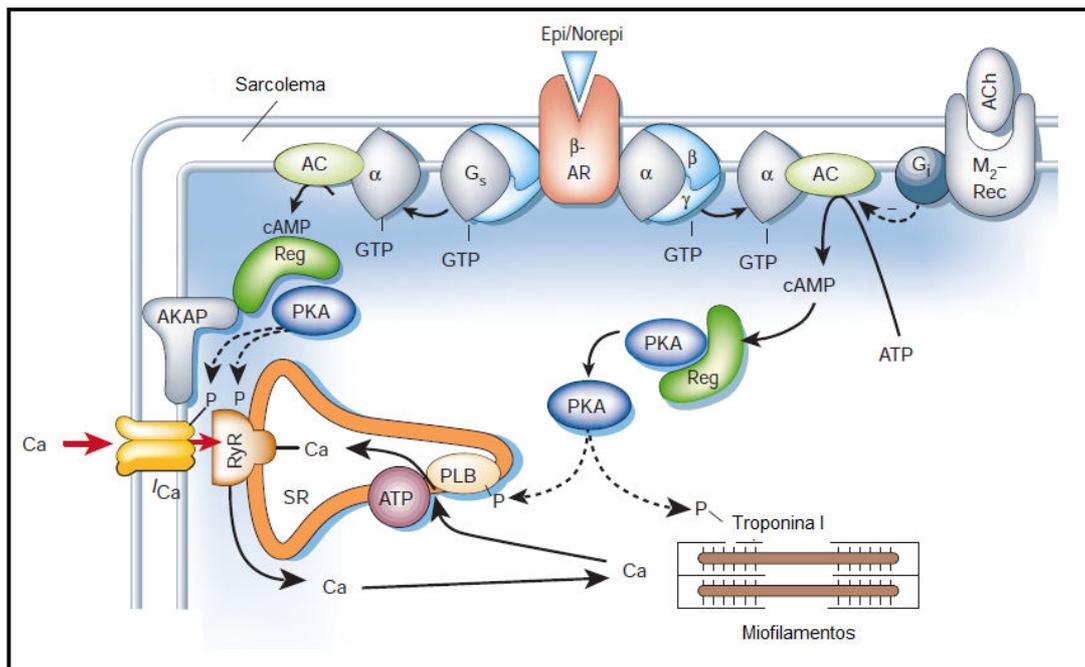


Figura 10 – Ativação β -adrenérgica e alvos de fosforilações relevantes para o acoplamento excitação-contração e contratilidade miocárdica. AC: adenilato ciclase. ACh: acetilcolina, AKAP: proteína âncora de PKA (proteína cinase A). Epi/Norepi: epinefrina/norepinefrina. RyR: receptores de rianodina. β -AR: receptor- β . M2-Rec: receptor muscarínico M2. PLB: fosfolamban. Reg: subunidade regulatória da PKA. SR: retículo sarcoplasmático. Adaptado de Bers, 2002.

O óxido nítrico também modula o estado inotrópico cardíaco, seja de forma positiva ou negativa dependendo da sua concentração, taxa de liberação e da estimulação adrenérgica. O NO leva à formação de GMPc que reduz a sensibilidades dos miofilamentos ao cálcio pela acidificação citosólica, resultante da alteração da função do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$. O GMPc ativa proteínas cinases que dão início a várias respostas celulares, como a fosforilação a troponina I diminuindo sua afinidade pelo cálcio. Estas cinases também são capazes de suprimir o aumento da corrente de cálcio tipo – L pela PKA induzida após o estímulo simpático (revisado por Fischmeister *et al.*, 2005; Layland *et al.*, 2002).

A atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e do trocador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ também afetam a contratilidade miocárdica. A $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase atua retirando o Na^+ do citoplasma ao mesmo tempo que bombeia o K^+ para o meio intracelular. O seu funcionamento depende de diversos fatores, mas principalmente das concentrações intra e extracelular destes dois íons. A inibição da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase ocasiona o aumento da concentração citoplasmática de Na^+ já que sua extrusão é reduzida. Este aumento, por sua vez, ocasiona a diminuição da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e, por conseguinte provoca o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e assim, induz efeito inotrópico positivo (Balustein, 1988, Nicoll *et al.*, 1990).

1.7. Justificativa

Peçonhas animais contêm compostos biologicamente ativos que ocupam um lugar de destaque no instrumental da farmacodinâmica contemporânea. Constituem uma fonte importante de moléculas biologicamente ativas que despertam considerável interesse devido ao seu potencial como fonte de agentes farmacológicos e também como instrumentos para a investigação sobre sistemas biológicos.

A purificação e determinação estrutural de moléculas presentes nestas peçonhas podem originar modelos de novos compostos químico/farmacêuticos patenteáveis, os quais têm sido amplamente utilizados por companhias de pesquisa em bioprospecção. O estudo sobre peçonhas também contribuem significativamente para o avanço do conhecimento básico dos processos e/ou etapas que participam das respostas fisiológicas.

A pesquisa sobre peçonhas de peixes tem sido dedicada principalmente aos peixes-pedra (revisado por Khoo, 2002) e apenas um pequeno número de estudos sobre a composição e atividade biológica dos peixes-escorpião (*Scorpaena*) é encontrado na literatura. Ampliando o conhecimento a respeito destas peçonhas inexploradas e intrigantes, este trabalho deu continuidade ao estudo da peçonha do peixe *Scorpaena plumieri*, sendo de grande importância para geração de informação sobre um patrimônio biológico brasileiro.

O conhecimento sobre as atividades farmacológicas desta peçonha também pode esclarecer os mecanismos envolvidos no envenenamento humano, que apesar de não levar ao óbito pode incapacitar a vítima por dias e até semanas.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar a Sp-CTx, toxina purificada da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*, quanto suas propriedades bioquímicas e atividades hemolítica e cardiovascular.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudar os efeitos cardíacos da peçonha bruta

2.2.2. Avaliar a neutralização dos efeitos cardiovasculares *in vivo* do SpV pelo SFAV

2.2.3. Otimizar o processo de purificação da Sp-CTx

2.2.4. Caracterizar bioquimicamente a Sp-CTx:

2.2.4.1. Determinar a sequência dos resíduos de aminoácidos

2.2.4.2. Verificar a natureza oligomérica

2.2.4.3. Verificar a semelhança estrutural da toxina Sp-CTx com toxinas de venenos de outros peixes

2.2.5. Caracterizar farmacologicamente a Sp-CTx

2.2.5.1. Determinar a potência da atividade hemolítica e estudar o mecanismo de ação envolvido nesta atividade.

2.2.5.2. Estudar a atividade cardiovascular da Sp-CTx

2.2.5.3. Avaliar o efeito sobre a pressão arterial e frequência cardíaca *in vivo*

2.2.5.4. Avaliar a reatividade cardiovascular

2.2.5.5. Avaliar o efeito sobre contratilidade muscular cardíaca *in vitro* (sobre a amplitude da força de contração parâmetros temporais da força de contração isométrica)

2.2.5.6. Estudar a possível relação do efeito sobre a contratilidade muscular cardíaca com o fluxo e com os estoques intracelulares de cálcio.

2.2.5.7. Estudar o efeito sobre a corrente de cálcio tipo-L

2.2.5.8. Estudar o efeito sobre o transiente de cálcio.

3. Materiais e métodos

3.1. Fármacos e reagentes

Os reagentes e fármacos utilizados no presente trabalho foram de qualidade analítica, procedentes da Merk, Sigma, Bio-Rad ou GE Life Science, B. Herzoh, Roche. O soro comercial (SFAV – StoneFish AntiVenom) contra o veneno do peixe-pedra *Synanceja trachynis* foi adquirido da Commonwealth Serum Laboratories (Melbourne Austrália).

As soluções utilizadas nos processos cromatográficos e eletroforético, nas análises eletrofisiológicas e microscopia confocal foram preparadas em água purificada em sistema Milli-Q. Para os demais experimentos utilizou-se água destilada.

3.2. Animais experimentais

3.2.1. Peixes

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

3.2.2. Ratos e coelhos.

Para o presente estudo foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente três meses de idade (250-300g) cedidos pelo Biotério de Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo ou do Biotério de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, em uma sala iluminada 12h por dia, sendo que o acesso à ração e água foi livre.

O sangue de coelho utilizado neste trabalho foi cedido pelo Núcleo de Doenças Infecciosas – UFES.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o recomendado pelo COBEA e certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFES, 005/2009 e 105/2011).

3.3. Obtenção do veneno bruto do peixe *Scorpaena plumieri*

A peçonha foi extraída dos espinhos de espécimes selvagens de *S. plumieri* baseando-se no método de batch, previamente descrito por Schaeffer e colaboradores (1971). Primeiramente os peixes foram anestesiados por resfriamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e então os espinhos dorsais e anais foram removidos. Em seguida, estes foram dissecados de forma que os tegumentos que os revestem fossem separados dos ossos. Os tegumentos foram triturados e seus conteúdos foram solubilizados em tampão fosfato (10 mM) NaCl 15 mM, pH 7,4 (PBS). A peçonha bruta (SpV) foi obtida após a remoção do material insolúvel por centrifugação por 30 minutos a 14.000 g. Todo o procedimento foi realizado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O SpV foi imediatamente empregado para a purificação da toxina hemolítica (Sp-CTx) ou então armazenado (com glicerol 10% v/v) em nitrogênio líquido. O processo de extração da peçonha do *Scorpaena plumieri* está mostrado na figura 11.

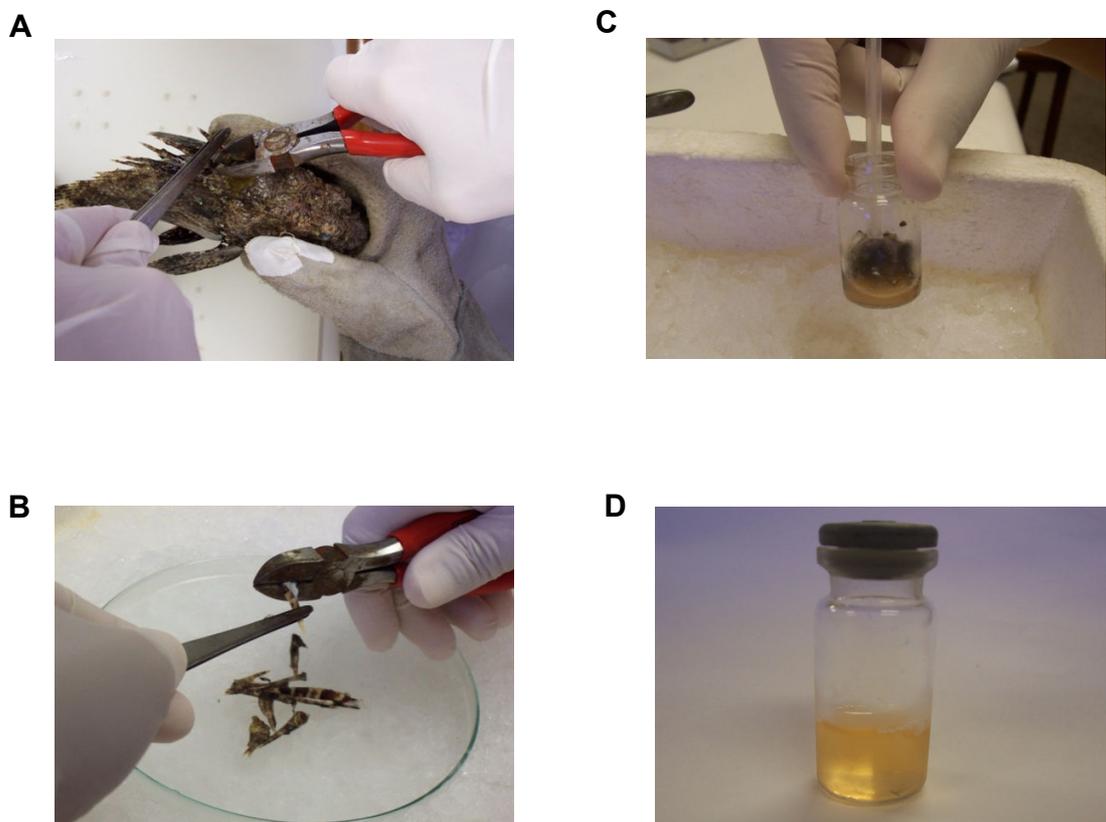


Figura 11 - Extração da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Remoção do revestimento do espinho. (C) Homogeneização dos tegumentos fatiados em PBS. (D) Peçonha bruta (SpV) após a remoção das partículas insolúveis por centrifugação.

3.4. Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico da peçonha bruta e das frações obtidas nas etapas de purificação da Sp-CTX (*Scorpaena plumieri Cytolytic Toxin*) foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

3.5. Reatividade cruzada entre o SpV e o soro para o veneno do peixe-pedra

A reatividade antigênica cruzada foi avaliada *in vitro* (Western immunoblotting e Elisa). Testes cardiovasculares *in vivo* também foram conduzidos para avaliar o potencial do SFAV (Stonefish Antivenom) de neutralizar os efeitos do SpV.

3.5.1. Western immunoblotting

As proteínas do veneno bruto do peixe-escorpião *S. plumieri* foram separadas por eletroforese bidimensional e submetidas ao Western immunoblotting com SFAV.

3.5.1.1. Eletroforese bidimensional

3.5.1.1.1. Focalização isoeletrica (1ª dimensão)

A focalização isoeletrica, primeira dimensão da eletroforese, foi realizada em um sistema IEFCell (Bio-Rad) de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de SpV (100 µg de proteínas solúveis) foram diluídas em tampão de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos, para um volume final de 130 µL. Em seguida, cada solução resultante foi transferidas para uma bandeja de reidratação, e sobre essas foram colocadas as IPG strips desidratadas (7 cm, pH 4-7 ou pH 3-10) durante 30 minutos. Posteriormente as IPG strips saturadas com as amostras foram alocadas adequadamente no sistema IEFCell (BioRad). O programa utilizado foi: reidratação ativa (50 V por 12

horas a 20°C) e focalização isoeétrica (1ª etapa: 300 V por 3 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem, por rampa rápida, até 10.000 V em 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 60.000 Vh; 4ª etapa: 500 V por 5 horas) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/gel.

3.5.1.1.2 Redução e alquilação das proteínas eletrofocalizadas

Após o término da eletrofocalização as proteínas no gel da “strip” foram submetidas à redução e alquilação das pontes dissulfeto. Os processos de redução e alquilação foram realizados pela incubação sequenciada das strips com: DTT (10 mg/mL), e posteriormente iodoacetamida (25 mg/mL), em tampão de equilíbrio (50 mM Tris 35 HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) por 15 minutos cada à temperatura ambiente.

3.5.1.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (2ª dimensão da eletroforese bidimensional)

A segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE, utilizando o sistema Protean II XL (Bio-Rad) e seguindo o método descrito por Laemmli (1970). As IPG strips contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para a superfície do gel de poliacrilamida a 10%. O gel foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bis-acrilamida em água (29,2 : 0,8%, contendo 0,1% SDS p/v, 0,1% persulfato de amônio p/v, 0,1 % de temed v/v e 0,375M Tris-HCL pH 8.8).

Após serem transferidas para o gel, as *strips* foram seladas com solução de agarose 0,5% preparada no tampão de corrida (tampão Tris/Glicina/SDS, pH 8,8). A eletroforese foi conduzida a 20 mA/gel por 30 minutos e, em seguida, a 24 mA/gel até o término da corrida.

Decorrido o tempo da eletroforese, um gel focalizado pH 3 a 10 e um pH 4 -7 foram submetidos à coloração pelo método Coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) de

acordo com Neuhoff e colaboradores (1988) com algumas modificações; e um outro foi submetido ao reconhecimento com SFAV.

Inicialmente o gel foi incubado três vezes (30 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico em etanol 30%, seguido de três lavagens (10 minutos cada) com solução 2% de ácido ortofosfórico. Posteriormente o gel foi incubado por 30 minutos em solução ácido ortofosfórico/sulfato de amônio/etanol (2%:12%:18%), e corado durante 5 dias pela adição de Coomassie G-250 na solução acima para concentração final de 0,01% do corante. O excesso do corante foi removido do gel com solução de etanol 20%.

3.5.1.2 Reconhecimento com SFAV

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita num sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad) mergulhado em tampão de transferência gelado (48mM Tris, 39 mM glicina e 20% v/v metanol, pH 8,3) A membrana foi então bloqueada com 5% de leite desnatado e 0,3% de tween 20 em tampão fosfato (PBS). Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS e incubada (por 1 hora a 25 °C) com SFAV a uma diluição de 1:500 (relação determinada experimentalmente). Após as lavagens da membrana os anticorpos possivelmente ligados foram marcados, por uma hora a 25°C, com anticorpos conjugados com peroxidase, a uma diluição de 1:5000 em PBS contendo 0.05% de tween 20. A imunodeteção foi realizada com peróxido de hidrogênio como substrato na presença de diaminobenzidinae 4-cloro-1-naphthol.

3.5.1.3. Aquisição, processamento e análise das imagens.

Para obtenção das imagens, os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences) no modo de transmissão calibrado.

3.5.2. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

Placas de microtitulação (Becton Dickinson France S.A.) foram cobertas com 100 µl de tampão 0.02 M de bicarbonato de sódio (pH 9,6) contendo veneno bruto a uma concentração de 5 µg/mL e incubando *overnight* a 5°C. Após o bloqueio dos sítios não específicos com solução de caseína 2% (w/v), por 1 hora a 37 °C, as proteínas do veneno imobilizadas foram tituladas com concentrações decrescentes do SFAV (de 1:200 até 1:204800). Em seguida, foram incubadas a 37 °C por uma hora. Ligações não específicas foram medidas na presença do soro pré-imune equino sob as mesmas condições. As moléculas de IgG ligadas foram detectadas via anticorpo produzido contra IgG equino conjugado à peroxidase diluído a 1:1000.

Os valores de absorvância foram determinados a 492 nm através do espectrofotômetro (Titertek Multiscan). Os poços cobertos com solução de caseína 2% foram considerados como branco e as absorvâncias destes foram subtraídas de todos os valores obtidos. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.5.3. Ensaio de neutralização *in vivo*

Para este ensaio, ratos foram anestesiados com uretana (1.2 g/kg, i.p.) e em seguida fez-se uma incisão na região cervical e cateteres de polietileno (PE-50, Clay-Adams), preenchidos com heparina (100 UI/mL), foram implantados na artéria carótida e na veia jugular.

O acesso à veia jugular foi utilizado para a injeção das amostras de SpV (300 de proteína mg/kg) e SpV pré-incubado com SFAV por 5 minutos a 25 °C na relação de 1:1 (veneno / U de SFAV).

Amostras do SpV em solução salina foram submetidas às mesmas condições (25 °C por 5 min) e utilizadas como controle positivo, enquanto que a solução salina foi

utilizada como controle negativo de atividade. A dose do veneno foi utilizada de acordo com o trabalho de Gomes e colaboradores, 2010.

O acesso à artéria carótida foi utilizado para a obtenção dos registros de pressão e frequência cardíaca. A pressão arterial pulsátil foi registrada através de um transdutor de pressão (Grass Instrument Div.,Warnick, USA) e os sinais foram processados utilizando-se o sistema BIOPAC (MP100, Modelo PT300, Santa Barbara, USA). A frequência cardíaca foi obtida indiretamente e concomitantemente às pressões diastólica e sistólica.

Os valores dos parâmetros cardiovasculares foram aferidos antes e após a injeção da amostra em questão.

Durante todo o procedimento o animal respirou espontaneamente e a eficácia do plano anestésico foi avaliada pela responsividade ao estímulo doloroso e, quando necessário, doses adicionais da droga foram administradas.

3.6. Otimização do processo de purificação da *Scorpaena plumieri* Cytolytic toxin (Sp-CTX)

O processo de purificação da Sp-CTX foi acompanhado pelo monitoramento da atividade hemolítica e cardíaca nas frações obtidas em cada etapa da purificação. Para isso, foram realizados ensaios hemolíticos sobre eritrócitos de coelhos (item 3.10) e ensaios sobre a atividade de músculos papilares ventriculares de ratos (item 3.13).

3.6.1. Primeira etapa da purificação da Sp-CTX: fracionamento do veneno bruto do *Scorpaena plumieri* por precipitação salina

A primeira etapa da purificação constituiu de precipitação salina realizada em duas etapas, tidas como ideais através de testes preliminares. Primeiramente, adicionou-se 15% (p/v) de sulfato de amônio à solução do veneno, 48.7 mg de proteína, sob lenta agitação por aproximadamente 5 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi

centrifugada a 30.000 x g por 30 minutos e a 4 °C e o material precipitado foi dissolvido em 2mL de PBS. Em um segundo passo, adicionou-se sulfato de amônio ao sobrenadante para uma concentração final de 35% p/v. Após centrifugação a 30.000 x g por 30 minutos e a 4 °C o material precipitado foi dissolvido em 2 mL de PBS. As amostras obtidas, precipitadas por 15 e 35% de sal e o sobrenadante final foram estocadas para análises posteriores. Todo o processo foi realizado em banho de gelo (~ 4 °C).

3.6.2. Segunda etapa da purificação: Cromatografia de interação hidrofóbica

A fração com atividade hemolítica obtida de acordo com o item anterior teve sua concentração de sulfato de amônio ajustada para 1M utilizando-se tampão fosfato 100 mM pH 7.5 contendo 2M de sulfato de amônio. Após a primeira etapa, uma amostrada da fração de interesse (aproximadamente 4,5 mg) foi fracionada por cromatografia de interação hidrofóbica em sistema HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*).

Para isso, empregou-se a coluna HITrap Butyl HP 5ml (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equilibrada com tampão fosfato 100 m, pH 7.5, contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M. Após a aplicação da amostra (previamente filtrada em membrana de 0,22 μm), a coluna foi eluída com gradiente segmentado de 1 – 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no mesmo tampão, fluxo de 1 mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada pela absorbância a 280nm e as frações foram coletadas manualmente e mantidas em banho de gelo (\approx 4 °C). As frações de interesse, aquelas com atividade hemolítica e cardiovascular, foram agrupadas e empregadas na próxima etapa de purificação.

3.6.3. Terceira etapa da purificação: Cromatografia de troca iônica

O material de interesse, obtido de acordo com a etapa anterior, teve sua concentração de cloreto de sódio ajustada para 0,10 M e foi concentrado utilizando-se

sistema Amicon®Ultra (10KDa) a 4 °C. Este material ($\approx 700 \mu\text{g}$) foi fracionado por cromatografia de troca aniônica em sistema HPLC. Para isso, empregou-se a coluna Syncropack SAX-200, (250 x 4.6mm, Eprogen, USA) equilibrada com tampão fosfato 20 M, pH 7.5, contendo NaCl 0,1M. Após a aplicação da amostra a coluna foi eluída com gradiente segmentado de 0,1 – 1 M NaCl no mesmo tempão a um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada pela absorvância a 280nm e as frações foram coletadas manualmente e mantidas em banho de gelo ($\approx 4 \text{ }^\circ\text{C}$). A fração purificada com atividade de interesse (correspondente à Sp-CTx) foi concentrada utilizando-se sistema Amicon®Ultra (10 kDa) a 4 °C, estabilizada com glicerol (10% v/v) e imediatamente estocada em nitrogênio líquido (-195 °C) até sua utilização.

Devido à escassez deste material, a quantidade Sp-CTx obtida ao final de cada processo de purificação foi estimada pela absorção UV a 280 nm. A Sp-CTx em sua forma nativa e na concentração de 1mg/ml apresenta absorvância de 0.40 (dado obtido experimentalmente). O grau de homogeneidade da amostra obtida foi analisado por SDS-PAGE.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando um sistema de eletroforese com placas de 10 cm de comprimento por 8,2 cm de largura.

Os géis de separação (8%) foram preparados a partir de uma solução de acrilamida-bis-acrilamida em água (29,2: 0,8%), contendo 0,1% SDS p/v, 0,1% persulfato de amônio p/v, 0,1 % de temed v/v e 0,375M Tris-HCL pH 8.8. O gel de concentração foi preparado a 5% a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo Tris HCL 0,0625M pH 6,8 e as mesmas proporções de SDS, temed, e persulfato de amônio do gel de separação.

As amostras de proteínas foram solubilizadas em tampão Tris-HCL 0,125M pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 20% glicerol p/v e 1% de azul de bromofenol p/v, em condições não redutoras e redutoras (ausência ou presença de 4% de β -mercaptoetanol, respectivamente). Essas soluções foram mantidas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente a 20 mA por 1h e, em seguida, 40 mA até o término do processo. As bandas de proteínas nos géis foram detectadas por coloração de azul de Coomassie (Brilliant Blue G-250), os géis foram imersos por 30 min em solução 0,25% de azul de Coomassie em metanol, ácido acético e água (5:1:5). O descoloramento foi realizado com solução de metanol, ácido acético e água (1:2:19).

A massa molecular aparente da toxina purificada foi estimada pela comparação com a mistura de proteínas de pesos moleculares pré-determinados (miosina – 200 kDa, β -galactosidase – 116 kDa, fosforilase b – 97 kDa, albumina bovina sérica – 66 kDa, e ovalbumina – 45 kDa; BioRad).

3.8. Ensaio de cross-linking

Para a avaliação da natureza oligomérica da toxina Sp-CTx, foi utilizado o ensaio de cross-linking químico empregando-se o suberato de bis-[sulfosuccinimidil] (BS³; Pierce) como *cross-linker*. A Sp-CTx (50 μ g/ml, em PBS) foi incubada com concentrações crescentes de BS³ (1, 2, 5 e 10 mM) por 1 hora a 26 °C na ausência de luz. Decorrido esse tempo, as amostras foram analisada por SDS-PAGE 8% de acordo com o item 3.7.

3.9. Sequência de aminoácidos

3.9.1. Determinação da sequencia N-terminal

Para a determinação da sequência N-terminal da Sp-CTx, uma amostra de aproximadamente 250 pmol dessa proteína em seu estado nativo foi submetida a

sequenciamento automático de proteínas utilizando o programa padrão de degradação de Edman. Para isso, o sequenciador automático Shimadzu PPSQ-21 foi empregado.

3.9.2. Espectrometria de massa

3.9.2.1. Digestão das proteínas

Para a predição de sequências internas, fragmentos trípticos da Sp-CTx, foram submetidos às análises por espectrometria de massas por Orbitrap. As frações dos géis (obtidos de acordo com o item 3.5) contendo as bandas de interesse foram manualmente removidas do gel, com auxílio de pipetas Pasteur de plástico. Logo em seguida as porções do gel foram descoradas por 3 lavagens de 15 minutos com 400 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25mM pH 8,0, sob leve agitação.

Apos a remoção do descorante, as frações dos géis foram tratadas com 200 μ L de acetonitrila até se tornarem opacas. A acetonitrila foi removida da amostra por concentração a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf) e, posteriormente, os fragmentos foram reidratados com 10 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo tripsina (20ng/ μ L, Promega Golden). As amostras foram mantidas por 30 minutos em banho de gelo e com o intuito de se manter o meio úmido durante todo o período de hidrólise tríptica, 20 μ L de solução de bicarbonato de amônio(50 mM) foram adicionados ao ensaio e a mistura foi incubada por 14 horas a 37 °C para assegurar a digestão tríptica.

Após o período de incubação, a solução não incorporada ao gel foi removida e os pedaços do gel foram submetidos a duas lavagens sucessivas para a completa remoção dos fragmentos trípticos. As lavagens foram realizadas em constante agitação com 30 μ L de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% por 30 minutos cada. As soluções

contendo os fragmentos trípticos foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido até aproximadamente 10 μL , por concentração a vácuo.

Posteriormente, efetuou-se a dessalinização das amostras. Para tanto, as amostras obtidas foram submetidas à micro coluna Zip-Tip (resina C18; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com solução 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Assim, os fragmentos da proteólise foram eluídos da resina com 6 μL de solução 50% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA (Vergote *et al.*, 2005).

3.9.2.2. Análise por Orbitrap

Os fragmentos, obtidos pela hidrólise tríptica, foram submetidos à nano-cromatografia de fase-reversa acoplada à espectrometria de massa nano-eletrospray de alta resolução.

Os fragmentos trípticos desalinizados (4 μL) foram aplicado na coluna 200 A Magic C18 AQ matriz (2 cm de comprimento, 100 μm de diâmetro; Michrom Bioresources, USA). Posteriormente, os fragmentos foram resolvidos numa coluna (10 cm de comprimento, 75 μm diâmetro) empacotada com a mesma matriz e com abertura de 15 μm (PicoFrit, New Objective, USA). A cromatografia foi realizada no EASY-nLC II instrument (Thermo Scientific, USA). As amostras foram aplicadas a um fluxo de 2000 nL/min enquanto que a separação ocorreu a fluxo de 200 nL/min. As fases móveis consistiram em 0.1 % (v/v) de ácido fórmico em água (A) e acetonitrila (B). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente: 2 a 40% de B em 32 minutos; 40 a 80% em 4 minutos.

Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos ao espectrômetro de massas LTQ XL/Orbitrap (Thermo, USA). Para cada espectro, os dez íons mais intensos foram submetidos à fragmentação CID (Collision-induced dissociation) seguida por aquisição MS-MS no analisador linear *trap*.

3.9.2.3. Busca de identidade de sequências

Os espectros de massas obtidos foram combinados e investigados utilizando-se o banco de dados de sequências proteicas do NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando o Peaks Client 5.3 build 20110708.

Os parâmetros da busca foram os seguintes: metazoa como taxonomia, sem restrição para peso molecular da proteína, permitido a ausência de até 2 fragmentos tripticos, oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente, nenhuma outra modificação pós-traducional foi considerada. A tolerância de massa para os peptídeos foi de 10 ppm para MS spectra e 0.6 Da para MS/MS.

A sequência de aminoácidos da Sp-CTx foi comparada com proteínas de outros peixes utilizando o alinhamento múltiplo de sequências LALIGN (<http://www.expasy.org/tools/>).

As análises de espectrometria de massas foram gentilmente realizadas pelo Drs. Jonas Perales e André Texeira-Ferreira no Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz.

3.10. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada em amostras da peçonha bruta e da toxina Sp-CTx. Os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo 20 mL de gema de ovo incorporados ao ágar de acordo com Habermann and Hardt (1972). Diluições crescentes das amostras do veneno bruto do peixe *S. plumieri* (20, 200 and 2000ug/ml) e da toxina purificada (0,5, 2, 10ug/mL) foram preparadas em PBS e testadas em duplicata. Após a incubação das amostras nas placas por 20 horas a 37°C, em câmara húmida, a atividade fosfolipásica foi detectada através de halos indicativos da hidrólise do substrato. PBS foi

utilizado como controle negativo e veneno de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 12.5–200 µg/mL como referência de atividade fosfolipásica.

3.11. Ensaio da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi testada sobre eritrócitos de coelho, de acordo com o método descrito por Habermann e colaboradores (1981) com algumas modificações.

3.11.1. Preparação da suspensão de eritrócitos

O sangue de coelho foi coletado através de punção cardíaca e imediatamente misturado com solução anticoagulante de Alsever (glicose 2,05%, cloreto de sódio 0,42%, citrato trissódico 0,8%, ácido cítrico 0,055% em água destilada) na proporção de 1:1. Para obtenção das hemácias, uma alíquota do sangue não coagulado foi primeiramente diluída (1:10 v/v) em solução salina (NaCl 150mM) e então centrifugada a 3000g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de hemácias gerado foi novamente diluído em solução salina e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de um sobrenadante incolor indicador de ausência, ou de baixa concentração, de hemácias hemolisadas. Para os ensaios hemolíticos as células lavadas foram ressuspensas em solução salina de maneira a obter-se uma suspensão a 2% (v/v).

3.11.2. Mapeamento da atividade hemolítica

A atividade hemolítica das frações obtidas nas etapas de purificação da Sp-CTx foi avaliada pela taxa de hemoglobina liberada por incubação das hemácias com alíquotas dessas amostras. A incubação foi efetuada em 1 mL de solução salina (NaCl 150 mM contendo as amostras, com 100 µl da suspensão de eritrócitos de coelho (2% v/v em PBS) a 25 °C durante 10 min. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 14.000g por

1minuto (a 25°C) e a hemoglobina liberada foi detectada no sobrenadante gerado por medida de densidade ótica a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados de alguns dos ensaios hemolíticos foram expressos como percentual de hemólise. Esse percentual foi calculado pela relação entre a absorção dos sobrenadantes gerados na presença das amostras testadas e a absorção dos sobrenadantes gerados apenas da mistura das hemácias e água destilada. Esse foi considerado o controle positivo, ou 100 % de hemólise.

3.11.3. Determinação da EC₅₀

Para determinação da EC₅₀ de hemólise do veneno bruto do *S.plumieri* e das frações hemolíticas obtidas nas etapas de purificação da Sp-CTx, concentrações crescentes (0,1 – 100000 ng/ml) das amostras (contidas em 1000µl de PBS) foram incubadas com 100 µl da suspensão de eritrócitos (2% v/v em PBS) a 37 °C por 30 minutos. Decorrido esse tempo, as misturas foram centrifugadas e a hemoglobina liberada foi detectada no sobrenadante gerado como descrito anteriormente (item 3.11.2). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.11.4. Ensaio de proteção osmótica

O ensaio de proteção osmótica foi realizado para verificar se o efeito hemolítico da Sp-CTx é devido à formação de poros na membrana.

Para isso, amostras da toxina (10^{-11} M), considerando a massa molecular de 120 kDa), equivalentes a 2x o EC₅₀, contidas em 1000 µL de PBS, foram incubadas a temperatura ambiente com 100 µL da suspensão de eritrócitos de coelhos (obtidos de acordo com o item 3.9.1) na presença de polietilenoglicol (PEG, 30 mM).

PEGs de diferentes tamanhos moleculares (1.000 1.450 e 6.000 g com diâmetros hidrodinâmicos S_{Er} - Stokes-Einstein de 1.0; 1.2 e 3.05 nm, respectivamente) foram

empregados. O período máximo de incubação variou dependendo do PEG utilizado e não ultrapassou 120 min. O curso temporal da lise dos eritrócitos induzida pela toxina foi acompanhado pela redução da turbidez a 700 nm e em temperatura ambiente, sendo que a absorbância inicial foi de aproximadamente 0,9.

A permeabilidade relativa do açúcar através dos poros foi estimada pela relação entre $t_{1/2}$ (tempo necessário para que 50% da hemólise fosse observada) e os raios dos protetores osmóticos foram obtidos de Kuga e colaboradores (1981).

3.12. Ensaio cardiovasculares

3.12.1. Ensaio *in vivo*

Efeitos da Sp-CTx e sobre a pressão sanguínea, sistólica e diastólica, e sobre a frequência cardíaca foram avaliados em ratos Wistar (250 – 300g), como descrito anteriormente no item 3.5.3. O acesso à veia jugular foi utilizado para a injeção *in bolus* das amostras Sp-CTx (70 µg/Kg) contidas em 100 µL de salina (NaCl 0,15M).

3.12.2. Ensaio *in vitro*

3.12.2.1. Coração isolado

Os estudos da ação cardiovascular foram realizados em corações isolados de ratos Wistar (250-300 g) utilizando o método de Langendorff (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Germany), de acordo com o descrito por Doring, 1990. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (65 mg/kg, ip) e heparinizados (100 units/kg) a fim de evitar coagulação sanguínea no leito vascular coronariano. Quinze minutos após a injeção de heparina, o tórax foi aberto e o coração foi rapidamente dissecado de suas

conexões e imediatamente transferido para o aparelho de perfusão através da canulação da aorta.

A canulação da aorta foi realizada ao nível de sua curvatura por onde o coração foi perfundido retrogradamente com solução de Krebs modificada (contendo, em mM: NaCl - 120, CaCl₂·2H₂O - 1.26, KCl - 5.4, MgSO₄·7H₂O - 2.5, NaH₂PO₄·H₂O - 2, NaHCO₃ - 27 ; Na₂SO₄ - 1.2; EDTA - 0.03 e glicose 11mM) e continuamente mantida a 37° C e saturada com mistura Carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂ (pH mantido a 7,4). O fluxo foi mantido constante (10 ml/min) por meio de uma bomba peristáltica (Hugo Sachs, Germany), para que as alterações na pressão de perfusão fossem diretamente relacionadas às mudanças na resistência vascular. Um balão de látex preenchido com água foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor (TPS-2 Statham, Incor, São Paulo, SP, Brasil), através de uma cânula de aço. Posteriormente o balão foi pressurizado até atingir a pré-carga de 10 mmHg. O cateter de perfusão da aorta também foi conectado a um transdutor (TPS-2 Statham). Para evitar o acúmulo de líquido na cavidade ventricular, realizou-se uma leve perfuração no ventrículo esquerdo. Para a aquisição de dados foi utilizado o PowerLab, Ad Instruments, Austrália, sendo que a taxa de amostragem foi de 1KZ.

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

Após 30 minutos de estabilização da preparação, os parâmetros basais foram medidos e as amostras da Sp-CTX (10^{-9} a 10^{-5} M) foram administradas *in bolus*. Todas as respostas foram expressas como porcentagem de mudança a partir do valor basal da pressão de perfusão coronariana, da pressão ventricular esquerda máxima da $+dP/dt$ e $-dP/dt$.

3.12.2.2. Músculo papilar isolado

Os efeitos do veneno bruto, das frações cromatográficas e da toxina Sp-CTX, sobre a força e os parâmetros temporais da contração isométrica muscular, foram avaliados utilizando-se músculos papilares isolados de corações de rato.

Os ratos foram heparinizados e anestesiados com pentobarbital sódico e sacrificados. Após a toracotomia, os corações foram removidos e imediatamente perfundidos retrogradamente através do coto aórtico, possibilitando a adequada seleção e dissecação dos músculos papilares do ventrículo esquerdo.

Após serem dissecados, os músculos foram montados em câmaras (20 mL) plexiglass. As duas extremidades dos músculos foram primeiramente fixadas às argolas, uma delas foi presa a uma extremidade fixa e a outra foi ligada a um transdutor de força, dentro da câmara plexiglass, onde foram mantidos em super-perfusão contínua com solução de Krebs-Henseleit (em mM, NaCl 120; KCl 5,4; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,25; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 2,0; Na_2SO_4 1,2; $NaHCO_3$ 27; glicose 11) e constantemente saturada com mistura carbogênica (5% de O_2 e 95% de CO_2). Para evitar a possibilidade de hipóxia os experimentos foram realizados a 27 °C como previamente descrito por Vassallo e Paes de Carvalho (1979).

Posteriormente à montagem, os músculos papilares foram estirados até L_{max} (comprimento do músculo na qual a tensão ativa é máxima) e foram estimulados por

pulsos retangulares (frequência de 0,5 Hz) através de um par de eletrodos de platina posicionado ao longo de toda a extensão do músculo por 12 segundos.

As preparações foram mantidas por um período de estabilização antes da administração das amostras (veneno bruto, amostras provenientes das etapas da purificação da Sp-CTx e desta toxina) cujas doses foram determinadas experimentalmente. A força desenvolvida foi medida por meio de um transdutor de força isométrica (Nihon-Kohden, TB, 612 T, Tokyo) acoplado a um amplificador (DA100C Biopac System Inc, CA, USA) e a aquisição de dados foi realizada através do Biopac System MP100, Inc, CA, (USA) com taxa de amostragem de 500 amostras/s.

3.12.2.2.1. Protocolos experimentais

3.12.2.2.1.1. Força de contração isométrica e parâmetros temporais

A força desenvolvida e os parâmetros tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR) foram medidas em músculos papilares isolados após o período de estabilização, de acordo com o item anterior. O TA e o TR correspondem aos tempos, em milissegundos, decorridos do início da contração até o pico máximo de força, e do pico máximo de força até o período de relaxamento isométrico, respectivamente.

As amostras das frações obtidas durante o processo de purificação da Sp-CTx do SpV (1,0; 2,5; 7,5; 12,5 e 25 µg/mL) e da Sp-CTx (10^{-7} M) foram adicionados ao banho de perfusão e os parâmetros medidos novamente. Os resultados da força isométrica foram expressos em porcentagem calculados a partir da força desenvolvida antes e após a administração da amostra ou PBS (controle).

3.12.2.2.1.2. Tratamento dos papilares isolados com propranolol

A fim de se analisar a participação dos receptores beta-adrenérgicos nos efeitos do SpV e da Sp-CTx sobre músculos paliars, estes receptores foram bloqueados com propranolol 10 μ M. Após o período de estabilização da preparação a solução nutritora Krebs-Henseleit de perfusão foi substituída por uma nova solução adicionada do bloqueador. Após a substituição aguardou-se mais 20 minutos (para a preparação estabilizasse novamente) para a administração do veneno bruto (1,0; 2,5; 7,5; 12,5 e 25 μ g/mL) e da toxina Sp-CTx (10^{-7} M). Os resultados da força isométrica foram expressos em porcentagem calculados a partir da força desenvolvida antes e após a administração da amostra ou PBS (controle).

3.12.2.2.1.3. Tratamento dos papilares isolados com tiramina

A fim de se avaliar o envolvimento da liberação de norepinefrina nos efeitos induzidos pelo SpV (1,0; 2,5; 7,5; 12,5 e 25 μ g/mL) e pela toxina Sp-CTx (10^{-7} M), os estoques adrenérgicos dos músculos papilares foram depletados. Para isso, após estabilização da preparação a tiramina (10^{-4} M) foi adicionada à preparação repetidas vezes até que não se observava mais resposta inotrópica positiva. Posteriormente, lavaram-se os músculos papilares com solução nutritora Krebs-Henseleit, e só após o período de estabilização as amostras a serem testadas foram administradas. Os resultados da força isométrica foram expressos em porcentagem calculados a partir da força desenvolvida antes e após a administração da amostra ou PBS (controle)

3.12.2.2.1.4. Potenciação relativa após pausa de 30 segundos

Objetivando-se avaliar o envolvimento putativo do retículo sarcoplasmático nos efeitos da Sp-CTx empregou-se o protocolo de potenciação relativa pós-pausa (Vassallo e Mill, 1986; Leite *et al.*, 1991; Mill *et al.*, 1992). Após o período de estabilização da preparação e atingida a L_{max} do músculo papilar, cessou-se o estímulo elétrico por 30

segundos. Durante essa pausa amostras da Sp-CTx (10^{-7} M) foram administradas ao banho de perfusão, e decorrido os 30 segundos, o estímulo foi religado e a amplitude de contração imediatamente após a pausa foi aferida. A potenciação relativa foi considerada como a razão entre a amplitude da contração após a pausa do estímulo elétrico e a amplitude da contração antes da pausa.

3.12.2.2.1.5. Força desenvolvida após repouso de 10 minutos

Objetivando-se avaliar o envolvimento putativo sarcolemal no efeito causado pela Sp-CTx, empregou-se o protocolo de potenciação pós-repouso de acordo com Fioresi *et al.*, 2013. Para isso, os músculos foram repetidamente lavados com solução de Krebs-Henseleit, destituída de íons cálcio e adicionada de 10 mM de cafeína até não houvesse contração muscular.

Em seguida, o estímulo elétrico dado aos músculos papilares era cessado por 10 minutos. Ao final da pausa, trocou-se a solução do banho por solução de Krebs-Henselt, a toxina Sp-CTx foi adicionada ao banho (concentração final 10^{-7} M), e após 30 segundos, o estímulo foi religado. Os dados de força após pausa de 10 minutos foram representados como a razão entre a força desenvolvida após o estímulo ser reiniciado e a força desenvolvida imediatamente antes do músculo ser exposto à solução Krebs-Henseleit sem sais de cálcio.

3.12.2.3. Eletrofisiologia de cardiomiócitos isolados

3.12.2.3.1. Preparo dos cardiomiócitos.

Para os experimentos de eletrofisiologia e análise do transiente intracelular de cálcio, foram utilizados cardiomiócitos obtidos por processo enzimático de acordo com a metodologia descrita por Mitra e Morad (1985) com algumas modificações.

Inicialmente, os ratos foram sacrificados por decapitação e o coração removido rapidamente e perfundidos, através do sistema de Langendorff, canulando-se a artéria aorta. Os corações foram perfundidos retrogradamente durante 5-10 minutos com solução nutritora de Tyrode livre de Ca^{2+} contendo em mM: 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl_2 , 0.33 NaH_2PO_4 , 3 piruvato, 22 glicose e 25 HEPES (pH 7.4). Em seguida, foram perfundidos por 10-15 minutos a 37°C com solução Tyrode contendo 1 mg/mL de colagenase tipo II (Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ, USA).

Os corações digeridos foram então removidos da cânula e os ventrículos gentilmente agitados, centrifugados (180g, durante 10 minutos a temperatura ambiente) e os cardiomiócitos obtidos foram mantidos em meio de cultura DMEM (dulbecco's modified eagle's médium). Vale ressaltar que apenas as células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas nos experimentos; num período de até 6 horas após seu preparo.

3.12.2.3.2. Medidas da corrente de cálcio (I_{Ca})

A corrente de cálcio (I_{Ca}) nos cardiomiócitos foi medida na ausência e na presença da Sp-CTx (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para medir esta corrente foi utilizada como solução interna (mM): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2 ajustado com CsOH, sendo a solução externa Tyrode. I_{Ca} foi medida entre os potenciais de -40 a 50 mV, com duração de 300 ms, com incrementos de 10 mV, partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 50 ms de duração, partindo do potencial de membrana a -40 mV, foi aplicado para inativar as I_{Na} sendo que a aquisição dos dados foi realizada com frequência entre pulsos de 0.1 Hz, e frequência de aquisição a 10 kHz.

3.12.2.4. Microscopia confocal de cardiomiócitos isolados

Para a realização da medida do transiente de cálcio intracelular, foi feita incubação dos cardiomiócitos obtidos conforme item 3.13.3.1 com uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (fluo-4 AM – 5 $\mu\text{mol/L}$) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Esta medida foi efetivada antes e após a adição da Sp-CTx (5 $\mu\text{g/mL}$ ou 1 ng/mL).

Após a marcação, as células cardíacas foram estimuladas a 1,0 hertz. Após a aplicação de 8 pulsos elétricos foi feita uma varredura repetitiva ao longo de uma linha no eixo longitudinal das células (512 x 3000 pixels), com laser de argônio (488 nm) e frequência de aquisição 1,54 ms, utilizando-se o microscópio Confocal Zeiss 510 Meta (Guatimosim *et al.*, 2001). A liberação global de Ca^{2+} foi analisada pelo software IDL 6,0 (Research System, Inc., Boulder, CO)

3.13. Análise estatística.

Os valores foram expressos como média \pm SEM. Quando necessário, os dados foram avaliados usando-se análise de variância (ANOVA) duas vias ou Teste *t* não pareado. Quando a ANOVA revelou diferença significativa, foi seguida de teste *post hoc* de Bonferroni. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferença significativa entre os grupos.

4. Resultados

4.1. Neutralização dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo veneno do *S. plumieri* pelo soro contra o veneno do peixe-pedra (SFAV)

A administração do SpV (300 µg/kg, i.v.) em ratos anestesiados causou um aumento de 36.9 ± 4.0 mmHg na pressão arterial média e induziu bradicardia, observada pela diminuição de 65 ± 9 bpm na frequência cardíaca (figura 12). Esses efeitos foram imediatos e transientes, sendo que os valores da pressão arterial média e da frequência cardíaca retornaram para valores basais 2-6 minutos após a aplicação do veneno.

A pré-incubação do SpV com SFAV (proporção de 1 mg / 1 U) reduziu em 88% o efeito pressórico e 87% o efeito bradicárdico induzidos pelo veneno. Após a administração da mistura o aumento observado para a mesma dose foi de apenas 4.6 ± 0.8 mmHg e redução de 8.3 ± 2.2 bpm.

Os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca dos ratos anestesiados no início do protocolo experimental foi de 120 ± 4.5 mmHg, 80 ± 7.0 mmHg e 320 ± 20 bpm, respectivamente. A administração do veículo (PBS) não surtiu efeito significativo sobre os parâmetros analisados.

4.2. Reatividade cruzada entre o veneno bruto (SpV) do *Scorpaena plumieri* e o soro contra o veneno do *Synanceja trachynis* (SFAV).

Dois métodos foram utilizados (ELISA e immunoblotting) para confirmar a reatividade cruzada entre os venenos do peixe-pedra *Synanceja trachynis* e do peixe-escorpião *S. plumieri*.

A figura 13 mostra a curva de titulação do SpV com SFAV usando ELISA. Como pode ser observado, o soro apresenta reatividade imunológica consistente com os

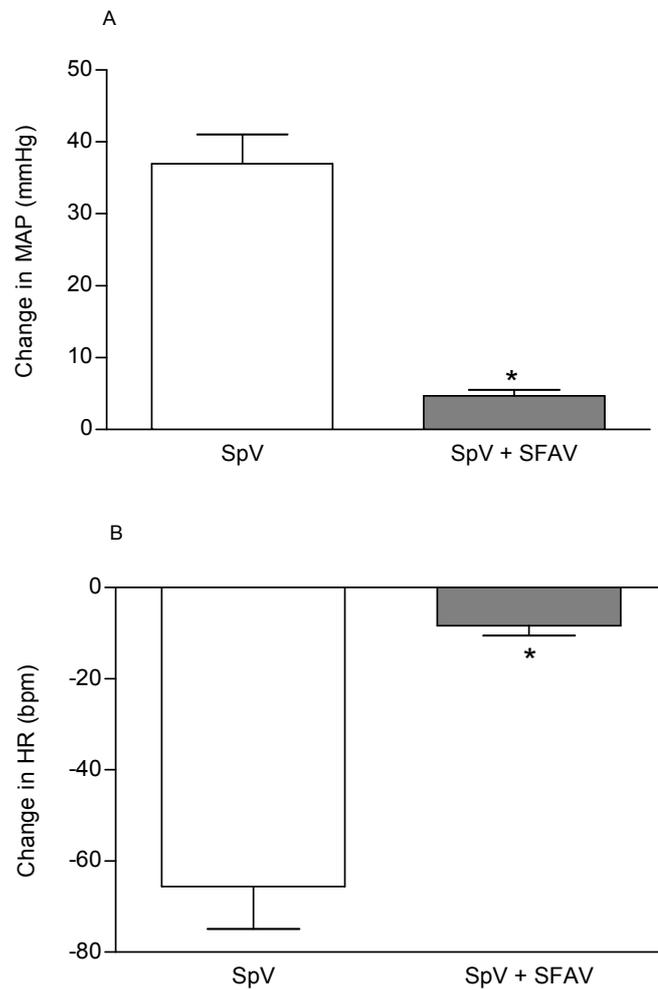


Figura 12 – Alterações induzidas pelo veneno do peixe-escorpião (SpV, 300µg/Kg) sobre a pressão arterial média (MAP) (A) e frequência cardíaca (HR) (B) e redução dos efeitos pela pré-incubação do veneno com soro contra o peixe pedra (SFAV, 1 mg / 1 U a 25°C por 5 min) Dados expressos em média ± EPM. * $p < 0.05$ comparado à administração de SpV; N=6 em cada grupo. Bpm: batidas por minuto.

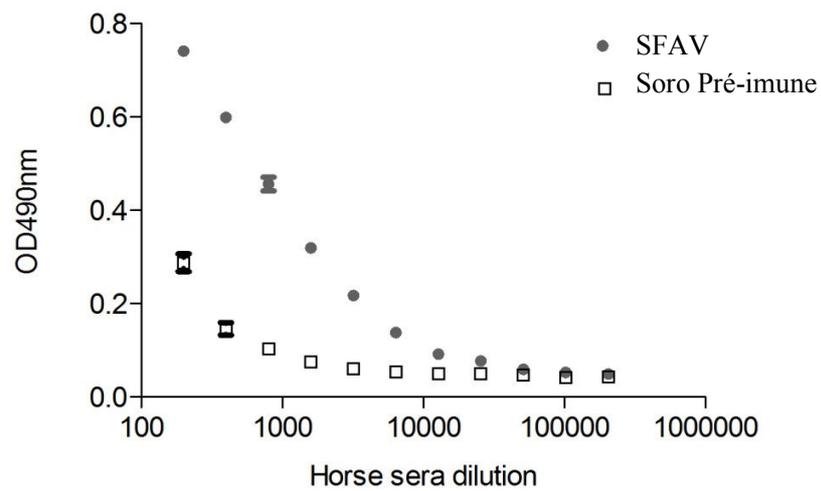


Figura 13 – Caracterização por ELISA da reatividade do veneno do peixe *S. plumieri* ao soro contra o veneno do peixe-pedra (SFAV). O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo. A reação foi visualizada pela incubação com IgG acoplada à peroxidase.

antígenos do SpV. Sob as condições experimentais utilizadas no presente trabalho, a reatividade cruzada com SFAV foi observada nas diluições até 1:1000 de SFAV. Vale ressaltar que o soro pré-imune, utilizado como controle, não reagiu de forma significativa.

A figura 14 mostra o perfil proteico do SpV por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) focalizados na faixa de pH 3 a 10 (figura 14-A) e 4 a 7 (figura 14-B). Este gel foi utilizado para posterior análise por *Western blotting* com SFAV. Na figura 14-C pode-se observar que apenas poucos spots proteicos foram reconhecidos pelo SFAV. Estes spots apresentaram massa molecular aparente de aproximadamente 98 kDa e ponto isoelétrico de 6 a 7.

4.3. Efeitos do veneno bruto (SpV) do *S. plumieri* sobre músculo cardíaco.

4.3.1. Efeito sobre a força de contração isométrica

Como é possível observar na figura 15-A, o SpV induz de forma concentração-dependente aumento da força de contração isométrica de forma significativa. O aumento foi observado em torno de 30 a 60 segundos após a administração do veneno e correspondeu a aproximadamente 23; 34; 60 e 87, 163 e 158 % para as concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente. A resposta inotrópica teve duração de 3 a 5 minutos, aproximadamente. Decorrido esse tempo, os valores de força de contração retornaram aos valores basais.

O propranolol (10 µM), um bloqueador beta-adrenérgico, reduziu a resposta inotrópica positiva induzida pelo veneno bruto. A resposta observada para as concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 25 µg/mL foram de aproximadamente 18, 22, 37, 57, 109 e 104%, respectivamente (figura 15-A).

O tratamento prévio da preparação com tiramina (10^{-4} M) também atenuou o efeito inotrópico positivo induzido pelo SpV nos músculos papilares. O efeito foi atenuado para

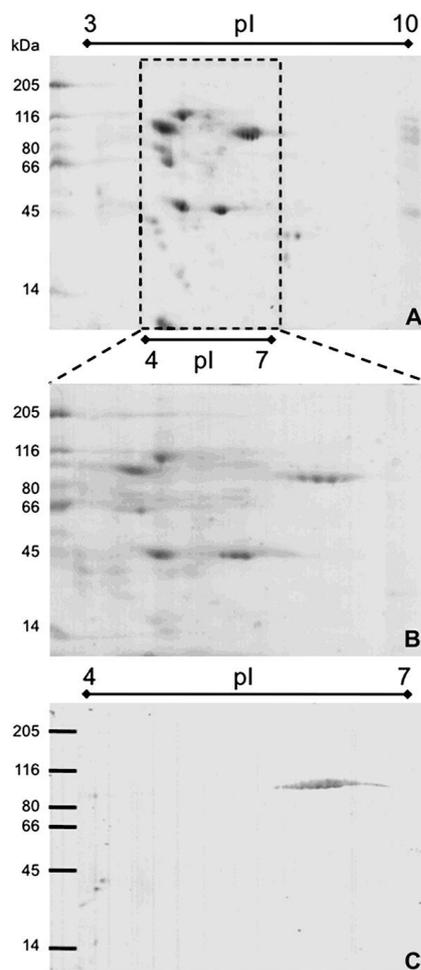


Figura 14 - Perfil eletroforético bidimensional obtido do veneno do peixe-escorpião *S. plumieri*. Amostras do SpV focalizadas em *Strips* com gradiente linear de pH imobilizado na faixa de 3,0 - a 10 (A) e de 4 a 7 (B e C). *Western immunoblot* do SpV com antisoro contra peixe-pedra (SFAV) (C). As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando-se SDS-PAGE (10%)

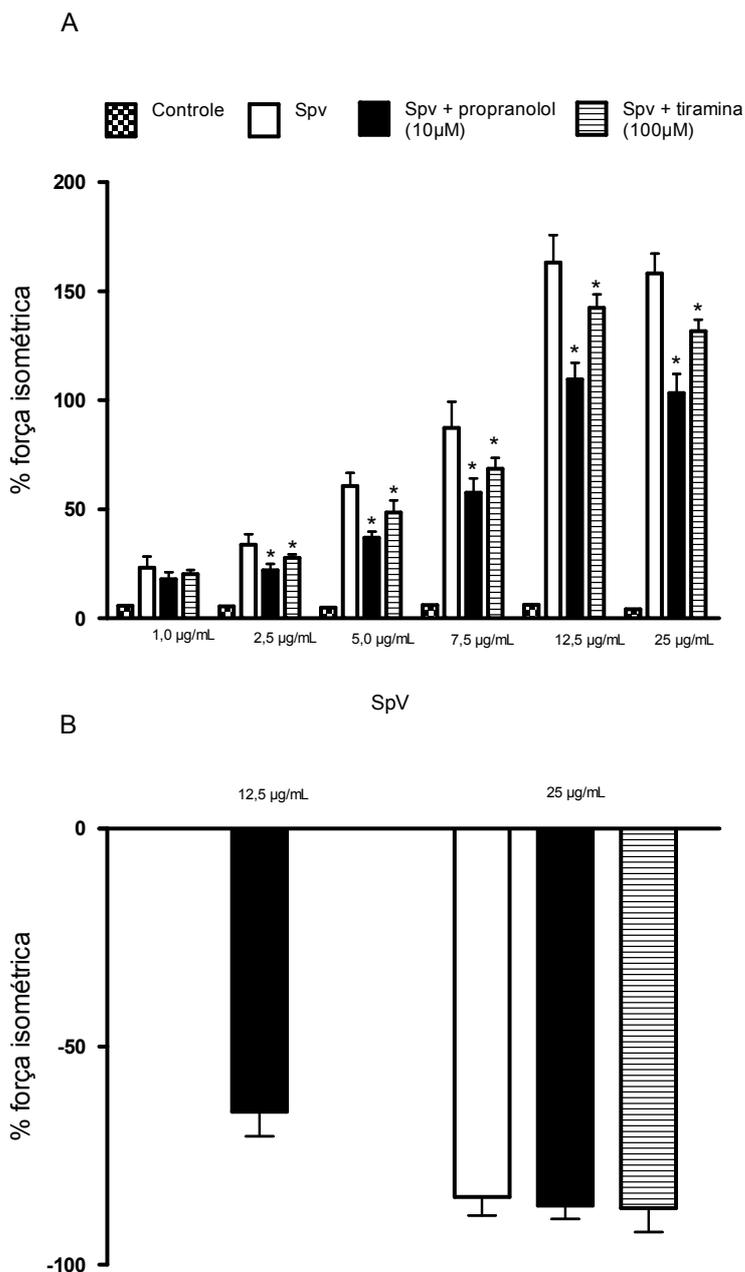


Figura 15 – Efeitos do veneno de *Scorpaena plumieri* (SpV) sobre a força de contração isométrica de músculos papilares. Primeira fase (A) e segunda fase (B) da resposta a diferentes concentrações SpV (µg/mL), na presença e ausência de propranolol ou tiramina, sobre a força isométrica de contração. O PBS adicionado de glicerol 10% foi utilizado como controle. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à resposta induzida pelo veneno; N=6 em cada grupo.

aproximadamente 20, 28, 48, 68, 142, 131% para as concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 25 µg/mL; respectivamente.

Na concentração de 1,0 µg/mL de SpV não foram observadas diferenças entre a resposta induzida pelo veneno e a induzida na presença do propranolol ou tiramina. (figura 15-A).

Após o efeito inotrópico positivo também foi observado um efeito inotrópico negativo para concentrações maiores que 7,5 µg/mL. A concentração de 25µg/mL do SpV reduziu a força de contração em aproximadamente 84% . O propranolol (10µM) ou o tratamento prévio da presença com tiramina (10^{-4} M), não alterou de forma significativa essa redução. Os valores não retornaram aos basais resultando na ausência de contração. O efeito inotrópico negativo para a concentração de 12.5 µg/mL foi observado apenas na presença do propranolol, e correspondeu a aproximadamente 64% de redução da força de contração isométrica (figura 15-B).

4.3.2 Efeitos sobre o tempo de ativação e tempo de relaxamento

Os parâmetros tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR) foram analisados em músculos papilares isolados antes e após a administração do veneno bruto do peixe *S. plumieri*. Os resultados obtidos são mostrados na figura 16. Observa-se que o veneno bruto não alterou estes parâmetros nas concentrações testadas, pois os valores antes e após a exposição dos músculos ao SpV não demonstraram diferença estatística significativa.

4.3.3 Efeitos sobre a dF/dt

A figura 17 ilustra a análise dos efeitos do SpV sobre a primeira derivada positiva temporal (dF/dt) da força de contração isométrica desenvolvida por músculos papilares isolados. O veneno induz, em 30 a 60 s, de forma concentração-dependente, efeito

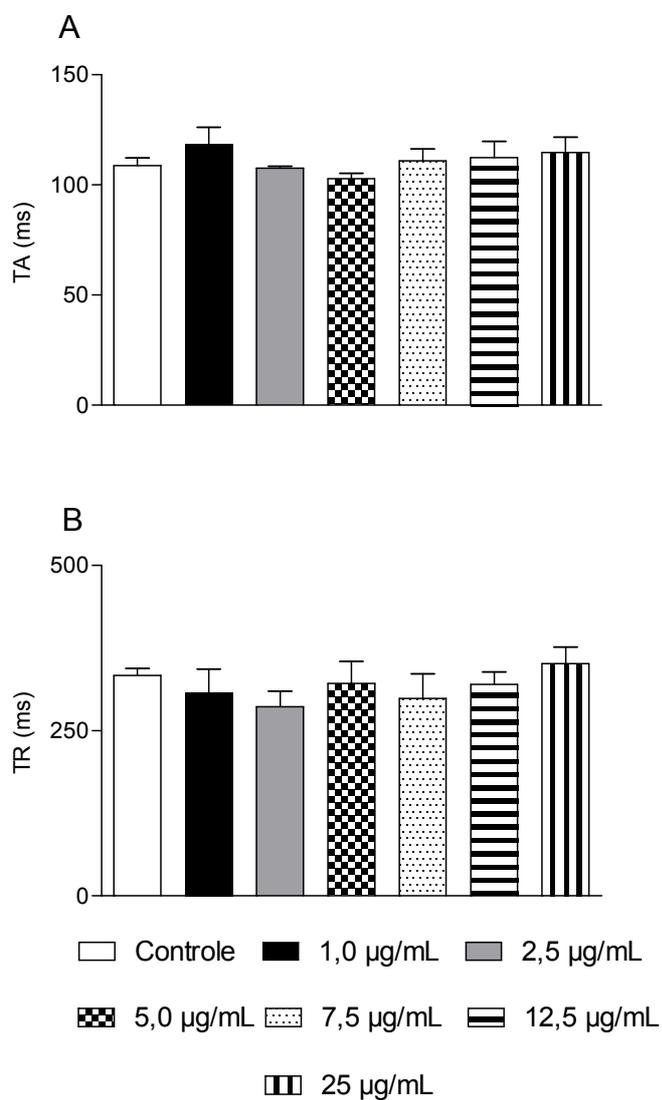


Figura 16 – Efeitos de diferentes concentrações do SpV ($\mu\text{g/mL}$) sobre características temporais da contração de músculos papilares. (A) Tempo de ativação (TA) e (B) tempo de relaxamento (TR). Dados expressos em média \pm EPM. O controle (PBS com glicerol 10%) não alterou de forma significativa os parâmetros analisados. N=6 em cada grupo.

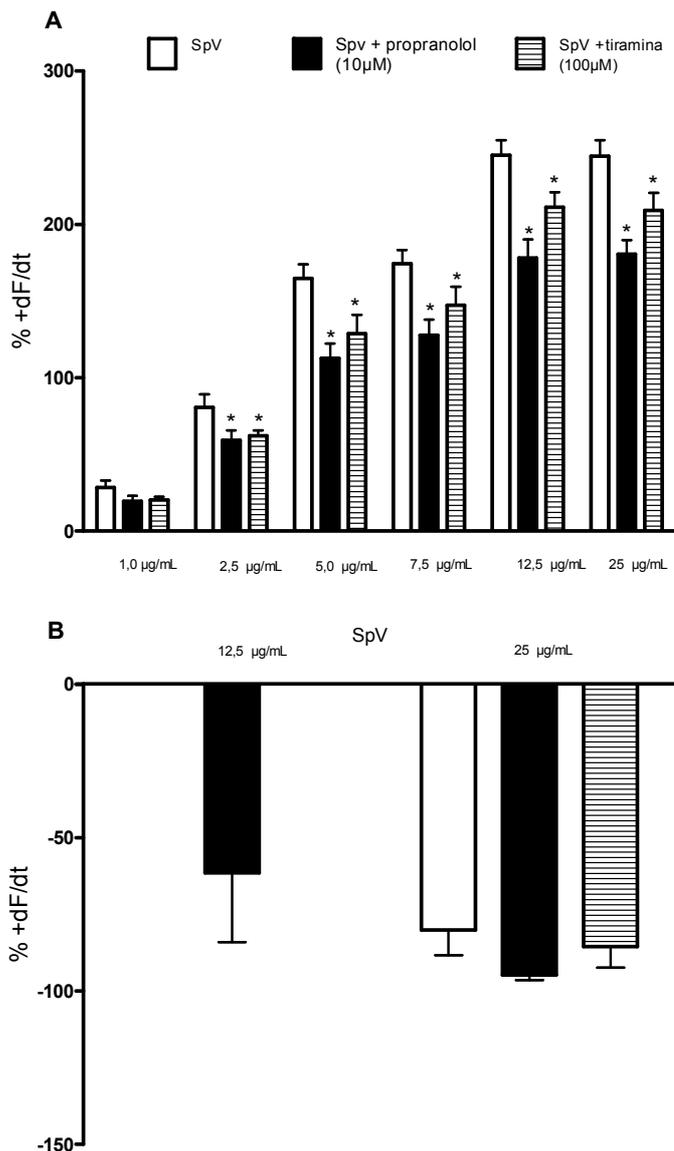


Figura 17 – Efeitos de diferentes concentrações do SpV ($\mu\text{g/mL}$) sobre músculos papilares. (A) primeira e (B) segunda fase da resposta na presença e ausência de propranolol ou tiramina, sobre a primeira derivada positiva temporal (dF/dt) da força de contração isométrica. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à resposta induzida pelo veneno. O controle (PBS com glicerol 10%) não alterou de forma significativa o parâmetro analisados. $N=6$ em cada grupo.

inotrópico positivo o qual é representado pelo aumento da dF/dt . Esta resposta foi observada concomitantemente ao aumento da força de contração isométrica.

As concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ do SpV, aumentaram a dF/dt em 28, 80, 164, 174, 245, 244% respectivamente. A resposta persistiu por 3 a 5 minutos, e decorrido este tempo, os valores retornaram aos basais (figura 17-A).

A presença do propranolol (10 μM) reduziu o efeito do SpV sobre a dF/dt para 19, 59, 112, 127, 178, 180% nas concentrações testadas (figura 17-A). O tratamento prévio da preparação com tiramina (100 μM) também atenuou este efeito. Os valores de dF/dt foram de 20, 29, 52, 72, 142, 141% para as concentrações testadas. Esta resposta, para a concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou diferença estatística significativa na presença ou ausência da tiramina ou propranolol (figura 17-A).

Além do efeito positivo, uma redução, de aproximadamente 80%, da dF/dt também foi observada em resposta às concentrações de 12 e 25 $\mu\text{g/mL}$ do SpV, a qual não foi alterada pelo propranolol ou a tiramina. Entretanto, a concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziu este parâmetro somente presença do propranolol (Figura 17-B).

4.4. Otimização do processo de purificação da toxina Sp-CTx

A purificação da citolisina Sp-CTx foi realizada em três etapas compreendendo precipitação salina e duas etapas cromatográficas sendo que todo o processo foi monitorado pela atividade hemolítica e cardíaca sobre músculo papilar isolado. A figura 18 mostra o fluxograma do procedimento de purificação.

4.4.1. Primeira etapa da purificação: precipitação salina

A primeira etapa da purificação envolveu o fracionamento do veneno bruto por precipitação salina com sulfato de amônio. Através desse procedimento, três frações

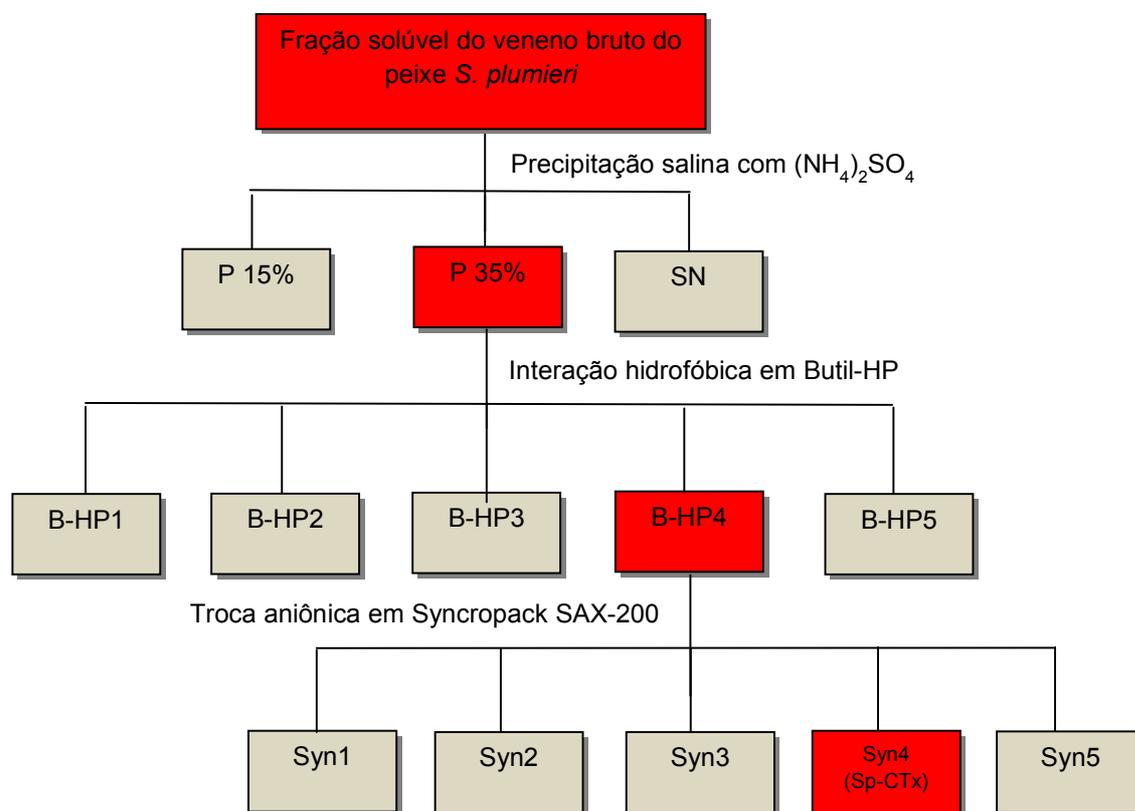


Figura 18 - Fluxograma do processo de purificação da Sp-CTx a partir da peçonha do *Scorpaena plumieri*. P - precipitado, SN - sobrenadante, B-HP - Butil *High Performance* e Syn - Synchronpak. Os retângulos vermelhos são referentes às frações com atividade hemolítica e cardiovascular.

proteicas foram obtidas, a precipitada com 15%, a precipitada com 35 % do sal e o sobrenadante final.

A fração precipitada com 35% (P35%) apresentou atividade hemolítica significativa sobre eritrócitos de coelho a qual foi 2.1 vezes maior que a do veneno bruto (EC_{50} do SpV = 592 e da P35% = 282 ng/mL, figura 19). Além disso, foi a única fração que apresentou atividade sobre músculos papilares isolados (figura 20). Essa fração ativa foi denominada de CF-I (*Cytolytic Fraction I*) e foi empregada na etapa posterior da purificação. A CF-I correspondeu a 38% do total proteico do material inicial com recuperação de 80% da atividade inicial (tabela 2).

A fração precipitada por 15% de sulfato de amônio e o sobrenadante final apresentaram baixa atividade hemolítica quando comparada ao P35% (EC_{50} = 11323 ng/mL e 181318 ng/mL, respectivamente, figura 19), e não apresentaram atividade cardíaca (figura 20).

4.4.2. Segunda etapa da purificação: cromatografia de interação hidrofóbica

Utilizou-se cromatografia de interação hidrofóbica, em um sistema HPLC, como a segunda etapa do processo de purificação da Sp-CTX. Esse processo separou a CF-I em cinco frações (figura 21-A). Os eluatos associados ao quarto pico proteico, eluído com aproximadamente 0,2 M de $(NH_4)_2SO_4$, apresentaram atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho, a qual foi 5.3 vezes maior que a do veneno bruto, e atividade sobre músculos papilares isolados (figura 21-B e C). Esse material foi agrupado, denominado de CF-II (*Cytolytic Fraction II*). O EC_{50} (atividade hemolítica) da CF-II foi 111 ng/mL (figura 21-B), o rendimento dessa etapa foi 15% e CF-II correspondeu a aproximadamente 3% do total de proteínas inicial e 8% da CF-I (Tabela 2).

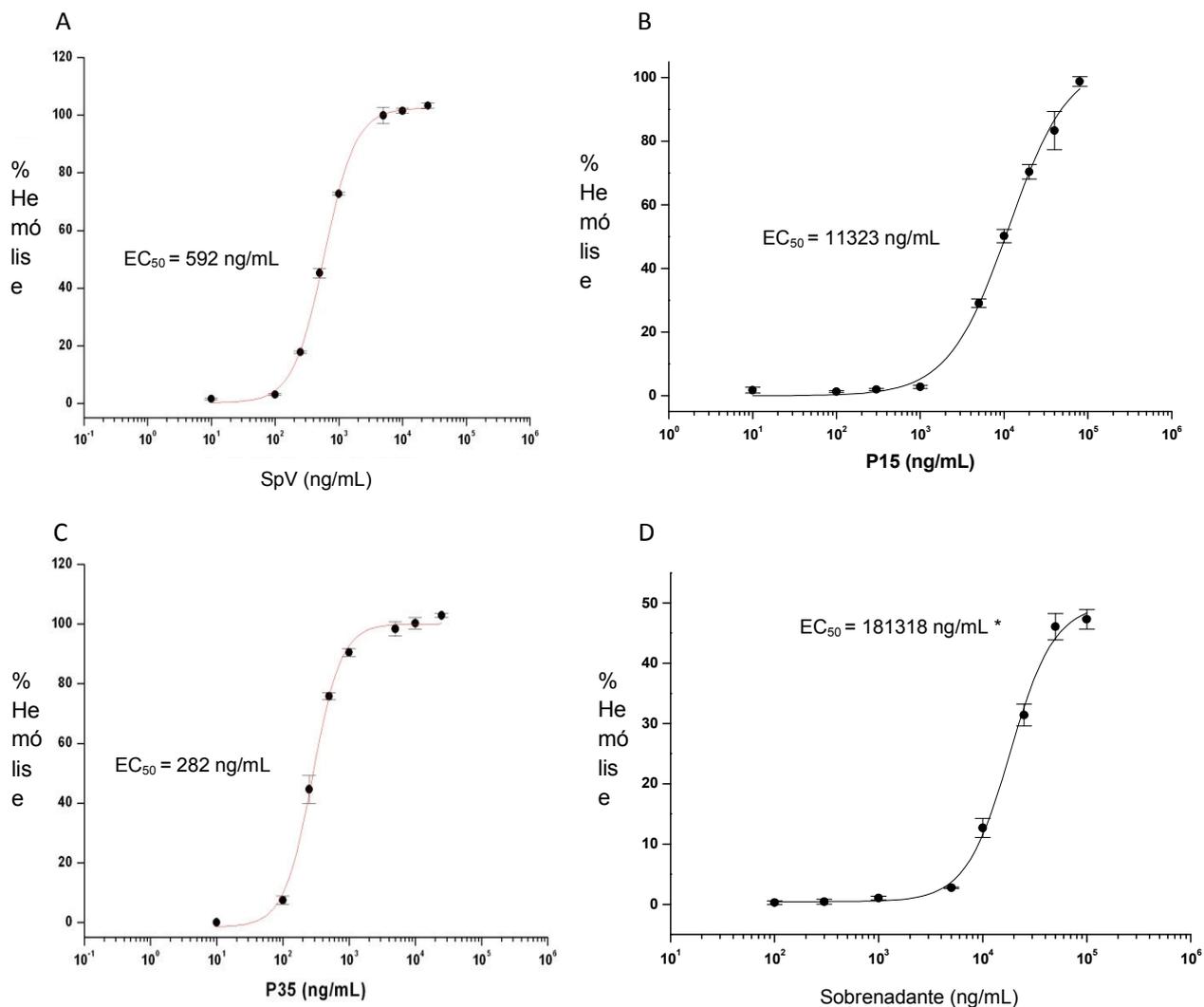


Figura 19 – Curva da atividade hemolítica do veneno bruto (A), das frações proteicas precipitada por 15% (B) ou 35 % (C) de sulfato de amônio, e do sobrenadante final (D). Os resultados estão expressos como porcentagem de hemólise por comparação com o controle positivo (hemácias incubadas com água destilada). Os pontos representam a média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram realizados em triplicata. (*) Valor estimado.

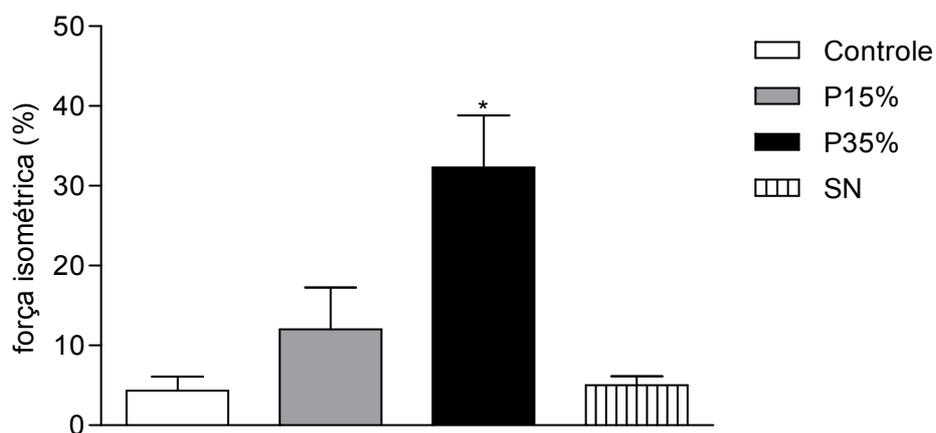


Figura 20 – Efeito cardíaco das frações obtidas através precipitação salina do SpV. Amostras de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de P15%, P35% e SN (sobrenadante final) foram testadas sobre músculos papilares isolados. O PBS foi utilizado como controle. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à resposta induzida pelo controle; N=5 em cada grupo.

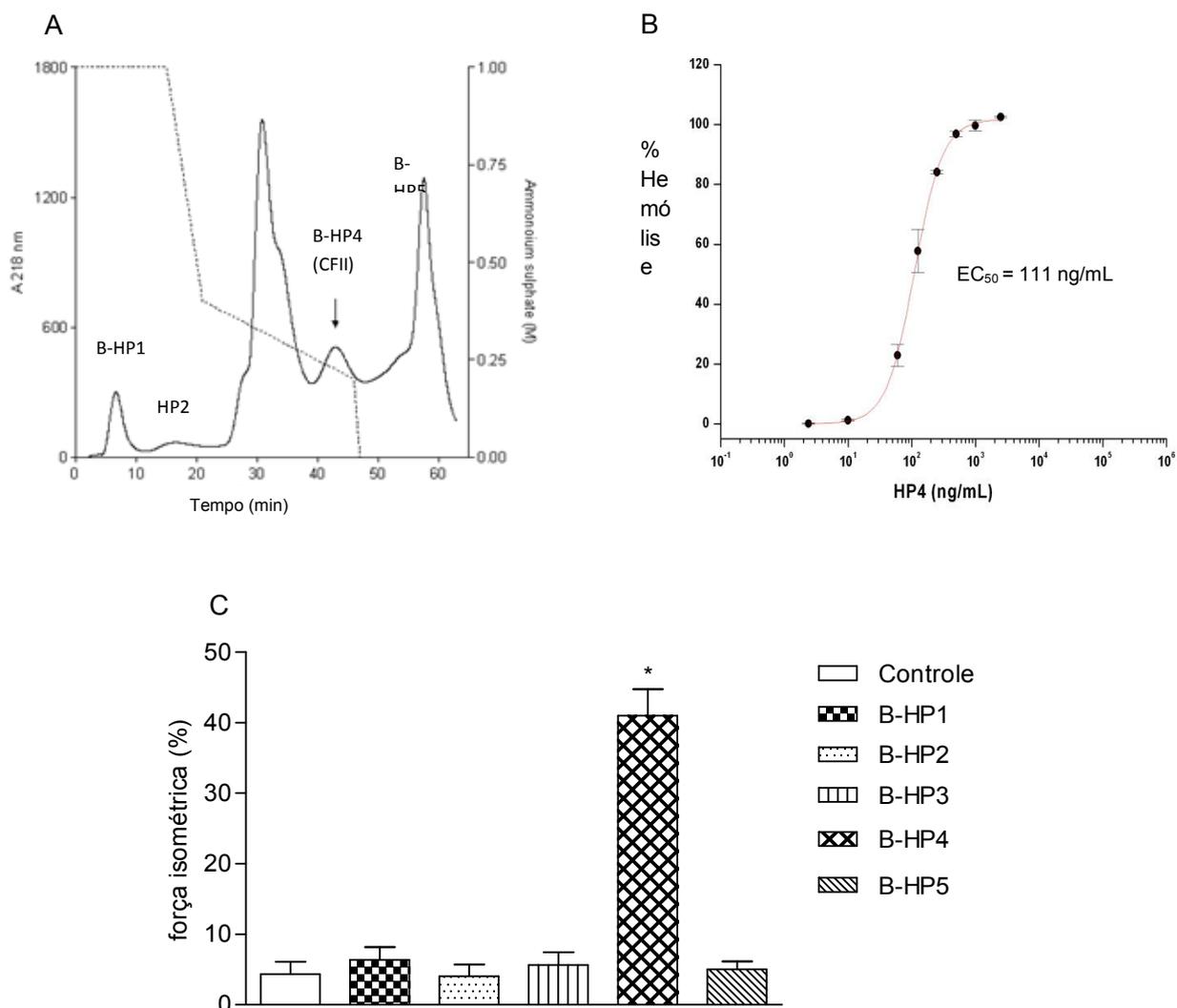


Figura 21 - (A) Perfil cromatográfico (interação hidrofóbica, coluna HiTrap[™] Butyl HP) referente à segunda etapa do processo de purificação da Sp-CTx. (B) Atividade hemolítica da fração B-HP4. Resultados expressos em porcentagem de hemólise por comparação com o controle positivo (hemácias incubadas com água destilada). Os ensaios foram realizados em triplicata. (C) Efeitos das frações B-HP1, 2, 3, 4 e 5 (1 µg/mL) sobre papilares isolados. O PBS foi utilizado como controle. Dados expressos em média ± EPM. *p<0,05 comparado à resposta induzida pelo controle; N=5 para cada grupo.

4.4.3. Terceira etapa da purificação: cromatografia de troca aniônica

A terceira etapa de purificação da toxina consistiu em cromatografia de troca aniônica. A amostra CF-II (obtida na etapa anterior) foi fracionada em cinco picos proteicos principais, o perfil cromatográfico obtido está mostrado na figura 22-A.

Observou-se que a atividade hemolítica e a atividade sobre músculo papilar estavam associadas ao quarto pico eluído com aproximadamente 0.4 M de NaCl, o qual corresponde à Sp-CTx (*Scorpaena plumieri* cytotoxic toxin) (figura 22-B e C). Partindo-se de aproximadamente 48,7 mg do veneno bruto, 270 µg de Sp-CTx foram obtidos. O rendimento final foi de 13% e o EC_{50} da toxina foi 25 ng/mL, o qual é 24 vezes maior que o do SpV (tabela 2).

4.4.4. Análise da homogeneidade por SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE em condições redutoras revelaram que a Sp-CTx migrou como uma única banda equivalente a 71 kDa (figura 23, linha B), sugerindo o alto grau de homogeneidade da amostra da toxina. Em condições não-redutoras a toxina migrou como duas bandas proteicas equivalentes a 71 kDa e 150 kDa (figura 23, linha C).

4.5. Propriedade físico-químicas da Sp-CTx

4.5.1. Ensaio de “cross-linking”

A figura 24 mostra o gel (SDS-PAGE) contendo o perfil de oligomerização da Sp-CTx previamente submetida ao cross-linking químico com BS³. Este ensaio demonstrou que mesmo na menor concentração (1nM) utilizada de BS³ bandas proteicas de aproximadamente 150 e 280 kDa foram visualizadas e a banda correspondente a 71 kDa não foi mais observada.

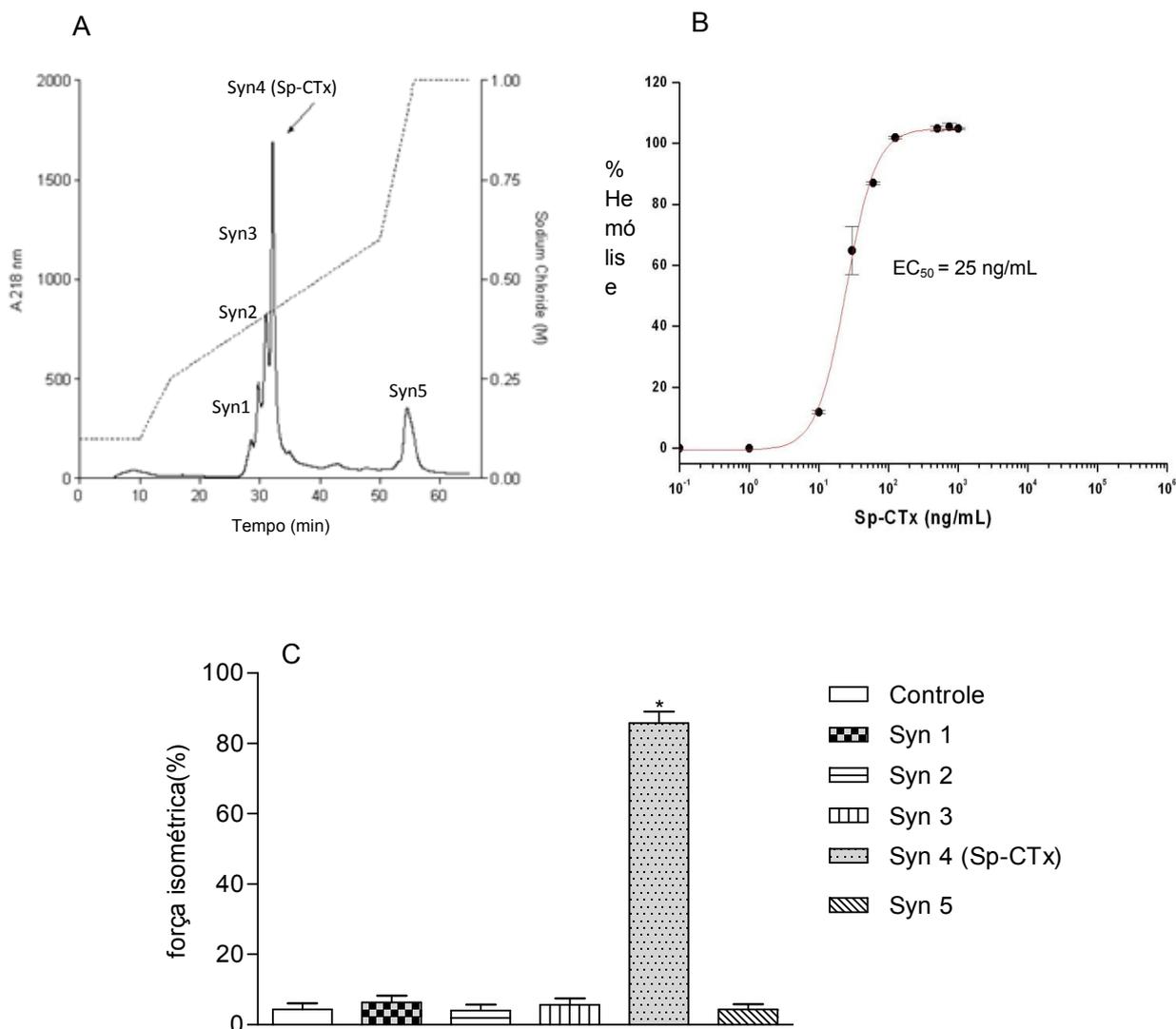


Figura 22 - (A) Perfil cromatográfico da terceira etapa do processo de purificação da toxina hemolítica Sp-CTx. A fração hemolítica eluída da cromatografia de interação hidrofóbica foi submetida (200 μ g) à cromatografia de troca aniônica (Synchronpak SAX-200). (B) Atividade hemolítica da fração Syn 4 (Sp-CTx). Resultados expressos em porcentagem de hemólise por comparação com o controle positivo (hemácias incubadas com água destilada). Os ensaios foram realizados em triplicata. (C) Efeitos das frações Syn1, 2, 3, 4 (Sp-CTx) e 5 sobre papilares isolados. O PBS foi utilizado como controle. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à resposta induzida pelo controle. N=5 em cada grupo.

Tabela 2 - Purificação da citolisina Sp-CTx do veneno do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*.

Etapa de purificação	Fração hemolítica	Recuperação proteica (µg)	EC ₅₀ (ng/mL)	Recuperação de atividade (EC ₅₀)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Veneno bruto	-	48750	592	82403	1.0	100
Precipitação salina	CF I	18700	282	66265	2.1	80
Butyl HP	CF II	1424	111	12861	5.3	15
Synchropak SAX-200	Sp-CTx	274	25	11064	24.0	13

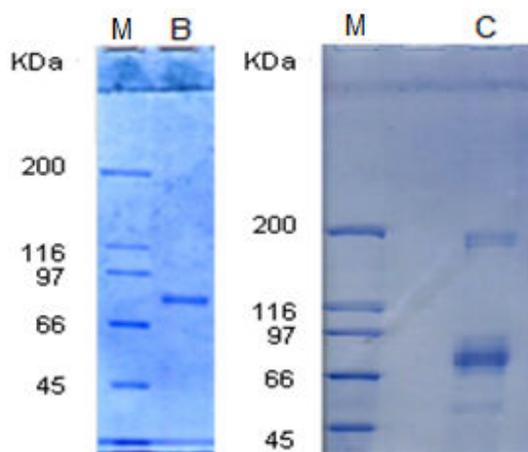


Figura 23 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da Sp-CTx em (B) condições redutoras e (C) não-redutoras. (M) Marcadores de massa molecular: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosfolipase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa) e ovoalbumina (45 kDa).

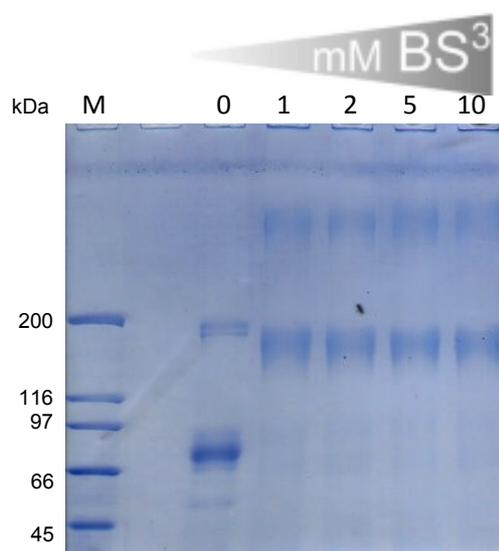


Figura 24 - Ensaio de *cross-link* com o BS³ em diferentes molaridades sugerindo a natureza oligomérica da Sp-CTX em solução. (M) Marcadores de massa molecular: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosfolipase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa) e ovoalbumina (45 kDa).

4.5.2. Determinação da sequência N-terminal da Sp-CTx

Apesar de quantidade considerável (250 pmol) de toxina ter sido submetida ao sequenciamento automático, nenhum sinal foi obtido. A resistência à degradação química de Edman sugere que o N-terminal da Sp-CTx é bloqueado.

4.5.3. Análise por espectrometria de massa

As bandas proteicas (71 e 150 kDa, SDS-PAGE em condições não redutoras, figura 23) foram analisadas por espectrometria de massa (Orbitrap-MS) após a digestão trípica. A análise resultou na identificação de trinta e seis fragmentos peptídicos cujas massas variaram entre 714 a 2091, sendo que as relações carga massa (m/z) variaram entre 322 e 1064.

Desses trinta e seis fragmentos, vinte e um foram encontrados em ambas as bandas proteicas (tabela 3 e 4), oito foram identificados somente na de 71 kDa (tabela 3) e sete apenas na banda de 150 kDa (tabela 4).

Vinte e nove peptídeos apresentaram identidade com toxinas citolíticas de outros peixes, incluindo os peixes-pedra *Synanceja verrucosa* e *Synanceja horrida*; e os peixes-leão *Pterois volitans* e *Pterois antennata* (tabelas 3 e 4).

Dentre os trinta e seis fragmentos, cinco são encontrados no complexo ativador do proteassoma do peixe *Dicentrarchus labrax*, um na beta-actina do peixe *Haplochromis burtoni* e um fragmento na proteína lisina bradicinina-like do peixe *Oncorhynchus mykiss*.

Tabela 3 – Fragmentos pépticos identificados na banda de 71 kDa da Sp-CTx

Fragmento	Massa	m/z	Toxinas que compartilham o mesmo fragmento #
K.FVSNQTELDRE	1207,58	604,8	NeoVTX(α) ¹ , SNTX(α) ²
N.AFFVFDSK.V	1074,50	538,26	NeoVTX(α)
Y.GANAFFVFDSK.V	1316,60	659,31	NeoVTX(α)
K.MEAVIKK.I	817,47	409,74	NeoVTX(α)
K.YLNNTK.K	751,38	376,70	NeoVTX (α), SNTX (α)
R.PFTLGMLYDAR.R	1282,63	642,32	SNTX (α)
W.IPPVETIQDR.R	1166,62	584,32	Patoxina (β) ³ , Pvtoxina (β) ³
A.DSSTPILR.K	887,47	444,74	Patoxina (β), Pvtoxina (β), SNTX (β)
S.MEAVIKK.I	817,47	409,74	Patoxina (β)
R.VTLQYK.A	750,42	376,22	Patoxina (α e β), Pvtoxina (α e β), SNTX (β)
W.IPPVETIQDR.R	1166,62	584,32	Patoxina (β), Pvtoxina (β)
R.PFTLGMLYDAR.N	1282,63	642,32	SNTX (β)
Q.MEAVIKK.I	817,47	409,74	SNTX (β)
R.FLVASIVNPK.Q	1086,64	544,33	Patoxina (α), Pvtoxina (α)
F.VSNQTELDRE	1060,51	531,26	NeoVTX (α), SNTX (α)
K.FVSNQTELDREVLAEDVK.H	2091,04	1046,54	NeoVTX (α)
K.YLNNTK.K	751,38	376,70	NeoVTX (α) SNTX (α)
K.SSLMDIEASLK.A	1192,60	597,31	SNTX (β), Patoxina (α e β),
M.ADSSTPILR.K	958,50	480,26	SNTX (β), Patoxina (β)
A.ALGRPFTLGMLYDAR.	1679,88	560,97	SNTX (β)
M.DIEASLK.A	774,41	388,21	SNTX (β), Patoxina (α e β)
P.ALGRPFTLGMLYDAR.R	1679,88	560,97	SNTX (α)

Os fragmentos em negrito foram encontrados também na banda 150 kDa.

¹Ueda *et al.*, 2006; ²Poh *et al.*, 1991; ³Kiriake e Shiomi, 2011. SNTX, stonustoxina (gij28201900; gij28201899); NeoVTX, neoverrucotoxina (gij212288545); Patoxina, *Pterois antennata* toxina (gij328671576); Pvtoxina, *P. volitans* toxina (gij328671580). # Os valores na terceira coluna entre parênteses (α , β , 1 ou 2) se referem à subunidade da respectiva toxina

Tabela 4 – Fragmentos preditos da banda de 150 kDa da toxina Sp-CTx

Fragmentos	Massa	m/z	Toxinas que compartilham o mesmo fragmento
K.FVSNQTELD.R.E	1207,58	604,80	NeoVTX (α) ¹ , SNTX (α) ²
N.AFFVFSDK.V	1074,50	538,26	NeoVTX (α)
Y.GANAFFVFSDK.V	1316,60	659,31	NeoVTX (α)
K.MEAVIKK.I	817,47	409,74	NeoVTX (α)
K.YLNNTK.K	751,38	376,70	NeoVTX (α), SNTX (α)
R.PFTLGMLYDAR.R	1282,63	642,32	SNTX (α)
W.IPPVETIQDR.R	1166,62	584,32	Patoxin (β) ³ , Pvtoxin (β) ³
A.DSSTPILR.K	887,47	444,74	Patoxin (β), Pvtoxin (β), SNTX (β)
S.MEAVIKK.I	817,47	409,74	Patoxin (β)
R.VTLQYK.A	750,42	376,22	Patoxin (α e β), Pvtoxin (α e β), SNTX (β)
W.IPPVETIQDR.R	1166,62	584,32	Patoxin (β), Pvtoxin (β)
R.PFTLGMLYDAR.N	1282,63	642,32	SNTX (β)
Q.MEAVIKK.I	817,47	409,74	SNTX (β)
R.FLVASIVNPK.Q	1086,64	544,33	Patoxin (α), Pvtoxin (α)
S.FLGGLVEVGSAK.Y	1232,67	617,34	NeoVTX (α), SNTX (α e β), Patoxin (β), Pvtoxin (α e β)
K.VWLVPLK.K	853,54	427,78	NeoVTX (α)
L.GGLVEVGSAK.Y	972,52	487,27	NeoVTX (α), SNTX (α e β), Patoxin (β), Pvtoxin (α e β)
R.NTLEAMR.E	833,40	417,71	Pvtoxin (α e β), Patoxin (β)
K.LFPLIEK.K	858,52	430,27	Pvtoxin (β), Patoxin (β)
Q.DIQGSMEAVIK.K	1189,60	595,81	Patoxin (β)
K.QLMTNLETK.H	1076,55	539,28	Pvtoxin (α e β), Patoxin (α)

Os fragmentos em negrito foram encontrados também na banda 71 kDa.

¹Ueda *et al.*, 2006; ²Poh *et al.*, 1991; ³Kiriake e Shiomi, 2011. SNTX, stonustoxina (gij28201900; gij28201899); NeoVTX, neoverrucotoxina (gij212288545); Patoxina, *Pterois antennata* toxina (gij328671576); Pvtoxina, *P. volitans* toxina (gij328671580). # Os valores na terceira coluna entre parênteses (α , β , 1 ou 2) se referem à subunidade da respectiva toxina

4.6. Estudo da atividade hemolítica

4.6.1. Atividade fosfolipásica A2.

Amostras do veneno bruto do peixe-escorpião *S. plumieri* e da toxina Sp-CTx foram incubadas com gema de ovo em placas de Petri a fim de se detectar a possível atividade fosfolipásica A2.

O veneno bruto, assim como a toxina, não apresentou atividade fosfolipásica para nenhuma das concentrações analisadas. A falta de atividade foi observada pela ausência da formação de halos no substrato ao redor da região onde as amostras foram aplicadas. O veneno crotálico foi utilizado como controle positivo (figura 25).

4.6.2. Ensaio de proteção osmótica

A figura 26-A mostra o curso temporal da atividade hemolítica da Sp-CTx (50 ng/mL, 2x EC₅₀) na presença e na ausência dos PEGs de diferentes tamanhos moleculares. Nota-se que o grau de proteção oferecido por estes osmoprotetores e o $t_{1/2}$ da hemólise variaram de acordo com o diâmetro molecular destes protetores. Quanto maior o diâmetro molecular do PEG empregado, maior o índice de proteção. O PEG 1000 não foi capaz de abolir ou reduzir a atividade hemolítica mesmo após 120 minutos (dados não mostrados). Como pode ser observado na figura, o PEG 1400 não inibiu o efeito hemolítico, mas retardou o início do fenômeno, aumentando de dois e meio para quatro minutos, aproximadamente, o tempo necessário para que 50% de hemólise ($t_{1/2}$) fosse observada.

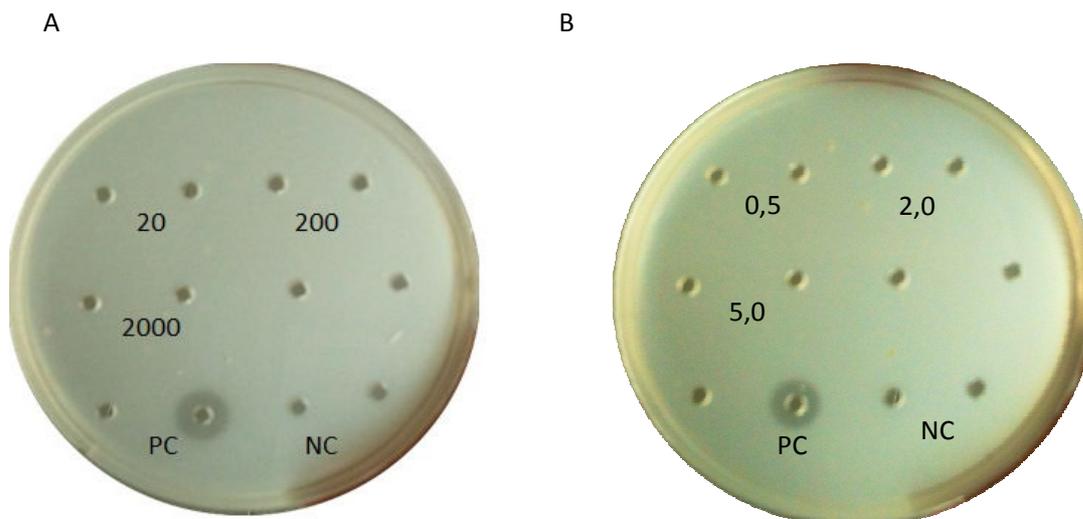


Figura 25 – Ensaio da atividade fosfolipásica A2. (A) Amostras do veneno bruto do peixe *S. plumieri* (20,200 e 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Amostras da Sp-CTx (0,5, 2 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). PC – controle positivo, veneno crotálico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). NC – controle negativo (PBS).

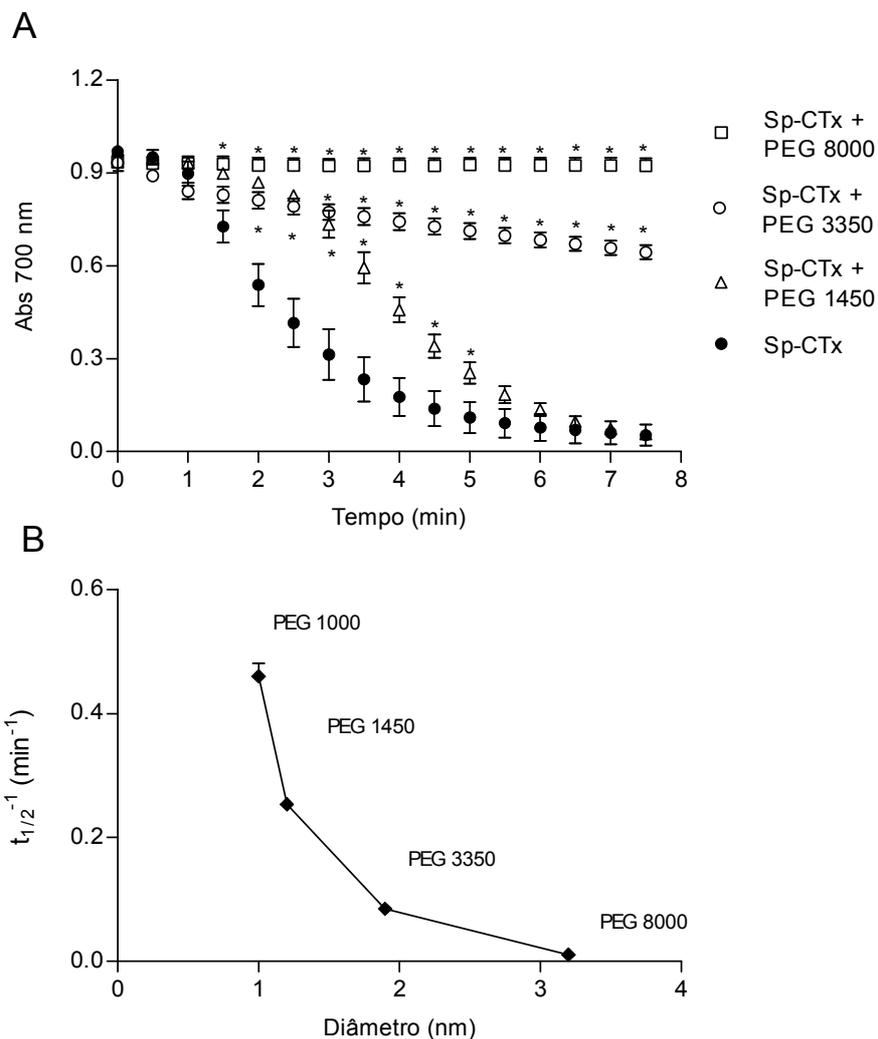


Figura 26 – Efeito de diferentes protetores osmóticos sobre a atividade hemolítica induzida pela Sp-CTx (50 ng/mL). (A) Curva temporal do efeito hemolítico na ausência ou presença de PEG (30 mM) de diferentes tamanhos moleculares. (B) Relação entre o efeito hemolítico na presença dos PEGs e o diâmetro molecular desses protetores osmóticos. Os diâmetros dos PEGs foram obtidos de Kuga, 1981. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Na presença no PEG 3350 foi possível observar atividade hemolítica, entretanto o $t_{1/2}$ foi aumentado cerca de quatro vezes e, mesmo após 120 minutos, a hemólise total não foi observada (figura 26-A). O único PEG testado capaz de inibir a atividade hemolítica foi o PEG 8000 (figura 26-A). A atividade hemolítica foi acompanhada por até 120 minutos após a incubação da toxina com os eritrócitos, entretanto, nenhuma mudança significativa na intensidade do efeito foi observada após oito minutos de experimento.

O diâmetro do poro foi estimado através do gráfico de Renkin, onde a permeabilidade relativa do PEG é plotada *versus* o seu tamanho molecular. Pôde-se estimar o tamanho do poro gerado pela Sp-CTx, que provavelmente não ultrapassa 3.2 nm (figura 26-B).

4.7. Efeitos da Sp-CTx sobre o sistema cardiovascular

4.7.1 Efeitos *in vivo*

O efeito cardiovascular agudo da Sp-CTx foi avaliado pela injeção *in bolus* (70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratos Wistar (figura 27). Esta dose induziu efeito bifásico sobre a pressão arterial sistólica e diastólica além de induzir alterações na frequência cardíaca.

Primeiramente, observou-se o aumento de aproximadamente 30 e 60% sobre a pressão sistólica e diastólica, respectivamente (figura 27-A e 27-B). Essa resposta foi observada de forma imediata, aproximadamente um minuto após a administração da toxina. Estas alterações foram transientes e os valores retornaram aos basais após 2 a 5 minutos.

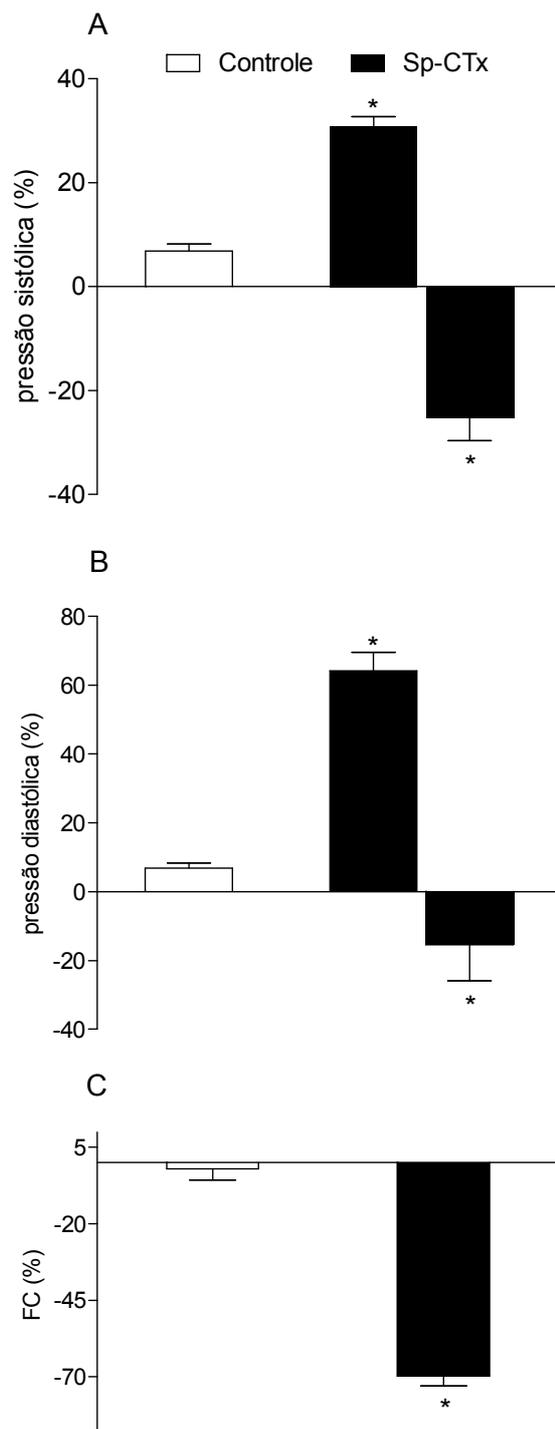


Figura 27 – Efeitos da injeção *in bolus* da Sp-CTx (70µg/ Kg) sobre a pressão sistólica (A), pressão diastólica (B) e frequência cardíaca (C) de ratos Wistar. Dados expressos em média ± EPM. *p<0, 05 comparado à administração do controle (PBS), N=5 em cada grupo.

A segunda fase da resposta foi composta pela redução de 30 e 20% da pressão arterial diastólica e sistólica, respectivamente (figura 27-A e 27-B). Concomitantemente, observou-se efeito bradicárdico, que consistiu em redução da frequência cardíaca de aproximadamente 70% de (figura 27-C). Posteriormente a este efeito, a maioria dos animais foi a óbito.

Os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca dos ratos anestesiados no início do protocolo experimental era de aproximadamente 100 mmHg, 50 mmHg e 300 bpm, respectivamente.

4.7.2 Ensaio *in vitro*: efeitos sobre corações isolados

Os efeitos cardíacos da Sp-CTx também foram avaliados em corações isolados de ratos Wistar. A Sp-CTx (10^{-9} a 5×10^{-5} M) induziu resposta inotrópica positiva e vasoconstritora dose-dependentes (figura 28). As respostas foram imediatas e transientes ocorrendo entre 30 a 60 s após a administração da toxina e com duração de aproximadamente 2 minutos. A dose de 5×10^{-5} M, a maior dose testada, induziu a parada cardíaca e o coração não se recuperou mesmo após a lavagem do sistema com solução nutritora sem a toxina.

A resposta inotrópica foi caracterizada por drástico aumento da pressão ventricular esquerda máxima, variando de $3 \pm 2\%$ a $97 \pm 6\%$ e da $+dP/dt$, variando de $3 \pm 0.4\%$ a $165 \pm 35\%$; para as doses de 10^{-9} a 5×10^{-5} M (figura 28-A e 28-B). A resposta vasoconstritora foi observada através do aumento da pressão de perfusão coronariana (de $4 \pm 0,1 \%$, a $47 \pm 2,5 \%$; Fig 28-C).

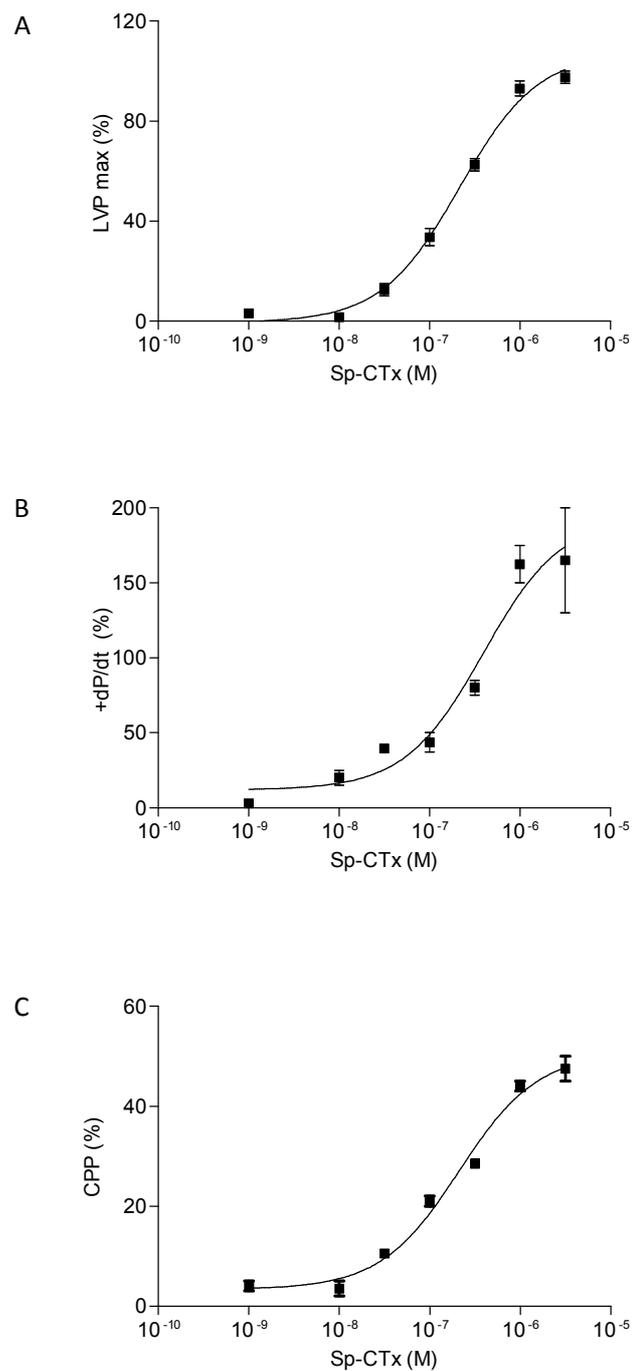


Figura 28 – Efeitos da Sp-CTX sobre corações de ratos isolados. Resposta induzida pela injeção *in bolus* da toxina em diferentes concentrações sobre a (A) pressão ventricular esquerda, (B) sobre sua primeira derivada temporal +dP/dt (C) pressão de perfusão coronariana. A administração do veículo (PBS) não induziu efeito sobre os parâmetros analisados. Dados expressos em média \pm EPM, N=5 em cada grupo.

4.7.3 Efeitos sobre músculos papilares isolados

4.7.3.1. Efeito sobre a força de contração isométrica

A figura 29 mostra o efeito da Sp-CTx (10^{-7} M) sobre a força de contração isométrica. A toxina aumentou este parâmetro em 85% aproximadamente 30 segundos após a administração da amostra. A resposta perdurou por 3 minutos (aproximadamente), e decorrido este tempo, os valores retornaram aos basais. O propranolol (10 μ M) e o tratamento prévio com tiramina (100 μ M) atenuaram em 36 e 48%, respectivamente, a resposta induzida pela toxina. A administração do veículo (PBS com glicerol 10%) não alterou de forma significativa os parâmetros analisados.

4.7.3.2. Efeitos sobre o tempo de ativação e tempo de relaxamento

Os parâmetros tempo de ativação (TA) e tempo de relaxamento (TR) foram analisados em músculos papilares isolados antes e após a administração do da Sp-CTx (10^{-7} M). A figura 30 (A e B) mostra que a toxina não induziu efeito sobre esses parâmetros. O propranolol ou o tratamento prévio com tiramina não alteram esta resposta. A administração do veículo (PBS com glicerol 10%) não alterou de forma significativa os parâmetros analisados.

4.7.3.3. Efeitos sobre a dF/dt

A figura 31 mostra os efeitos da Sp-CTx (10^{-7} M) sobre a primeira derivada positiva temporal (dF/dt) da força de contração isométrica desenvolvida por músculos papilares isolados. A toxina induziu uma resposta inotrópica positiva representada pelo aumento da dF/dt observada concomitantemente com o aumento da força de contração isométrica. Esta resposta ocorreu de 30 a 60 segundos após a administração da amostra e perdurou

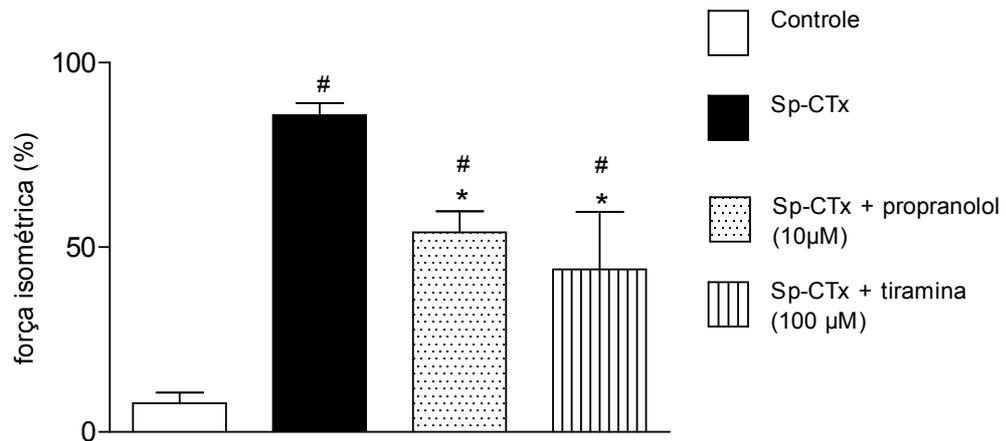


Figura 29 – Efeitos da Sp-CTx (10^{-7} M), na presença e ausência de propranolol ou tiramina, sobre a força isométrica desenvolvida por músculos papilares de ratos. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à administração da Sp-CTx apenas; # $p < 0,05$ comparado ao controle (PBS). N=5 em cada grupo.

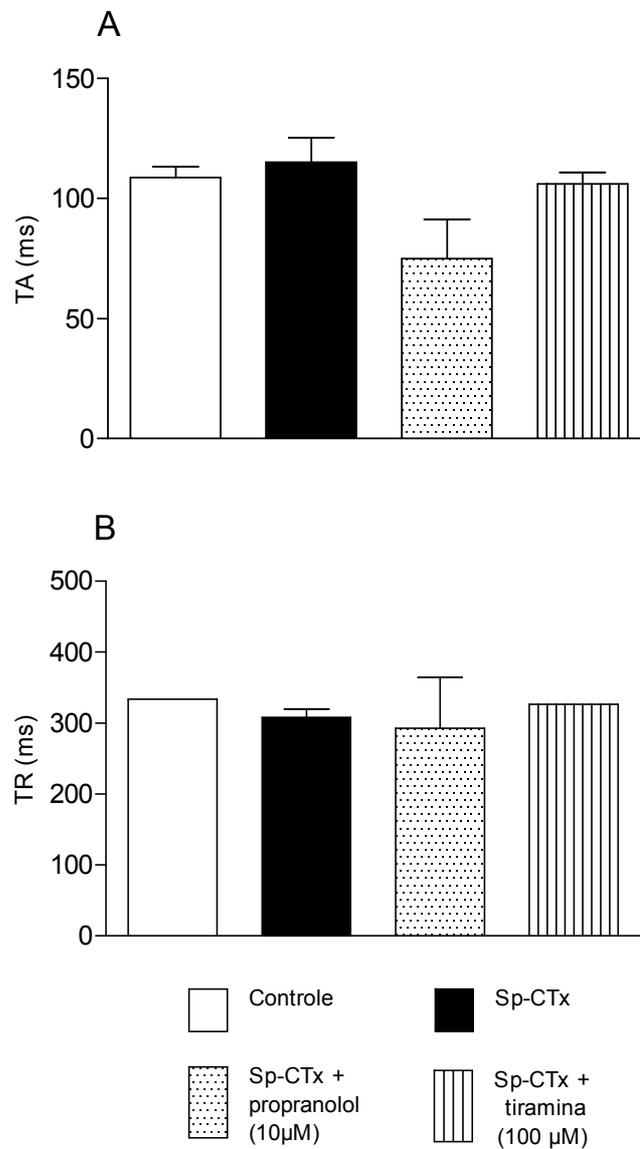


Figura 30 - Efeitos da toxina Sp-CTx (10^{-7} M), na presença e ausência de propranolol ou tiramina, sobre características temporais da contração de músculos papilares. (A) Tempo de ativação (TA) e (B) tempo de relaxamento (TR). Dados expressos em média \pm EPM. PBS + glicerol 10% foi utilizado como controle. N=5 em cada grupo.

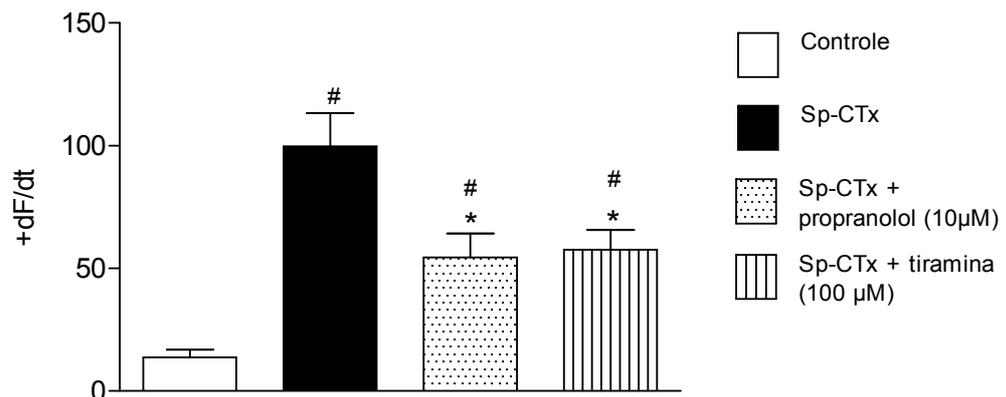


Figura 31 – Efeitos da Sp-CTx (10^{-7} M), na ausência e presença de propranolol ou tiramina, sobre a primeira derivada temporal da força isométrica desenvolvida por músculos papilares de ratos. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado à administração da Sp-CTx apenas; # $p < 0,05$ comparado ao controle (PBS+ glicerol 10%). N=5 em cada grupo.

por aproximadamente 4 minutos. O propranolol (10 μ M) e o tratamento prévio com tiramina (10^{-4} M) atenuaram esta resposta em aproximadamente 45%.

4.7.3.4. Efeitos sobre a potencia o relativa das contra es p s-pausas

A potencia o relativa p s-pausa (de 30 s) foi utilizada para a avalia o do efeito da Sp-CTx (10^{-7} M) sobre a atividade do retículo sarcoplasmático do músculo papilar. A contra o p s-pausa foi exacerbada em 201% aproximadamente na presença da toxina. Este valor foi significativamente superior (30%) ao valor da potencializa o observada para o grupo controle (141%) (figura 32).

4.7.3.5. Efeitos sobre a força desenvolvida após repouso de 10 minutos

O protocolo de repouso de 10 minutos foi empregado para avaliar se a Sp-CTx altera a permeabilidade da membrana plasmática ao  n cálcio.

A figura 33 mostra os resultados obtidos, ao quais evidenciam que a administra o da toxina (10^{-7} M) acentuou a potencia o da contra o p s-repouso em 9% aproximadamente. Esse valor foi significativamente maior (4%) do que a potencia o no grupo controle, a qual correspondeu a aproximadamente 5%.

4.7.4. Efeitos sobre cardiomiócitos ventriculares isolados

4.7.4.1. Efeitos sobre a corrente de cálcio tipo -L

O efeito da Sp-CTx (1 nM) sobre a corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) foi avaliado utilizando a técnica de patch-clamp. A figura 34-A apresenta o curso temporal do experimento evidenciando o aumento imediato da corrente em resposta   Sp-CTx. Esse aumento, de aproximadamente 20% (figura 34-B), foi completamente abolido pela

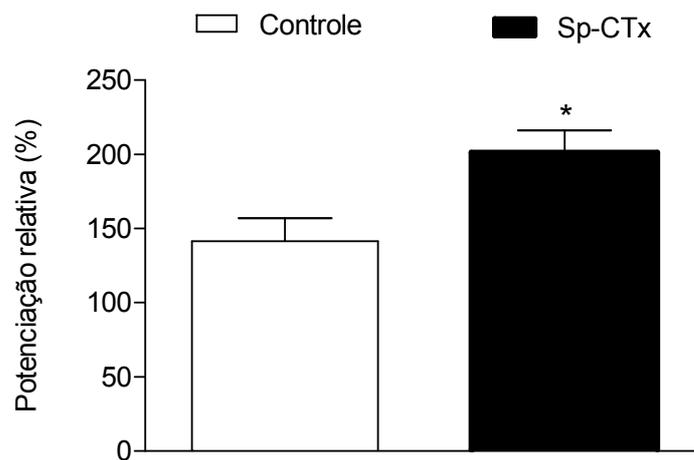


Figura 32 – Efeitos da Sp-CTx (10^{-7} M) sobre a potenciação relativa das contrações pós-pausa de 30 segundos obtidas de músculos paliareis isolados de ratos. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao controle. PBS + glicerol 10% foi utilizado como controle. N=5 em cada grupo.

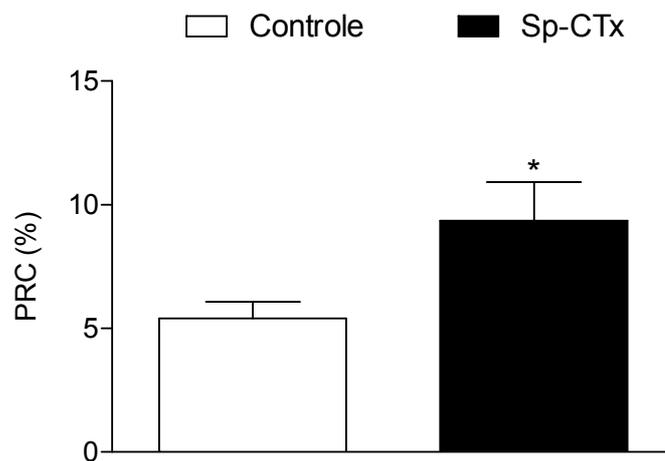


Figura 33 – Efeitos da Sp-CTx (10^{-7} M) sobre a potenciação das contrações após repouso de 10 minutos (PRC) na estimulação elétrica em músculos papilares isolados de ventrículos esquerdos de ratos. A pausa foi realizada na presença de cafeína e ausência de sais de cálcio na solução nutritora. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao controle. PBS+ glicerol 10% foi utilizado como controle. N= 5 em cada grupo.

a lavagem (“wash-out”) do sistema (figura 34-A). A administração do veículo utilizado (PBS adicionado de 10% v/v de glicerol) não alterou os parâmetros analisados

4.7.4.2. Efeitos sobre o transiente de cálcio

Os efeitos da Sp-CTx sobre o transiente de cálcio de cardiomiócitos foram analisados por microscopia confocal utilizando-se fluo-4. Na figura 35-A estão representadas as imagens do transiente de cálcio controles e tratados com Sp-CTx na menor dose testada (1pM). Na figura 34-B estão os traçados representativos do transiente de cálcio das respectivas imagens. A Sp-CTx acarretou diminuição da amplitude do transiente de cálcio, representado por F/F_0 , razão entre a fluorescência máxima (obtida no momento da contração celular, quando a liberação de cálcio é máxima) pela fluorescência mínima (fluorescência obtida durante o repouso da célula, o relaxamento), representado na figura 35-A. A figura 36-B mostra o decaimento do pico do transiente de cálcio em 50% (T50), ou seja, o tempo gasto para o decaimento de 50% da fluorescência do fluo-4. É possível observar que esse parâmetro foi maior em cardiomiócitos tratados com Sp-CTx.

A Sp-CTx na maior dose testada (5 nM) induziu dois efeitos nas células: presença de ondas de cálcio (figura 37-A) e incapacidade de responder aos estímulos elétricos, com grande número de sparks (figura 37-B).

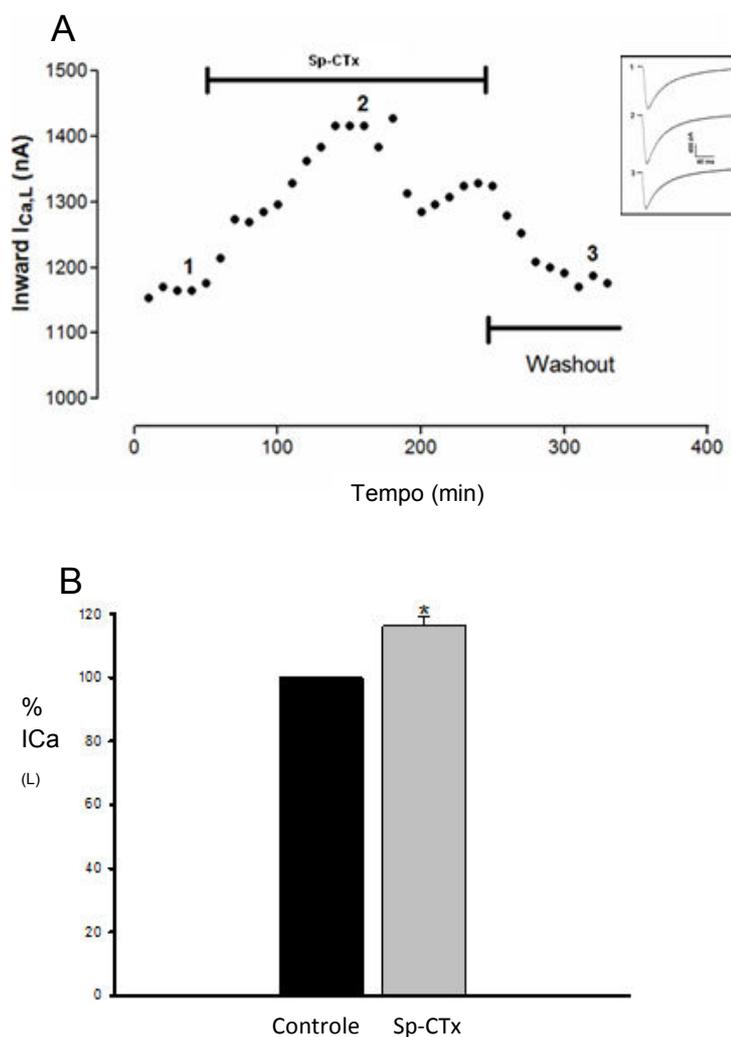


Figura 34 – (A) Curso temporal dos efeitos da Sp-CTX (1nM) sobre a corrente de cálcio ($I_{Ca,L}$) em miócitos cardíacos. As correntes foram eliciadas por pulsos despolarizantes de 500ms de -40 a 0 mV a cada 10s. A amplitude da corrente foi medida como a diferença entre o pico da $I_{Ca,L}$ e a corrente ao final do pulso, e plotada contra o tempo experimental. *Inset*: Registro típico nos tempos (1, 2 e 3) indicados no gráfico. (B) Gráfico representativo indicando o efeito da Sp-CTX sobre a corrente de cálcio ($I_{Ca,L}$). O controle foi normalizado como sendo 100% da corrente de influxo de cálcio. * $p < 0,05$ comparado ao controle (PBS adicionado de glicerol a uma concentração final de 10% v/v). N=4 em cada grupo.

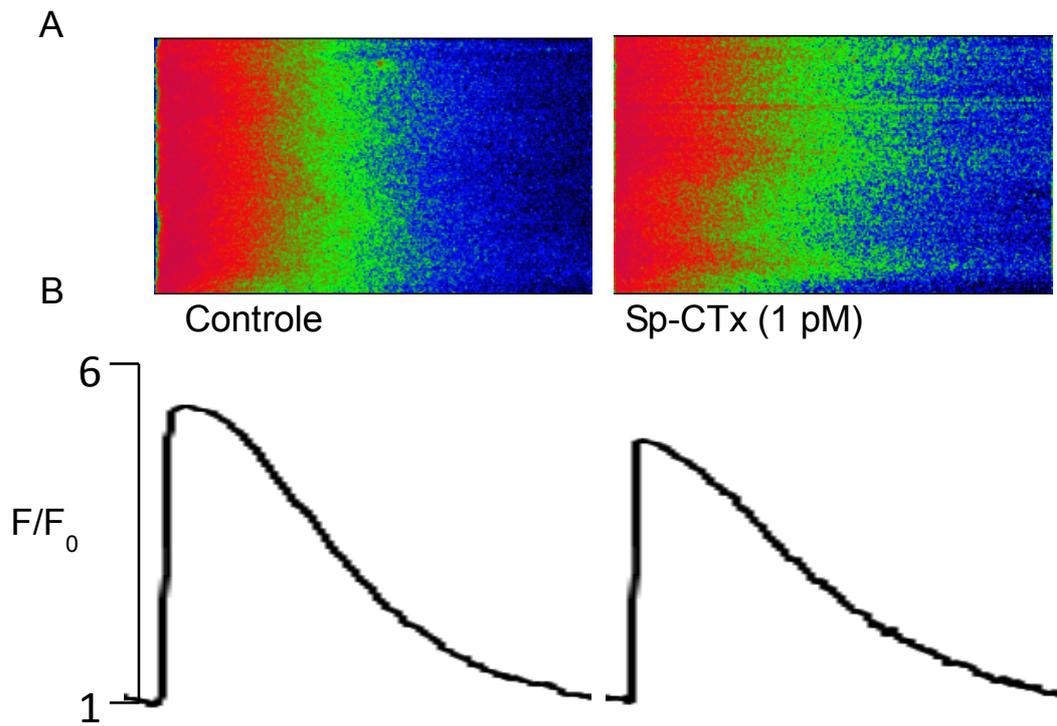


Figura 35 - Transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos na presença ou ausência da Sp-CTx (1pM). (A) Imagens representativas de cardiomiócitos controles ou tratados com Sp-CTx submetidos à estimulação elétrica (1Hz) obtidas através de microscopia confocal. (B) Traçado representativo do transiente de Ca^{2+} . PBS foi utilizado como controle.

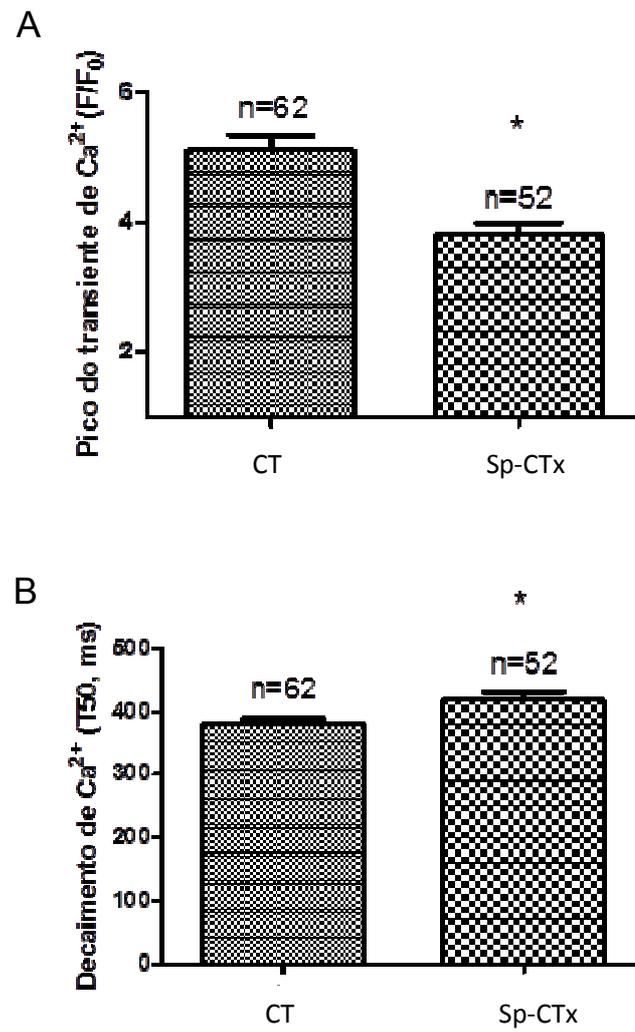
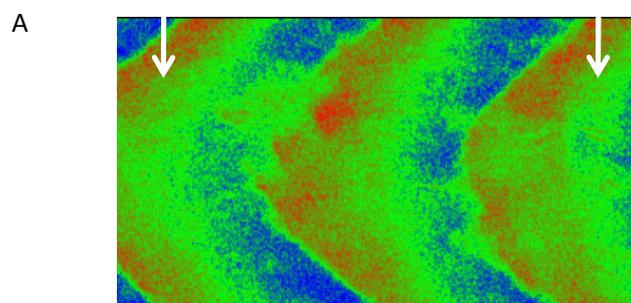


Figura 36 - (A) Amplitude do transiente de Ca^{2+} de cardiomiócitos controles (CT) e tratados com Sp-CTx (1 pM). (B) Cinética de decaimento do pico do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos controles (CT) e tratados com Sp-CTx (1 pM).



B

Figura 37 - Transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos. (A) Imagens representativas de cardiomiócitos tratados com Sp-CTX (5 nM) com comportamento arritmico ou (B) com ausência de resposta contrátil ao estímulo elétrico, mas apresentado uma alta frequência de *sparks* de Ca^{2+} . As setas brancas indicam o momento no qual foi aplicado o estímulo elétrico.

5. Discussão

Como já descrito, os venenos animais têm sido objeto de diversos estudos nas últimas décadas. Estes estudos podem favorecer o desenvolvimento de mecanismos de proteção das vítimas do envenenamento. Além disso, os componentes de venenos são utilizados como instrumentos de investigação de sistemas fisiológicos e/ou como protótipo para o desenvolvimento de novos agentes químicos / farmacológicos.

Diferente do que acontece nos envenenamentos por cobras, aranhas e escorpiões, apenas algumas espécies de peixes peçonhentos são capazes causar a morte em humanos. Entretanto, a peçonha destes animais produzem severos efeitos locais e/ou sistêmicas (Church e Hodgson, 2002a) que representam problemas de saúde pública e socioeconômicos, uma vez que podem ser provisoriamente incapacitantes, mantendo a vítima afastada do trabalho por dias ou semanas (Haddad Jr., 2003).

O presente trabalho apresenta resultados inéditos sobre a peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, descrevendo o isolamento, a caracterização bioquímica e farmacológica da Sp-CTx (*Scorpaena plumieri* Citotoxic Toxin), uma toxina hemolítica/cardiotóxica dessa peçonha.

5.1. Neutralização dos efeitos do SpV *in vivo* e reatividade cruzada entre o SpV e o SFAV.

A atividade cardiovascular é certamente o efeito farmacológico dominante e mais potente induzido pelas peçonhas de peixes e historicamente tem sido o foco da maioria das pesquisas. Carrijo e colaboradores (2005) e mais recentemente, Gomes e colaboradores (2010) demonstraram que a peçonha de *S plumieri* induz profundas alterações sobre o sistema cardiovascular *in vivo*. Nesses trabalhos foi demonstrado que essa peçonha (300 µg/kg) induz resposta hipertensora e bradicárdica. O protocolo de

tratamento das vítimas do peixe-escorpião é sintomático e alguns dos sintomas são aliviados imergindo-se o membro afetado em água morna e administrando-se analgésicos. Esses procedimentos resultam na redução moderada dos sintomas do envenenamento (Haddad *et al.*, 2003; Haddad, 2000). O único soro disponível comercialmente para tratamento de envenenamentos por peixes é o SFAV, contra a peçonha do peixe-pedra *Synanceja trachynis*.

Os sintomas e as atividades farmacológicas induzidos pelo veneno do *S. plumieri* são qualitativamente similares aos induzidos pelo peixe-pedra *Synanceja*. Essa similaridade nos levou a investigar se os efeitos cardiovasculares induzidos pelo SpV seriam neutralizados pelo SFAV. Utilizando a dose descrita por Gomes e colaboradores (2010), a pré-incubação SpV com o SFAV, na razão veneno/antiveneno de 1:1 mg/U, neutralizou o efeito cardiovascular induzido pelo SpV. A pré-incubação dessa peçonha com o soro antibotrópico (dados não mostrados) não foi capaz de neutralizar este efeito, o que sugere a especificidade de neutralização do SpV pelo SFAV.

Essa proteção indica que o/os composto(s) envolvidos nos efeitos cardiovasculares são principalmente proteico(s). Em 1971, Carlson e colaboradores sugeriram que os efeitos cardiovasculares do *Scorpaena guttata* são resultantes da liberação de neurotransmissores endógenos induzidos por compostos proteicos da peçonha. Entretanto, a possibilidade de neurotransmissores, ou de mediadores químicos de baixo peso molecular, estarem presentes na peçonha de *S. plumieri* não pode ser excluída. A presença destes compostos já foi descrita nas peçonhas dos peixes *S. verrucosa* e *S. horrida* (Garnier *et al.*, 1996).

A reatividade imunológica do SpV com o SFAV observada *in vivo* foi confirmada através de ELISA e *immunoblotting*. Apesar de várias proteínas serem visualizadas no perfil eletroforético 2-D da peçonha do *S. plumieri*, apenas uma região correspondente a migração de 98 kDa e ponto isoelétrico 6,0 a 7,0 foi reconhecido pelo SFAV após o ensaio

de *imunoblotting*. Interessantemente, Andrich e colaboradores (2010) demonstraram que SFAV é capaz de reagir com a Sp-CTX e neutralizar seu efeito hemolítico. Esses autores também descreveram a natureza glicoproteica desta toxina, o que pode justificar a forma arrastada horizontalmente do spot proteico reconhecido pelo SFAV. A massa molecular da Sp-CTX descrita é condizente com a migração do spot proteico. Considerando estes resultados juntamente com a neutralização dos efeitos cardiovasculares pelo SFAV, pode-se sugerir que este spot proteico corresponda à Sp-CTX.

Adicionalmente, a análise por ELISA revelou que o SFAV reconhece antígenos do SpV, indicando que os epítomos detectados pelo SFAV são compartilhados por proteína(s) presente(s) na peçonha do *S.plumieri* e do *Synanceja trachynis*.

Tanto a massa molecular como o ponto isoelétrico da proteína reconhecida pelo SFAV são similares aos valores descritos para a stonustoxina (SNTX, subunidade α , 71 kDa; subunidade β , 79 kDa; pI 6,9) e para a traquinilisina (TLY; subunidade α , 76 kDa; subunidade β , 83 kDa; pI 5,7), duas toxinas citolíticas purificadas dos venenos dos peixes *Synanceja horrida* and *S. trachynis* respectivamente (Colasante *et al.*, 1996; Kreger, 1991; Poh *et al.*, 1991). Esses fatos estão de acordo com a hipótese de que peixes venenosos pertencentes a diferentes gêneros, e que habitam diferentes regiões, podem apresentar toxinas com propriedades estruturais e antigênicas similares (Church and Hodgson, 2002b).

Outros estudos demonstram que o SFAV também é capaz de neutralizar parcialmente os efeitos tóxicos, hemolíticos ou cardiovasculares evocados pelas peçonhas do peixe-soldado *Gymnapistes marmoratus* (Church e Hodgson, 2001), do peixe-escorpião *Inimicus japonicus* e dos peixes-leão dos gêneros *Pterois* e *Dendrochirus* (Shiomi *et al.*, 1989, Church Hodgson, 2002b).

Essa semelhança é condizente com o fato de que venenos píceos evoluíram com o mesmo propósito de defesa e possuem toxinas similares e induzem efeitos

farmacológicos semelhantes (Saunders, 1960; Russell, 1965; Kreger, 1991; Church and Hodgson, 2002b; Andrich *et al.*, 2010).

5.2. Caracterização da atividade do SpV sobre músculos papilares

Para uma melhor caracterização da atividade cardiovascular do SpV, foram utilizados ensaios com músculos papilares isolados. Neste ensaio se exclui a interferência de outros sistemas fisiológicos sobre esta resposta. Observou-se que em músculos papilares isolados, o SpV induz efeito inotrópico positivo de forma concentração-dependente, caracterizado pelo aumento da força de contração e da dF/dt , e não alterou os tempos de ativação e relaxamento. Além disso, na a maior concentração testada (25 $\mu\text{g/mL}$), o SpV induziu resposta bifásica constituída de aumento da força e dF/dt seguido de redução.

Respostas similares sobre preparações musculares foram documentadas em estudos com venenos de outros peixes. A maioria dos estudos relata que os venenos de peixes induzem efeito bifásico composto por uma resposta inotrópica e cronotrópica negativa seguida de resposta inotrópica e cronotrópica positiva em diferentes preparações cardíacas como átrio e coração isolados (revisado por Church e Hogson, 2002a).

O veneno do peixe-soldado *Gymnapistes marmoratus* e do peixe-escorpião *S. guttata* produz resposta bifásica em átrio isolado de rato. A resposta inclui uma redução inicial da força de contração e da frequência cardíaca seguida de um marcante efeito cronotrópico e inotrópico positivo (Calrson *et al.*, 1971; Hopkins *et al.*, 1998). A primeira fase da resposta envolve a participação dos receptores muscarínicos e a segunda a dos receptores adrenérgicos. O veneno do “spotted butterflyfish” *Scatophagus argus* em coração isolado de sapo igualmente resulta um aumento da amplitude de contração e da frequência cardíaca (Muhuri *et al.*, 2004).

Estudos com o veneno de duas espécies de peixe-gato (*Plotosus canius* e *Heteropneustes fossilis*) revelam resposta inotrópica positiva. Pequenas doses do veneno desses peixes aumentam a força de contração de coração de coelho e sapo, enquanto que doses maiores levam à parada cardíaca (Datta *et al.*, 1982; Auddy *et al.*, 1994).

O veneno bruto do peixe-pedra *S. trachynis* induz efeitos inotrópico e cronotrópico positivo sobre átrios isolados de ratos, os quais são reduzidos pelo propranolol. O veneno do peixe-pedra *S. verrucosa* também induz aumento da frequência e da força de contração em átrio isolado de rato e em fibras atriais isoladas de rã, porém, esse efeito é observado após efeito inotrópico negativo (Church e Hodgson, 2000; 2001; Hopkins *et al.*, 1994; 1996; Sauviat *et al.*, 1995).

O veneno bruto do peixe-leão (*Pteros volitans*) induz efeito inotrópico bifásico sobre átrio isolado de ratos, composto por uma resposta negativa transitória seguida de uma resposta positiva e sustentada (Church e Hodgson, 2002b). Esses efeitos inotrópicos positivos são inibidos pelo propranolol. (Church e Hodgson, 2002b; Hopkins e Hodgson, 1998).

Os efeitos inotrópicos positivos induzidos por venenos písceos geralmente envolvem ações direta ou indireta dos adrenoreceptores. A resposta negativa parece envolver a atividade de receptores muscarínicos, devido à presença de compostos colinomiméticos ou devido à liberação de acetilcolina endógena. Weisel-Eicher e Libersat (2004), em uma revisão, descreveram que venenos das mais variadas espécies de animais evoluíram de forma a manipular os sistemas monoaminérgicos.

Uma vez que o sistema adrenérgico está relacionado com diversos aspectos das funções cardiovasculares e é considerado um dos principais reguladores das funções cardíacas (Brodde e Michel, 1999), o envolvimento dos receptores adrenérgicos no efeito gerado pelo SpV nos músculos papilares foi investigado. A presença de propranolol na solução de perfusão atenuou de forma significativa o efeito inotrópico positivo induzido por

esse veneno. Interessantemente, a concentração de 12,5 µg/mL de SpV induziu, além do efeito positivo, um efeito inotrópico negativo, que foi observado apenas na presença desse beta-bloqueador. Provavelmente, a redução do efeito inotrópico positivo pelo propranolol possibilitou a observação do efeito negativo.

Os nossos resultados sugerem que os receptores β -adrenérgicos estão, pelo menos parcialmente, envolvidos na atividade da peçonha sobre músculos papilares. Duas hipóteses foram propostas, o veneno poderia conter: (i) amins biogênicas, ou outros compostos, que ativariam os receptores adrenérgicos; ou (ii) compostos que atuariam induzindo a liberação de norepinefrina das terminações nervosas simpáticas musculares, vale ainda ressaltar que uma possibilidade não excluiria a outra.

Alguns trabalhos demonstram que venenos de outros peixes são capazes de induzir a liberação de neurotransmissores em preparações cardíacas. Os venenos dos peixes *S. guttata* e *G. marmoratus* induzem liberação de acetilcolina e catecolaminas em átrios isolados de ratos, que culminam em resposta inotrópica negativa seguida de positiva (Carlson *et al.*, 1971; Hopkins e Hodgson, 1998).

Por outro lado, o efeito inotrópico positivo induzido pelo veneno do *S. trachynis*, não é alterado pela depleção dos estoques de catecolaminas, demonstrando que esta peçonha não atua sobre os estoques endógenos desses neurotransmissores (Hopkins *et al.*, 1996). Esses autores relatam que o efeito observado provavelmente é consequência da presença de neurotransmissores no veneno. Norepinefrina e dopamina já foram identificadas e quantificadas através de cromatografia de alta resolução e espectrometria de massa nas peçonhas do *S. horrida* e *S. verrucosa*, e são consideradas responsáveis por parte do efeito tóxico destes venenos (Church and Hodgson, 2000, Church e Hodgson, 2002b, Garnier *et al.*, 1996; Sauviat, 1995).

Com intuito de verificar se os efeitos cardíacos produzidos pelo SpV envolveria a liberação de neurotransmissores, o estoque noradrenérgicos dos músculos papilares foi

depletado. Para isso, antes da administração do SpV, os músculos papilares foram expostos à solução de tiramina até que o efeito inotrópico positivo induzido por esta substância cessasse. Este tratamento reduziu de forma significativa o efeito inotrópico induzido pelo SpV, sugerindo que esta resposta é, pelo menos parcialmente, consequência da liberação de noradrenalina endógena. O efeito inotrópico negativo, visualizado apenas quando as concentrações de 12,5 ou 25 µg/mL do SpV foram testadas, também pode ser resultado da liberação de neurotransmissor, mas neste caso, trata-se, provavelmente, da acetilcolina.

A eficácia do soro contra o peixe-escorpião em neutralizar os efeitos cardiovasculares induzidos *in vivo* pelo veneno de *S. plumieri*, demonstra que estes efeitos são eliciados por proteínas e não por aminas biogênicas. Como já descrito em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, uma toxina proteica, referida de *Scorpaena plumieri* Cytolytic Toxin (Sp-CTx), responsável pelo efeito hemolítico e vascular desse veneno foi purificada (Andrich *et al.*, 2010). No presente trabalho, o processo de purificação da toxina foi aperfeiçoado objetivando-se obtê-la em quantidade suficiente para possibilitar sua caracterização bioquímica e estudos de seus efeitos farmacológicos (hemolítico e cardíaco).

5.3. Otimização do processo de purificação da Sp-CTx e suas características físico-químicas

Andrich e colaboradores (2010) purificaram a Sp-CTx, a toxina hemolítica e cardiotoxica do veneno de *S. plumieri*, através de quatro etapas cromatográficas: duas cromatografias de filtração em gel e duas cromatografias de troca aniônica. No presente trabalho, um novo processo de purificação, constituído de apenas três etapas, foi desenvolvido para a obtenção dessa toxina.

No método anterior, foi empregada uma filtração convencional em gel (coluna Sephacryl) como o primeiro passo da purificação e são necessárias 48 horas para que este procedimento seja realizado, o que reduz a recuperação da atividade do material de interesse. No novo processo desenvolvido, o primeiro passo da purificação consistiu em precipitação salina e a recuperação da atividade hemolítica (utilizada para o monitoramento da purificação) através desta foi cerca de duas vezes maior do que a obtida por filtração em gel.

Após a precipitação salina, empregou-se cromatografia de interação hidrofóbica e por fim, cromatografia de troca aniônica. A homogeneidade do material obtido foi sugerida por visualização de uma única banda no gel de SDS-PAGE, em condições redutoras.

Através desse novo processo, a Sp-CTx é obtida em apenas 12 horas (aproximadamente), enquanto que no método anteriormente descrito, a toxina era obtida em torno de sete dias. Considerando a extrema instabilidade da Sp-CTx (Andrich *et al.*, 2010), a redução do tempo para sua obtenção foi crucial para o sucesso do novo método. A labilidade da toxina pode ser associada à presença de enzimas proteolíticas na peçonha, que podem hidrolisar outras proteínas bioativas (Carrijo *et al.*, 2005). O menor intervalo de tempo entre a extração do veneno até a aquisição da Sp-CTx pode minimizar a proteólise de proteínas bioativa presentes no SpV descritas por Carrijo e colaboradores (2005).

Além de ser mais prático e rápido, o método atual apresenta rendimento treze vezes maior que o desenvolvido por Andrich e colaboradores (2010). Entretanto, este valor ainda é inferior aos rendimentos obtidos na purificação de outras citolíticas de venenos píceos (Poh *et al.*, 199). Alguns aspectos podem estar relacionados com este fato, como por exemplo, a anatomia do aparato peçonhento dos peixes.

As glândulas de peçonha dos peixes *Synanceja sp* são salientes e possuem ductos secretores evidentes tornando mais fácil a extração do veneno e possibilitando a

obtenção de maior quantidade e melhor qualidade do veneno. Todavia, as glândulas de veneno do *S. plumieri* são menos desenvolvidas e difíceis de serem visualizadas, o que impossibilita o acesso à peçonha por uma simples compressão ou pulsão, como no caso do peixe-pedra (Russell, 1965; Gopalakrishnakone e Gwee, 1993; Goudey-Perriere e Perriere, 1998, Smith e Wheeler, 2006).

Estes aspectos morfológicos nos levaram a escolher o método “batch” para extração da peçonha. Entretanto, este processo aumenta o número de substâncias contaminantes, uma vez que praticamente todo o aparato peçonhento (tecido secretor, tecidos conectivos, bainha tegumentária e secreção mucosa) é homogeneizado em solução. Dessa forma, mais etapas de purificação são necessárias demandando mais tempo para a obtenção da toxina, o que aumenta a probabilidade de perda de atividade, já que se trata de uma molécula instável (Andrich *et al.*, 2010). Contudo, quantidades maiores da Sp-CTx em sua forma nativa foram obtidas, o que nos possibilitou caracterizá-la bioquimicamente e farmacologicamente.

5.4. Caracterização bioquímica da Sp-CTx

Em condições redutoras, a Sp-CTx migrou como uma única banda de aproximadamente 71 kDa. Entretanto, em condições não-redutoras uma banda adicional de aproximadamente 150 kDa foi visualizada.

Em 2010, Andrich e colaboradores, levantaram a hipótese de que a Sp-CTx seria uma proteína dimérica constituída de subunidades com massas moleculares similares. Estas subunidades estariam unidas por interação fracas não-covalente, as quais são desfeitas sob as condições desnaturantes da técnica de SDS-PAGE. No presente trabalho, essa hipótese foi confirmada por ensaios de “cross-linking” químico. Estes ensaios demonstraram que a Sp-CTx se associa em dímeros, tetrâmeros ou em agregados maiores, o que explica a presença da banda de 150 kDa (aproximadamente)

no SDS-PAGE em condições não-redutoras. A banda proteica de 71 kDa corresponderia ao monômero e a de 150 kDa à forma dimérica da toxina.

Estruturas diméricas e tetramérica já foram descritas para toxinas citolíticas de outros peixes. A STNX (148 kDa), isolada da peçonha do *S. horrida*, é constituída de duas subunidades, α e β , de 71 e 79 kDa, respectivamente (Poh *et al.*, 1991). A TLY (158 kDa), isolada da peçonha do *S. trachynis*, é composta pelas subunidades α (76 kDa) e β (83 kDa), assim como a neoVTX (166 kDa, isolada do *S. verrucosa*), a qual possui uma subunidade α de 75 kDa e uma β de 80 kDa (Ueda *et al.*, 2006). Já a VTX, isolada da peçonha do *S. verrucosa* é tetramérica formada por duas subunidades α (83 kDa) e duas subunidades β (78 kDa). Duas outras toxinas, a pvtoxin e a patoxin, presentes, respectivamente, na peçonha dos peixes-leão *Pterois volitans* e *P. antennata*, também apresentam duas subunidades, α e β , constituídas de 699 e 698 resíduos de aminoácidos respectivamente.

As análises por Orbitrap-MS também corroboram com a hipótese de que as duas bandas visualizadas por SDS-PAGE, em condições não-redutoras, são relativas à Sp-CTx. Quatorze fragmentos trípticos foram identificados tanto na banda de 71 kDa quanto na 150 kDa. Somente sete fragmentos que foram identificados na banda de 71 kDa não foram preditos na banda de 150 kDa, e apenas oito preditos na banda de maior massa não foram preditos na de menor massa.

Um total de trinta e nove fragmentos trípticos da Sp-CTx foram preditos por Orbitrap-MS, sendo que destes, vinte e nove apresentam identidade com outras citolisinas de peixes, como a SNTX, NeoVTX, Pvtoxin e/ou Patoxin, cujas estruturas primárias foram deduzidas através do sequenciamento do cDNA (Ghadessy *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 2006; Kiriake and Shiomi K, 2011). Estas toxinas apresentam alto grau de homologia entre si. O número de peptídeos da Sp-CTx compartilhados com essas toxinas sugerem a similaridade entre suas estruturas (figura 38).

A similaridade entre essas toxinas pode estar correlacionada com questões evolucionárias já que uma relação filogenética próxima entre os peixes-pedra, leão e escorpião foi estabelecida por Smith e Wheeler (2006). Esse fato está de acordo com a similaridade entre os efeitos farmacológicos induzidos por essas toxinas.

5.5. O mecanismo de ação da Sp-CTx sobre eritrócitos

A atividade hemolítica da Sp-CTx foi descrita por Andrich e colaboradores (2010). Entretanto, o mecanismo de ação envolvido nesse efeito foi evidenciado pela primeira vez no presente trabalho.

A Sp-CTx induziu um potente efeito hemolítico sobre eritrócitos de coelho comparável ao induzido pelas citolisinas SNTX (Khoo *et al.*, 1995), neoVTX (Ueda *et al.*, 2006), patoxina e pvtoxina (Kiriake and Shiomi, 2011).

Diferente de alguns animais terrestres, cujas peçonhas induzem efeito hemolítico através da atividade fosfolipásica A2, não existem relatos na literatura que demonstrem a presença desta atividade enzimática em venenos de peixes (revisado por Church e Hodgson, 2002). Os resultados da avaliação da atividade fosfolipásica A2 do veneno bruto e da Sp-CTx, realizadas neste trabalho, demonstraram que estes são destituídos desta atividade, o que está de acordo com o descrito na literatura para peçonhas de peixes.

A ausência da atividade fosfolipásica A2 sugere que a capacidade de induzir hemólise da peçonha e da Sp-CTx envolva outro mecanismo para a destruição da membrana celular. Estudos demonstram que a hemólise induzida por venenos de peixes é devida à formação de poros na membrana plasmática. Chen e colaboradores (1997) demonstraram que este efeito induzido pela SNTX é completamente prevenido por protetores osmóticos.

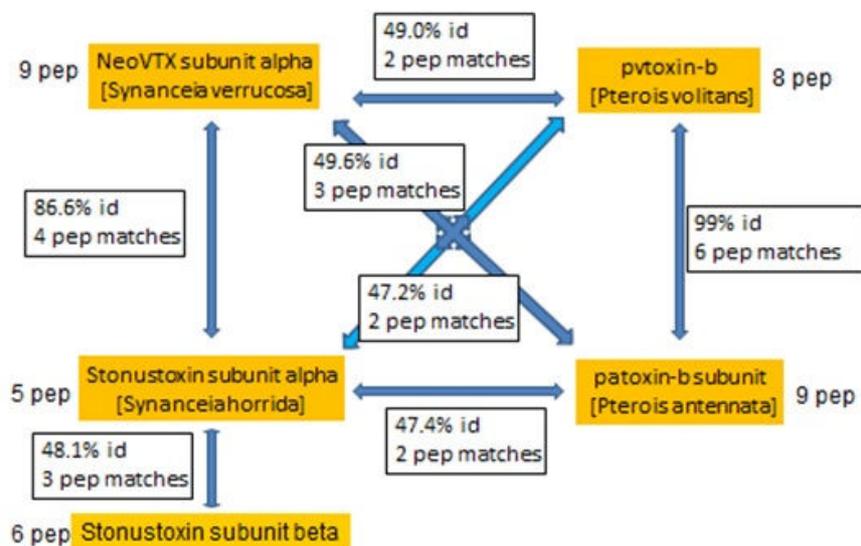


Figura 38 – Porcentagem de identidade (id) entre as subunidades (em amarelo) de toxinas de peixes. Junto com os valores de porcentagem estão indicados os números de peptídeos preditos (pep “matches”) da Sp-CTx que são comuns entre as subunidades. Ao lado destas, está indicado o número de fragmentos peptídico (pep) preditos na Sp-CTx que são compartilhados pela estrutura em amarelo.

Esses autores sugeriram que essa toxina forma poro na membrana celular através do modelo *carpet-like*. Nesse modelo, a formação do poro ocorre pela interação de resíduos catiônicos dos monômeros peptídicos da toxina por forças eletrostáticas aos lipídios aniônicos da membrana. (Shai, 1995; Oren, e Shai, 1996).

A similaridade, tanto estrutural quanto farmacológica, entre a Sp-CTx e a STNX, nos levou a investigar a possível formação de poros na membrana de eritrócitos pela citolisina do *S. plumieri*. Para testar esta possibilidade, PEGs (polietilenoglicol) de diferentes tamanhos foram empregados no ensaio hemolítico. Esta abordagem é baseada na premissa de que a lise celular por choque coloidosmótico pode ser prevenida pela presença de osmoprotetores de tamanhos apropriados. O osmoprotetor, por não penetrar na célula devido ao seu tamanho, é capaz de contrabalancear a força osmótica gerada pelas moléculas impermeantes do meio intracelular, como a hemoglobina, e prevenir a lise celular (Menestrina, *et al.*, 1994). A validade desta simples metodologia foi comprovada em diversos estudos, como os trabalhos com a citotoxina do *Pseudomonas aeruginosa* (Weiner *et al.*, 1985), α -toxina e a equinatoxin II do *Staphylococcus aureus* (Belmonte, *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1993).

Nos ensaios hemolíticos na presença de osmoprotetores (PEG) de diferente tamanhos, foi demonstrado que a Sp-CTx é uma toxina formadora de poros na membrana plasmática. A proteção celular contra lise foi proporcional aos raios hidrodinâmicos dos osmoprotetores utilizados. Quanto maior o diâmetro molecular do PEG empregado, maior foi o índice de proteção, o PEG 8000 inibiu a atividade hemolítica da toxina.

Adicionalmente, foi observado que o grau de proteção conferida pelos osmoprotetores reduziu com o tempo. Partindo do pressuposto que a Sp-CTx possui a capacidade de formar agregados (resultado demonstrado no ensaio de “cross-linking” químico), pode-se sugerir que os poros formados aumentam de tamanho

proporcionalmente ao números de agregados, que por sua vez aumenta como o decurso do tempo de exposição do eritrócito à toxina.

Usando o plot de Renkin o tamanho do poro foi estimado como sendo $\leq 3,2$ nm. Valores similares foram descritos para STNX (3,2 nm) e para hemolisina da *Escherichia coli* (3,0 nm) (Chen *et al.*, 1997; Renkin, 1954). Entretanto, poros com diâmetros menores foram descritos para a cartoxina (da água-viva *Carybdea marsupialis*, 0.84 - 1.08 nm), pela citotoxina do *P. aeruginosa* (2.4 nm) ou pela equitoxina II (2.2 nm) (Belmonte, *et al.*, 1993; Ginsburg e Stein, 1987; Bhakdi, *et al.*, 1986; Rottini *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1993).

A capacidade de formação do poro está relacionada não apenas com a atividade hemolítica, mas também com outros efeitos farmacológicos induzidos por citolisinas. Por exemplo, a melitina, um peptídeo isolado do veneno de abelha, induz vasodilatação dependente do endotélio. Este peptídeo forma poros na membrana celular através dos quais ocorre o influxo de Ca^{2+} . Esse influxo, por sua vez, culmina na liberação de óxido nítrico e resulta no vasorelaxamento dependente do endotélio (Rapoport *et al.*, 1989).

Como a melitina, as toxinas isoladas de venenos de peixes também apresentam outros efeitos farmacológicos além dos efeitos citolíticos. Como já mencionado, estas toxinas são multifuncionais e possuem atividade nociceptiva, neuromuscular, cardiovascular e induz efeito endematogênico (revisado por Church e Hdgson, 2002a).

Tem-se especulado que as repostas cardiovasculares induzidas por veneno píceos podem ser resultantes da atividade citolítica dessas toxinas, uma vez que a homeostasia de células endoteliais e cardíacas pode ser afetada por essas toxinas “perturbadoras” de membrana (Low *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997; Church and Hodgson, 2002a).

5.6. O efeito cardiovascular da Sp-CTx

A Sp-CTx reproduziu qualitativamente os efeitos induzidos pelo SpV *in vivo* relatados anteriormente (Gomes *et al.*, 2010), entretanto, foi quatro vezes mais potente. A toxina, na dose de 70 µg/Kg, ocasionou efeito bifásico constituído de aumento seguido de redução da pressão arterial sistólica e diastólica, e também reduziu a frequência cardíaca em ratos anestesiados. Andrich e colaboradores (2010) relataram que a Sp-CTx induz vasodilatação mediada pela liberação de NO. Esse fato pode estar associado com a queda de pressão observada *in vivo* no presente estudo. Por outro lado, esta fase da resposta pode ser resultante de algum tipo de compensação, como baroreflexo, em resposta à primeira fase.

Efeitos semelhantes foram descritos para a SNTX. Em ratos anestesiados, esta toxina (20 µg/Kg) induz um rápido aumento da pressão arterial seguido de redução o que leva os animais ao óbito (Low, *et al.*, 1993). Diferentemente, os casos de óbito induzidos pela Sp-CTx não parecem estar diretamente relacionados com queda de pressão arterial, mas sim com a intensa bradicardia.

A fim de se excluir a influência de outros sistemas e de possíveis respostas compensatórias *in vivo* sobre a resposta cardíaca induzida pela Sp-CTx, foram empregados ensaios *in vitro*.

Em corações isolados, foi possível observar que a Sp-CTx (10^{-9} a 10^{-5} M) também reproduziu os efeitos previamente relatados para a peçonha bruta (Gomes *et al.*, 2010). A Sp-CTx induziu resposta inotrópica positiva, caracterizada pelo aumento da pressão sistólica intraventricular e da dP/dt. Esses efeitos ocorreram de forma dose-dependente e transientes, com duração de aproximadamente 2 minutos, com exceção da resposta à maior dose testada, a qual induziu parada cardíaca irreversível. Resultados semelhantes

foram descritos para a toxina PC (do peixe *Plotosus canius*), que também induz parada cardíaca (Auddy e Gomes, 1996).

Andrich e colaboradores (2010) demonstraram que a Sp-CTx induz vasodilatação seguida de vasoconstrição em anéis de artéria aorta, entretanto, no presente trabalho observou-se apenas o efeito vasoconstritor no leito coronariano, caracterizado por aumento da pressão de perfusão. É possível que esse efeito seja consequência do aumento intracelular de cálcio no músculo liso vascular, uma vez que a toxina promove o aumento do influxo de Ca^{2+} por canais tipo-L, como demonstrado em cardiomiócitos.

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

Assim como Andrich e colaboradores (2010), outros trabalhos relatam a vasodilatação como resposta vascular induzida por peçonhas de peixes. O veneno do peixe-leão (*P. volitans*) causa relaxamento dependente do endotélio em anéis de coronária de porco. Esse efeito é potencializado pela atropina, porém é reduzido pelo inibidor da NO-sintase (LNAME) e pela ausência de Ca^{2+} (Church e Hodgson, 2002b). A SNTX também induz vasodilatação em anéis de aorta e este efeito também é dependente de óxido nítrico bem como de ácido sulfídrico (Liew *et al.*, 2007).

Alguns autores, entretanto, demonstram efeito vasoconstritor para peçonhas de peixes. Investigações usando microscopia intravital revelaram que o veneno do peixe *Thalassophryne maculosa* causa alterações hemodinâmicas no músculo cremaster de camundongo incluindo contração arteriolar transiente (Sosa-Rosales *et al.*, 2005a) e o veneno do peixe-gato árabe (*Arius thalassinus*) exerce o mesmo efeito sobre preparações com a artéria umbilical de humano (Thulesius *et al.*, 1983). O veneno do peixe-pedra (*S. trachynis*) causa constrição de anéis de coronárias de porco na ausência e presença do

endotélio vascular, sendo que essa resposta é abolida pela atropina (Church e Hodgson, 2000).

Os efeitos musculares induzidos pela Sp-CTx foram avaliados em músculos papilares cardíacos isolados. A concentração utilizada neste esse ensaio (10^{-7} M) foi selecionada de acordo com os experimentos em corações isolados. Nestes músculos a toxina reproduziu os efeitos induzidos pelo SpV, aumentando a força de contração isométrica e a dF/dt sem alterar o tempo de ativação e o de relaxamento. Efeitos semelhantes são descritos para a cardioleputina, toxina do veneno do peixe-pedra (*Synanceja verrucosa*), a qual promove rápido aumento na resposta contrátil e um aumento moderado da frequência cardíaca em átrio isolado de cobaia (Abe *et al.*, 1996).

Os efeitos produzidos pela Sp-CTx no músculo papilar foram atenuados na presença do propranolol ou pelo tratamento prévio com tiramina, o que demonstra o envolvimento dos β -receptores adrenérgicos. Este fato sugere que a Sp-CTx induz a liberação de noradrenalina das varicosidades simpáticas e/ou estimula diretamente os receptores β -adrenérgicos, sendo este neurotransmissor é responsável, pelo menos parcialmente, pelo efeito inotrópico positivo.

Foi demonstrado que a verrucotoxina estimula receptores β -adrenérgicos, aumentando a corrente de cálcio em miócitos atriais de sapo (Sauviat *et al.*, 1995). Mais recentemente, a capacidade desta toxina de atuar como agonista dos receptores β -adrenérgicos foi confirmada em miócitos ventriculares de cobaias (Yazawa *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram que a verrucotoxina induz prolongamento da duração do potencial de ação sem alterar o potencial de repouso. Além disso, esta toxina aumenta a I_{CaL} e este efeito é bloqueado pelo propranolol, o que sugere o envolvimento da via do cAMP-PKA. Além de atuar como agonista do receptor β -adrenérgico, a verrucotoxina também age sobre receptores muscarínicos (M_3) inibindo a corrente de K (I_{KATP}) de forma dose-dependente (Wang *et al.*, 2007) em cardiomiócitos de cobaia.

Considerando nossos resultados e os dados da literatura, ainda pode-se sugerir que a liberação de noradrenalina induzida pela Sp-CTx seja consequência do influxo de cálcio através dos poros possivelmente formados pela toxina na membrana celular. Meunier e colaboradores (2000) e Ouanounou e colaboradores (2002) demonstraram que a traquinilisina, do peixe *S. trachynis*, induz a formação de poros permeáveis ao Ca^{2+} o qual induz a secreção de catecolaminas pelas células cromóafins. A norepinefrina, por sua vez, atuaria ativando os receptores β -adrenérgicos, e como é bem estabelecido, a estimulação desses receptores ativa a proteína quinase A (PKA) via proteína G/AMPC. A PKA ativa, fosforila o canal sarcolemal de Ca^{2+} tipo-L e o receptor de rianodina, aumentando a amplitude do transiente de cálcio, da força de contração do músculo cardíaco e da dF/dt , observados na presença da Sp-CTx em músculos papilares.

Como as respostas induzidas pela Sp-CTx nos músculos papilares não foram abolidas na presença do β -bloqueador ou pelo tratamento com tiramina, esta toxina poderia também atuar de forma independente dos receptores adrenérgicos.

O envolvimento do Ca^{2+} na resposta cardíaca induzida pela Sp-CTx foi investigada utilizando-se quatro protocolos experimentais: PRC (“pos-rest contraction”), potenciação relativa, *patch clamp* e microscopia confocal.

A participação putativa do influxo de cálcio sarcolemal nos efeitos induzidos pela Sp-CTx, em músculo papilares, foi avaliada através do protocolo experimental de PRC da força de contração. Nesse protocolo, o estoque de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático é depletado pela cafeína adicionada à solução de perfusão destituída de Ca^{2+} . A exposição dos miócitos a esta solução facilita a extrusão de Ca^{2+} pelo sarcolema (Bassani *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995). Assim, a contração após o repouso de 10 minutos é dependente, principalmente, do influxo de cálcio pela membrana plasmática. Na presença da Sp-CTx a potenciação pós-repouso da força de contração foi acentuada, sugerindo que o influxo sarcolemal de Ca^{2+} pode estar envolvido nos mecanismos cardiotoxícos desta toxina.

Estes resultados foram confirmados utilizando-se a técnica eletrofisiológica “patch-clamp” modalidade “whole cell”. Através destes experimentos observou-se que a Sp-CTx (1 nM) aumenta (20%) o pico da corrente de Ca^{2+} tipo-L em cardiomiócitos. Como descrito na introdução, o influxo de cálcio via I_{CaL} ativa a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, o principal estoque deste íon nos cardiomiócitos. Esse fenômeno é conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio, que pode culminar na contração muscular. Dessa forma, no músculo cardíaco a força de contração é dependente da concentração extracelular de Ca^{2+} , do influxo de cálcio através dos canais lentos de Ca^{2+} e do estoque deste íon do retículo sarcoplasmático (revisado por Bers, 2002). Mediante o descrito a cima, o aumento do influxo sarcolemal de cálcio pode explicar parte do efeito inotrópico induzido pela Sp-CTx.

Para avaliar o envolvimento putativo do retículo sarcoplasmático no mecanismo de ação da Sp-CTx, empregou-se o protocolo experimental de potenciação relativa. As contrações que ocorrem após certas pausas do estímulo elétrico no músculo cardíaco de ratos são potencializadas. Nestes animais a força de contração é potencializada com o aumento do tempo da pausa e essas potenciações variam com o Ca^{2+} armazenado nos sítios intracelulares (Mill *et al.*, 1992; Vassallo e Mill, 1986). A administração da Sp-CTx (10^{-7} M) durante a pausa (de 30 s) no estímulo elétrico acentuou de forma significativa a potenciação observada, sugerindo que o retículo sarcoplasmático está envolvido nos efeitos induzidos pela toxina e que esta induz o maior acúmulo de Ca^{2+} nesta organela.

Os efeitos da Sp-CTx sobre o transiente de cálcio foram analisados em miócitos isolados por microscopia confocal utilizando-se duas concentrações (5 nM e 1pM) da toxina. Na presença da Sp-CTx (5 nM) observou-se ondas de cálcio e incapacidade destas células em responder à estímulos elétricos, além um grande número de *sparks*, que são definidos como o evento elementar da liberação de Ca^{2+} pelo retículo do miócito cardíaco (revisado por Cheng e Lederer, 2008). Nessa mesma concentração, a Sp-CTx

induziu extra-sístoles das células. Esses efeitos impossibilitaram a análise quantitativa do transiente de cálcio. Estes fatos estão de acordo com a exacerbada contração dos miócitos cardíacos induzida pela toxina observada durante os experimentos eletrofisiológicos (dados não mostrados).

Entretanto, na menor concentração testada (1 pM), a Sp-CTX induziu uma diminuição da amplitude do transiente de cálcio e o aumento do T_{50} de decaimento em cardiomiócitos. Considerando estes dados, pode-se demonstrar que a toxina, nesta concentração, reduziu a velocidade de liberação de Ca^{2+} e de recaptção deste íon. Apesar da redução da liberação de Ca^{2+} , a concentração de cálcio mioplasmática pode está aumentada devido à redução da velocidade de recaptção deste íon.

Considerando os resultados, podemos sugerir que a toxina do peixe-escorpião *S. plumieri* (Sp-CTX) induza seus efeitos cardiotóxicos (i) por ativação direta e/ou indireta dos receptores adrenérgicos os quais induzem a ativação dos canais para Ca^{2+} do tipo-L, aumentando o influxo de Ca^{2+} sarcolemal; (ii) um influxo aumentado de Ca^{2+} também pode estar associado à formação de poros no sarcolema, semelhante ao observado nos eritrócitos de coelho; (iii) pela alteração da liberação/recaptção de Ca^{2+} pelo retículo.

Todos esses efeitos moleculares podem culminar no acúmulo de Ca^{2+} citoplasmático e serem responsáveis pela resposta inotrópica positiva induzida pela Sp-CTX em corações e músculos papilares isolados.

6. Considerações finais e conclusões

Este trabalho contribuiu para gerar conhecimentos básicos sobre a peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. Obtivemos avanços significativos em relação à resposta cardiovascular induzida pela peçonha bruta e na caracterização química e farmacológica da Sp-CTx, toxina responsável pelo efeito hemolítico e cardiotoxico desta peçonha. Os principais achados deste estudo demonstram que a Sp-CTx é uma proteína formadora de poros e seus efeitos cardíacos envolvem o sistema adrenérgico e a cinética do Ca²⁺.

1. A peçonha bruta do *S. plumieri* induz efeito inotrópico positivo em músculos papilares, e este efeito envolve a participação da liberação de noradrenalina das varicosidades adrenérgicas.

2. Os componentes da peçonha do *S. plumieri* apresentam similaridade antigênica com os componentes da peçonha do peixe *Synanceja trachynis*.

3. Um novo processo para purificação da Sp-CTx, com maior rendimento e fator de purificação, foi estabelecido. Este processo otimizado é composto por 3 etapas: precipitação salina e duas etapas cromatográficas (interação hidrofóbica e troca aniônica).

4. A Sp-CTx forma agregados monoméricos, diméricos e tetraméricos.

5. Sequências internas de aminoácidos da Sp-CTx possuem identidades com citolisinas de venenos de outros peixes.

6. A Sp-CTx é uma proteína formadora de poros em eritrócitos de coelho.

7. O diâmetro do poro formado pela Sp-CTx é dependente do tempo de contato com a toxina, e provavelmente depende da sua capacidade de formar agregado.

8. A Sp-CTx reproduz os efeitos da peçonha bruta tanto *in vivo* (efeito bifásico sobre pressão arterial sistólica, diastólica e bradicardia) como *in vitro* (efeito inotrópico em músculos papilares).

9. Sp-CTx ativa canal para cálcio tipo-L, o que está de acordo com o efeito inotrópico positivo induzido por esta toxina.

10. Sp-CTx altera a liberação e recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático

O mecanismo de ação envolvido na liberação de noradrenalina e a possibilidade dos efeitos cardiovasculares estarem relacionados com a capacidade da toxina de formar poros precisam ser investigados.

7. Referencias bibliográficas

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

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 cytolytic isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon* 56: 487–496.

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

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

Austin, L., Cairncross, K.D., McCallum, I.A.N., 1961. Some pharmacological actions of the venom of the *Synanceja horrida*. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 131, 339–347.

Australian Museum: Disponível em: <http://australianmuseum.net.au/image/Reef-Stonefish-at-Baldwins-Bommie>. Acessado em Janeiro de 2013.

Bassani, J.W.V., Bassani, R.A., Bers, D.N., 1994. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Specie-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology.* 476: 279-293.

Batista, C.V.F., Román-González, S.A., Salas-Castillo, S.P., Zamudio FZ, Gómez-Lagunas F, Possani LD., 2007. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 146: 147–157.

Belmonte G, Pederzoli C, Macek P, Menestrina G., 1993. Pore formation by the sea anemone cytolytic equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J Membr Biol.* 1993 Jan;131(1):11-22.

Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 10;415(6868):198-205.

Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.-M. and Holland, I. B. 1986. Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 52, 63-69

Blaustein, M.P., 1988. Sodium/calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 5:S56-68.

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.

Brenner B.M., Troy J.L., Ballermann B.J., 1989. Endothelium-dependent vascular responses, mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84: 1373-1378.

Brette, F., Salle, L., Orchard, C. H., 2006. Quantification of calcium entry at the t-tubules and surface membrane in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 90: 381–389.

Brini, M., Carafoli, E., 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 89(4): 1341-78

Brittsan, A.G., Kranias, E.G., 2000. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Dec;32(12):2131-9.

Brodde, O.E., 1991. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev.*;43(2):203-42.

Brodde, O.E., Michel, M.C., 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 51(4):651-90.

Brodie, E.D. *Toxins and Venoms.* *Curr Biol.* 2009; 19: R931-935.

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

Carlson, R.W., Schaeffer Jr., R.C., La Grance, R.G., Roberts, C.M., Russel, 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., Russel, 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. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*. 2005; 45: 843–850.

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

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

Catterall, W.A., 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (8):a003947.

Cerra, M.C., Imbrogno, S., 2005. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)*. 205(1): 9-25.

Chase, A., Orchard, C. H. 2011 Ca efflux via the sarcolemmal Ca ATPase occurs only in the t-tubules of rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50: 187–193.

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. *Biochem. J.* 325: 685–691.

Cheng, H., Lederer, W.J., 2008. Calcium sparks. *Physiol Rev.* 88(4):1491-545.

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

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., Moldrich R.X., Beart P.M., Hodgson W.C., 2003. Modulation of intracellular Ca²⁺ levels by Scorpaenidae venoms. *Toxicon* 41: 679-89.

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

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

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

Church, J.E. Hodgson W.C., 2000b. Evidence for the presence of a cholinomimetic in the venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Proc. Aust. Soc. Clin. Exp. Pharmacol. Toxicol.* 7: 90-100.

Church, J.E., Hodgson, W.C., 2000c. Similarities in the pharmacological activity of venoms from Australian fish. *Proc. Aust. Soc. Clin. Exp. Pharmacol. Toxicol.* 8, 15.

Cifonauta: Marine Biology Image Database. Disponível em: <http://cifonauta.cebimar.usp.br>. Acessado em Janeiro de 2013.

Clarke, D.M., Loo, T.W., Inesi, G., and MacLennan, D.H., 1989. Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature* 339, 476-478.

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

Colasante, C., Meunier, F.A, Kreger AS, Molgo J., 1996. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2149–2156.

Cominetti, M.R., 2007. Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores. In: SELISTRE-DEARAÚJO HS.; SOUZA DHF. Métodos em toxinologia; Toxinas de serpentes. São Paulo: EdUFSCar, Cap.3, p. 45-51.

Conant, G.C, Wolfe, K.H., 2008. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet.*; 9(12): 938-950.

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

Datta, A., Gomes, A., Sarangi, B., Kar, P.K., Lahiri, S.C., 1982. Pharmacodynamic actions of crude venom of the Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. *Indian J. Med. Res.* 76, 892–89

de Lima, M.E, Figueiredo, S.G, Pimenta, A.M, Santos, D.M, Borges, M.H., Cordeiro M.N, Richardson, M., Oliveira, L.C., Stankiewicz, M., Pelhate, M., 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 146(1-2): 264-279.

de Lima, M.E., Fortes-Dias, C.L., Carlini, C.R, Guimarães, J.A., 2010. Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. *Toxicon.* 56(7):1084-91.

Del Corso, C., Costa, R.R., Varanda, W.A., 2012. Canais para cálcio dependentes de voltagem. Em: *Sinalização de cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares*. São Paulo, Editora Savier.

Döring, H.J., 1990. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiol Bohemoslov.* 39(6):481-504

Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G., 2007. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.* 24: 145–161.

ExpANSy: Disponível em: <http://www.expasy.org/tools/>. Acessado em Janeiro de 2013.

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

Figueiredo, 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.

Figueiredo, S.G., Andrich, F., Lima, C., Lopes-Ferreira M., Vidal Haddad Jr., 2009. Venomous Fish: A brief overview. Em: *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology.* Belo Horizonte, Editora UFMG.

Fiores, i M., Furieri, L.B., Simões, M.R., Ribeiro Junior, R.F., Meira, E.F., Fernandes A.A., Stefanon, I., Vassallo, D.V., 2013. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz J Med Biol.* 46(2):178-185.

Fischmeister, R., Castro, L., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Vandecasteele, G., 2005. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 142(2):136-43.

Flicker, P.F., Phillips, G.N. Jr, Cohen, C., 1982. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J Mol Biol.* 5;162(2):495-501.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., Ramesh, V., 1999. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* 77: 1528–1539.

Fry, B.G, Fry, B.G, Roelants, K., Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, Nevalainen TJ, Norman JA, Lewis RJ, Norton RS, Renjifo C, de la Vega RC., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.;* 10: 483–511.

Garnier P., Ducancel F., Ogawa T., Boulain J.C., Goudey-Perrière F., Perrière C., Ménez A., 1997. Complete amino-acid sequence of the beta-subunit of VTX from venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) as identified from cDNA cloning experiments. *Biochim Biophys Acta.* 1337(1): 1-5.

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

Ghadessy F.J., Chen D., Kini R.M., Chung M.C., Jeyaseelan K., Khoo H.E., Yuen R., 1996. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. *J Biol Chem*. 11, 25575-81.

Ghafari, S.M., Jamili, S., Bagheri, K.P., Ardakani, E.M., Fatemi, M.R., Shahbazzadeh, F., Shahbazzadeh, D., 2013. The first report on some toxic effects of green scat, *Scatophagus argus* an Iranian Persian Gulf venomous fish. *Toxicon*. 66: 82-87.

Ginsburg, H., Stein, W. D., 1987. Biophysical analysis of novel transport pathways induced in red blood cell membranes. *J. Membr. Biol*. 96: 1-10.

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(2-3):580-589.

Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C., 1993. The structure of the venom gland of stonefish *Synanceja horrida*. *Toxicon*. (8): 979-88.

Guatimosim, S., Sobie, E.A., dos Santos Cruz, J., Martin, L.A., Lederer, W.J., 2001 Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current.. *Am J Physiol Cell Physiol* May. 280(5):C1327-39.

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: 509-528.

Györke, S., Györke, I., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Williams, S.C., 2004. Modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by calsequestrin in cardiac myocytes. *Biol Res.* 37(4):603-607.

Györke, S., Terentyev, D., 2008. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 77(2):245-55.

Habermann, E., Ahnert-Hilger, G., Chhatwal, G.S., Beress, L., 1981. Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics. *Biochim Biophys Acta.* 649(2):481-486.

Habermann, E., Hardt, K.L., 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry.* 50: 163–173.

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., Garrone, N.D, de Paula, Neto. J.B, Marques, F.P.L., 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: 287–294.

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

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

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

Halstead, B.W., 1966. Venomous marine animals of Brazil. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, p. 1-26, 1966.

Hill, A., 1949 The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B* 136, 399–420.

Hopkins, B.J., Hodgson, W.C., 1998. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). *Toxicon*. 36(7): 973-983.

Hopkins, B.J., Hodgson, W.C., Sutherland, S.K., 1994. Pharmacological studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon*. 32: 1197–1210.

Hopkins, B.J., Hodgson, W.C., Sutherland, S.K., 1996. Evidence for adrenergic and tachykinin activity in venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Toxicon*. 34: 541-554.

Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., Flockerzi, V., 1992. Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J*. 11(3):885-90.

Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M.H., Terracciano, C.M., 2011. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Biol Sci*. 278(1719):2714-23.

Iftinca, M.C., 2011. Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation. *J Med Life*. 4(2):126-38.

Jaye, D.A., Xiao, Y.F., Sigg, D.C., 2010. Basic Cardiac Electrophysiology: Excitable Membranes. Em: Cardiac Electrophysiology Methods and Models. Springer.

Junqueira, M.E., Grund, L.Z., Orii, N.M, Saraiva, T.C., de Magalhães Lopes, C.A., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2007. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon*. 49(7): 909-919.

Karmakar S, Muhuri DC, Dasgupta SC, Nagchaudhuri AK, Gomes A, 2004. Isolation of a haemorrhagic protein toxin (SA-HT) from the Indian venomous butterflyfish (*Scatophagus argus*, Linn) sting extract on experimental animals.. *Indian J Exp Biol*. 42(5): 452-60.

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

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

- King, G.F., 2007. Modulation of insect Ca(v) channels by peptidic spider toxins. *Toxicon*. 49(4): 513-530.
- Kiriake, A., Shiomi, K., 2011. Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Toxicon*. 58: 494–501.
- Kizer, K.W., McKinney, H.E, Auerbach, P.S.,1985. Scorpaenidae envenomation: a five-year Poison Center experience. *JAMA*.; 253: 807–810.
- Kobayashi, T., Solaro, R.J., 2005. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol*. 67:39-67.
- Konhilas ,J.P., Irving, T.C., de Tombe, P.P., 2002. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. *Pflugers Arch*. 445(3):305-10
- Kordis, D., Gubensek, F., 2000. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene*. 30; 261(1): 43-52.
- Kreger, A.S., 1991. The detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Toxicon* 29, 733–743.
- Kreger, A.S., Molgo, J., Comella, J.X., Hansson, B., Thesleff, S., 1993. Effects of stonefish (*Synanceia trachynis*) venom on murine and frog neuromuscular junctions. *Toxicon* 31, 307–317.
- Kuga, S., 1981. Pore size distribution analysis of gel substances by size exclusion chromatography. *J. Chromatogr*. 206: 449–461.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): .680-685.
- Layland, J., Li, J.M., Shah, A.M., 2002. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 540(Pt 2):457-467.

Leite, C.M., Vassallo, D.V., Mill, J.G. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995 May;73(5):638-43.

Leite, C.M., Vassallo, D.V., Mill, J.G., 1991. Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res.* 24(8):843-846.

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

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

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 neutralization of its toxic activities. *Toxicon.* 36 (2), 405-410.

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

Low, K.S, Gwee MC, Yuen R, Gopalakrishnakone, P, Khoo H.E., 1994. Stonustoxin: effects on neuromuscular function in vitro and in vivo. *Toxicon.* 32: 573-581.

Low, K.S, Gwee, M.C, Yuen, R., 1990. Neuromuscular effects of the venom of the stonefish *Synanceja horrida*. *Eur. J. Pharmacol.* (40) 183 - 574.

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

Lynch, M., Conery, J.S., 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 290(5494): 1151-1155.

MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., Green, N.M., 1985. Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature.* 316(6030):696-700.

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. orbignyi. *Toxicon*. 47(5): 575-583.

Marti, C.N., Gheorghiade, M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Quyyumi, A.A., Butler, J., 2012. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 60(16): 1455-1469

Mattiazzi, A., Mundiña-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L., Kranias, E., 2005. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 68(3):366-75

Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S. and Welch, R., 1994. Pore-formation by Escherichia coli hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* 87: 249-267.

Menezes, T.N., Carnielli, J.B., Gomes, H.L., Pereira, F.E., Lemos, E.M., Bissoli, N.S., Lopes-Ferreira, M., Andrich, F., Figueiredo, S.G. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon*. 60(1): 4-11

Meunier, F.A, Mattei, C., Chameau, P, Lawrence, G., Colasante, C., Kreger, A.S., Dolly, J.O, Molgó, J., 2000. Trachynilysin mediates SNARE-dependent release of catecholamines from chromaffin cells via external and stored Ca²⁺. *J Cell Sci*. 7:1119-25.

Mill, J.G., Vassallo, D.V., Leite, C.M.,1992. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. 25(4): 399-408

Mitchell, R.D., Simmerman, H.K., Jones, L.R., 1988. Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem*;263:1376–1381.

Molenaar, P., Kaumann, A.J., 1997. On criteria for functional beta 3-adrenoceptors. *Trends Pharmacol Sci*. 18(7):258

Morad, M., Tung, L., 1982. Ionic events responsible for the cardiac resting and action potential. *The American Journal of Cardiology*. 49: 584-594.

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

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

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

Nelson, J.S. 1984. *Fishes of the World*. Wiley, New York.

Nicoll, D.A., Longoni, S., Philipson, K.D., 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *Science*. 250(4980):562-5

Ohtsuki, I., 1979. Molecular arrangement of troponin-T in the thin filament. *J Biochem*. (2):491-497.

Olivera, B.M, Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Varga, J., Rivier, J., de Santos V., Cruz, L.J.,1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*. 230(4732): 1338-43.

Oren, Z., Shai, Y., 1996. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur J Biochem*. 1;237(1):303-10.

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

Page, E., 1978. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *Am J Physiol*. 235: 147-158.

Page, E., McCallister, L.P., Power, B., 1971. Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci.* 68(7):1465-1466.

Palmer, M., Weller, U., Meûner, M., Bhakdi, S., 1993. Recovery of human fibroblasts from attack by the pore-forming alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* *J. Biol. Chem.* 268: 11963-11967

Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK *et al.* Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem* 2004;279:18026–18033.

Peachey, L., Huxley, A., 1962. Structural identification of twitch and slow striated muscle fibers of the frog. *J. Cell. Biol.* 13: 177–180.

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., Chung, M.C., Khoo, H.E., 1992. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol B.* 101(1-2): 159-163.

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 *Synansea horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 793–798.

Rapoport, R. M., Ashraf, M. and Murad, F., 1989. Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. *Circ. Res.* 64: 463-473.

Raymen,t I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M., 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science.* 2;261(5117):50-8.

Renkin, E.M., 1954. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J. Gen. Physiol.* 38: 225–243.

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

Roden, D.M., George, A.L., 1997. Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. American Journal of Physiology. 42: H511-H525

Rodrigues, R.J., 1972. Pharmacology of South American freshwater stingray venom (Potamotrygon motoro). Trans N Y Acad Sci 34, 677-86.

Rodriguez De La Vega RC; Possani LD., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels.Toxicon; 43: 865–875.

Rodriguez De La Veja, R.C; Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion peptides specific for Na⁺ channels: biodiversity, structure-function relationships and evolution. Toxicon, v. 46, 831–844.

Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M. and Patriarca, P., 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*.Toxicon 33: 315-326

Russell, F.E., 1971. Venom poisoning. Ration. Drug Ther; 5: 1–7.

Russell, F.E., Emery, J.A., 1960. Venom of the weevers *Trachinus draco* and *Trachinus vipera*. Ann. NY Acad. Sci. 90, 805–819.

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

Salameh, A., Dhein, S., 2013. Effects of mechanical forces and stretch on intercellular gap junction coupling. Biochim Biophys Acta. 1828(1):147-156

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

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

Saunders, P.R., Rothman, S., Medrano, V.A., Chin, P., 1962. Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanceja horrida*. Am. J. Physiol. 203: 429–432.

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

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

Shai, Y., Hadari, Y. R. and Finkels, A., 1991. pH-dependent pore formation properties of pardaxin analogues. J. Biol. Chem. 266: 22346 -22354.

Shepherd, J.T., Vanhoutte, P.M., 1979. Em: The Human Cardiovascular System. Facts and Concepts. New York: Raven.

Shiomi, K., Hosaka, M., Fujita, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T., 1989. Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. Mar. Biol. 103: 285–289.

Sirker, A., Shah, A.M., 2002. Biochemistry and physiology of cardiac muscle. Medicine. 30: 51-53.

Sivan, G., Venketasvaran, K., Radhakrishnan, C.K., 2010. Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom. Toxicon. 56(6): 914-25.

Sivan, G., Venketesvaran, K., Radhakrishnan, C.K., 2007. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. Toxicon. 15;50(4): 563-71.

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

Smith, W.L., Wheeler, W.C., 2006. Venom evolution widespread in fishes: A phylogenetic road Map for Bioprospecting of Piscine. *Journal of Heredity*. 2006; 97(3): 206–217

Solaro, R.J., Rarick, H.M., 1998. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*. 83(5): 471-80.

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

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

Sung, J.M., Low, K.S., Khoo, H.E., 2002. Characterization of the mechanism underlying stonustoxin-mediated relaxant response in the rat aorta in vitro. *Biochem Pharmacol*. 15;63(6): 1113-1118.

Tada, M., Toyofuku, T., 1998. Molecular regulation of phospholamban function and expression. *Trends Cardiovasc Med*. 8(8):330-40.

Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S..2012 Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1824(1): 164-176.

ter Keurs HE. 2012. The interaction of Ca^{2+} with sarcomeric proteins: role in function and dysfunction of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1;302(1):H38-50.

Terlau, H., Shon, K.J, Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W., Olivera, B.M., 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*. 381(6578): 148-51.

Thulesius O, Al-Hassan JM, Criddle RS, Thomson M., 1983. Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). *Gen Pharmacol*. 14(1), 129-32.

Tombe, P.P., 2003. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech*. (5):721-730.

Tsien, R.W., Giles, W., Greengard, P., 1972. Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac purkinje fibres. *Nat New Biol.* 6;240(101): 181-183

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.

UniProt. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>. Acessado em Julho de 2012.

Valdivia, H., Possani, LD..1998. Peptide toxins as probes of Ryanodinereceptor. *Trends Cardiovas. Med.* v. 8,p. 111–118.

Vane R.J., Anggard E.E., Botting R.M., 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36.

Vanhoutte, P.M., 1989. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13, 658-666.

Vassallo, D.V., de Carvalho, A.P. Influence of temperature on isometric contractions of rabbit atria during inotropic interventions. *Acta Physiol Lat Am.* 29(2-3):131-135. Vassallo, D.V., Mill, J.G.,1986. Characteristics of myocardial contractions activated under depolarizing conditions. *Braz J Med Biol Res.* 19(3): 439-449.

Walsh, D.A, Van Patten, S.M., 1994. Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* 8(15):1227-36.

Wang, J., Yazawa, K., Hao, L., Onoue, Y., Kameyama, M., 2007. Verrucotoxin inhibits KATP channels in cardiac myocytes through a muscarinic M3 receptor-PKC pathway. *European Journal of Pharmacology.*; 563, 172-179.

Warshaw DM., 1996. The *in vitro* motility assay: a window into the myosin molecular motor. *News in Physiological Sciences.* 11: 1-7.

Weiner, R. N., Schneider, E., Haest, C. W. M., Deuticke, B., Benz, R., Frimmer, M., 1985. Properties of the leak permeability induced by a cytotoxic protein from *Pseudomonas*

aeruginosa (PACT) in rat erythrocytes and black lipid membranes. *Biochim. Biophys Acta.* 820: 173-182

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

Weisel-Eichler, A., Libersat, F., 2004. Venom effects on monoaminergic systems. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 190(9): 683-90.

Yazawa, K., Wang, J.W., Hao, L.Y., Onoue, Y., Kameyama, M., 2007. Verrucotoxin, a stonefish venom, modulates calcium channel activity in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 55(8): 1198-203.

Zalk, R., Lehnart, S.E., Marks, A.R., 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium *Annu Rev Biochem.* 76:367-385.

Zeisberg, EM., Kalluri, R., 2010. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 107(11):1304-12.

8. Anexos

As seguintes publicações foram originadas a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

8.1. Resumos publicados em anais de congressos

- GOMES, H. L.; ANDRICH, F.; FIGUEIREDO, S. G.; Moysés MR . Effects of Scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom on isolated rat heart.. In: XVI World Congress of the Internacional Society on Toxinology, 2009, Cabo de Santo Agostinho. XVI World Congress of the Internacional Society on Toxinology, 2009
- GOMES, H. L. ; ANDRICH, F. ; RODRIGUES, F. G. ; ROMAN-CAMPOS, D. ; VASSALLO, D. V. ; FIGUEIREDO, S. G. . Cardiovascular effects of Sp-CTx, a potent toxin from the Scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom.. In: XI Congress of the Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx), 2010, Araxá. XI Congress of the Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx), 2010.
- HELENA L. GOMES , D. FREIRE DAVI JR. , FILIPE ANDRICH ,EDNA F. DE MEDEIROS JADER CRUZ ,ANTONIO N.S. GONDIM 3,4, DALTON V. VASSALO, SUELY G. FIGUEIREDO. Cardiovascular and Hemolytic Effects of Sp-CTx a Cytolysin Isolated from the Scorpionfish, *Scorpaena plumieri*. 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Hawaii, 2012.

8.2. Artigos publicados em periódicos

- Gomes HL, Menezes TN, Carnielli JB, Andrich F, Evangelista KS, Chávez-Olórtegui C, Vassallo DV, Figueiredo SG. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. *Toxicon*. 2011 Jun;57(7-8):992-9

- Menezes TN, Carnielli JB, Gomes HL, Pereira FE, Lemos EM, Bissoli NS, Lopes-Ferreira M, Andrich F, Figueiredo SG. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon*. 2012 Jul;60(1):4-11.

8.3. Artigo submetido ao periódico *Toxicon*

- Helena L. Gomes, Filipe Andrich, Consuelo L. Forte-Dias, Jonas Perales, André Texeira-Ferreira, Dalton V. Vassallo, Jader S. Cruz, Suely G. Figueiredo. Molecular and biochemical characterization of a cytolysin from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane