

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS  
E BIOQUÍMICAS DA PEÇONHA E DO MUCO DA  
PELE DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri***

**PEDRO HENRIQUE LEMOS**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Outubro de 2013

# **ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA PEÇONHA E DO MUCO DA PELE DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri***

**PEDRO HENRIQUE LEMOS**

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

Aprovada em 25/10/2013 por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely Gomes de Figueiredo – Orientadora, UFES

---

Dr. Filipe Andrich – Co-orientador, UFES

---

Dr. Daniel Moreira dos Santos, UFMG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Livia Carla de Melo Rodrigues, UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivanita Stefanon - Coordenadora do PPGCF, UFES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, Outubro de 2013

---

Lemos, Pedro Henrique, 1985

Estudo das propriedades farmacológicas e bioquímicas da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*. [Vitória] 2013

xv, 111p., 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2013)  
Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

---

I – Química de Proteínas

II – PPGCF/CCS/UFES

III – Estudo das propriedades farmacológicas e bioquímicas da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*.

.

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

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).
- Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória (FACITEC).

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

“A vida é difícil, bem o sei. Compõe-se de mil nadas, que são outras tantas picadas de alfinetes, mas que acabam por ferir. Se, porém, atentarmos nos deveres que nos são impostos, nas consolações e compensações que, por outro lado, recebemos, havemos de reconhecer que são as bênçãos muito mais numerosas do que as dores. O fardo parece menos pesado, quando se olha para o alto, do que quando se curva para a terra a frente”.

(A Paciência, Evangelho Segundo o Espiritismo)

## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

Espécimes do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* são comumente encontrados ao longo da costa brasileira e frequentemente causam envenenamentos em seres humanos. Seus espinhos são revestidos por uma bainha tegumentar, cobertas por uma camada de muco cutâneo que pode ser inoculado na ferida causada pelo espinho. Isso nos levou a supor que as manifestações locais e sistêmicas induzidas por *S. plumieri* possam resultar da ação sinérgica de substâncias secretadas pelas glândulas de peçonha e pelas células epidérmicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade ao estudo da peçonha de *S. plumieri* (SpV) e iniciar a caracterização físi-farmacológica e bioquímica do muco da pele deste peixe (SpSM), o qual nunca foi explorado. Além disso, a análise proteômica foi utilizada para desvendar e comparar a composição complexa destes dois venenos. Ambos SpV e SpSM exibem atividade proteolítica sobre gelatina e fibrinogênio, embora apresente hidrólise lenta e não-específica. Atividades hialuronidásica, cardiovascular, inflamatória e hemolítica foram encontradas somente para SpV, evidenciando a exclusiva produção de toxinas (citolisina e hialuronidase) pelas glândulas de peçonha. A hemólise parece resultar de uma ação direta de constituintes da peçonha em membranas de eritrócitos, uma vez que SpV não exibe atividade fosfolipásica do tipo A<sub>2</sub>. Embora desprovido de atividade hemolítica, SpSM foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho (MHC 2,5 mg/mL), o que sugere a presença de proteínas de reconhecimento de carboidratos (lectinas) no muco. A análise de espectrometria de massas das principais frações eluídas a partir da cromatografia líquida bidimensional (filtração em gel e de fase reversa) revelaram espécies moleculares exclusivas para SpV (533 = 36%) e SpSM (416 = 28%) e 269 (18%) encontradas em ambos os venenos. Foi observada uma predominância de massas inferiores a 10KDa em ambas as amostras SpV e SpSM (69% e 93%, respectivamente). Os dados obtidos sugerem que SpSM não apresenta componentes capazes de desencadear importantes reações no envenenamento, embora, juntamente com SpV, possa ser considerado uma rica fonte de compostos bioativos, especialmente proteínas e peptídeos.

**Palavras-chave:** Peçonha de peixe; *Scorpaena plumieri*; muco da pele, atividades biológicas, análise proteômica.

## ABSTRACT

The scorpionfish *Scorpaena plumieri* is one of the most common venomous fish found along the Brazilian coast and is often involved in human accidents. Its venomous stings are covered by an integumentary sheath coated by a skin mucus layer, which may be carried along with the venom into the wound caused by the sting. This led us to suppose that the local and systemic manifestations induced by *S. plumieri* in accidents and experimental animals are combined effects of substances secreted by venom glands and epidermal cells. Therefore, the aim of this work was to continue the study *S. plumieri* venom (SpV) and initiate the physio-pharmacological and biochemical characterization of the skin mucus of this fish (SpSM), which has never been explored. In addition, a proteomic approach was employed to unravel and compare the complex composition of these two venoms. Both SpV and SpSM exhibit proteolytic activity upon gelatin and fibrinogen, albeit the hydrolysis was slow and non-specific. Hyaluronidase, cardiovascular, inflammatory and hemolytic activities were found only for SpV, evidencing the exclusive production of toxins (cytolysin and hyaluronidase) by the venom glands. The hemolysis seems to result from a direct action of venom constituents on erythrocytes membrane, since it lacks phospholipase A<sub>2</sub> activity. Although devoid of hemolytic activity, SpSM was able to agglutinate rabbit erythrocytes (MHC 2.5mg/mL) suggesting the presence of carbohydrate-recognition proteins (lectins) in the mucus. Mass spectrometry analysis of the main fractions eluted from the two-dimensional liquid chromatography (gel filtration and reversed phase) revealed exclusive molecular species for SpV (533 = 36%) and SpSM (416 = 28%); 269 (18%) were found in both venoms. It was observed a predominance of mass lower than 10KDa in both SpV and SpSM (69% and 93%, respectively). The data here presented suggest that SpSM does not exhibit components capable to trigger relevant envenomation reactions. Nevertheless, together with SpV, it is a rich source of bioactive compounds, specially proteins and peptides.

**Keywords:** Fish venom; *Scorpaena plumieri*; Skin mucus; Biological activities; Proteomic analysis.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 A pesquisa sobre peçonhas animais	18
1.2 Peixes peçonhentos e o peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	20
1.3 Caracterização das peçonhas de peixes	25
1.3.1 Atividade cardiovascular	26
1.3.2 Atividade hemolítica e citotóxica	27
1.3.3 Atividade inflamatória	28
1.3.4 Atividades enzimáticas	29
1.3.5 Hialuronidasas	29
1.3.6 Enzimas proteolíticas	31
1.4 Caracterização do muco da pele de peixes	33
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
3.1 Reagentes	40
3.2 Animais	40
3.3 Obtenção dos extratos proteicos do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i>	41
3.3.1 Obtenção da peçonha	41
3.3.2 Obtenção do muco da pele	41
3.4 Dosagem de proteína	43
3.5 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	43
3.5.1 Ensaio da atividade hemorrágica	43
3.5.2 Ensaio da atividade hemolítica direta	43

3.5.3 Ensaio cardiovascular	44
3.5.4 Ensaio da atividade inflamatória	45
3.6 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	46
3.6.1 Atividades enzimáticas	46
3.6.2 Atividade gelatinolítica	46
3.6.3 Atividade fibrinogenolítica	47
3.6.4 Atividade hialuronidásica	48
3.6.5 Ensaio de hemaglutinação	49
3.6.6 Atividade fosfolipase A2	49
3.7 Análise proteômica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	50
3.7.1 Cromatografia líquida bidimensional (2D-LC)	50
3.7.2 Primeira dimensão – Cromatografia por filtração em gel	50
3.7.3 Segunda dimensão – Cromatografia de fase reversa (RPC)	50
3.7.4 Análise por espectrometria de massas	51
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1 Obtenção da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i> .	53
4.2 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	53
4.2.1 Atividade hemorrágica	53
4.2.2 Atividade citolítica	53
4.2.3 Atividade fosfolipásica A <sub>2</sub>	53
4.2.4 Atividade cardiovascular	57
4.2.5 Atividade inflamatória	57
4.3 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	60
4.3.1 Atividades enzimáticas	60
4.3.1.1 Atividade gelatinolítica	60
4.3.1.2 Atividade Fibrinogenolítica.	60
4.3.1.3 Atividade hialuronidásica	60
4.4 Atividade hemaglutinante	64

4.5 Análise proteômica parcial da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i>	64
4.5.1 Fracionamento de SpV e de SpSM através de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC)	64
4.5.2 Análise das massas moleculares	68
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
5.1 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	72
5.2 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião <i>Scorpaena plumieri</i>	77
5.3 Análise proteômica parcial dos venenos de <i>S. plumieri</i>	83
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>87</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>ADENDO I</b>	<b>109</b>
<b>ADENDO II</b>	<b>111</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO E DO MUCO DA PELE DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*. .....82

**Tabela 2:** COMPARAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES ENCONTRADAS PARA SpV E PARA SpSM COM ÀS DE TOXINAS PURIFICADAS DO VENENO DE *S. plumieri*. .....84

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** ESPÉCIMES REPRESENTANTES DOS PRINCIPAIS GÊNEROS DE PEIXES PEÇONHENTOS DA FAMÍLIA Scorpanidae. (A) Pterois (peixes-leão) (B) Synanceja (peixes-pedra) e (C) Scorpaena (peixes-escorpião). Fontes: (A) Mário, 2013, (B) Sea Life, 2013 e (C) Naval, 2013. ....21
- Figura 2:** PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri* E SEU APARATO PEÇONHENTO. (A) Vista lateral do espécime. (B) Coloração e manchas da região axilar característica da espécie. (C) Espinhos dorsais e membrana tegumentar. (D) Espinhos dissecados mostrando o tecido cinzento no qual se encontram as glândulas produtoras da peçonha. Fonte: (A), (B) e (C), Cassoli, 2008, (D), Haddad Jr., 2000.....23
- Figura 3:** OBTENÇÃO DA PEÇONHA E DO MUCO DA PELE. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Seccionamento dos espinhos. (C) Homogeneização dos espinhos fatiados em água purificada (Milli-Q). (D) Fração solúvel da peçonha bruta após centrifugação. (E) Remoção do muco da pele por raspagem da parte lateral do corpo do peixe. ....42
- Figura 4:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE SpV E DE SpSM EM PELE DE CAMUNDONGOS. Superfície interna da pele de camundongos 24h após injeção intradérmica das amostras: (A) Controle negativo: solução salina (NaCl 0,9% p/v) contendo soroalbumina bovina (0,25mg/mL); (B) e (C) 75µg de proteína de SpV e de SpSM respectivamente. N=3.....54
- Figura 5:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA DE AMOSTRAS DE SpV E DE SpSM. As amostras de SpSM (1-100µg/ml) e de SpV (1 e 10µg/ml) foram incubadas com suspensão de eritrócitos de coelho 2% v/v em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente (25-30°C). A hemólise foi detectada pela absorção a 540nm da hemoglobina liberada. Resultados foram expressos como a média ± DP da porcentagem de hemólise por comparação com controle positivo (hemácias incubadas com água destilada). Ensaio realizado em duplicata. ....55
- Figura 6:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A2 DE SpV E DE SpSM. .56
- Figura 7:** EFEITOS DE SpV E DE SpSM SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS ANESTESIADOS. Alterações induzidas por SpV e por SpSM, após a injeção i.v (300ug de proteína/kg de peso corporal em 100µl de solução salina), sobre (A) PAM (Pressão Arterial Média). e (B) FC (Frequência Cardíaca). Cada coluna é representada pela média ± EPM. \*p<0,05 em comparação com o controle (PBS). bpm: batimentos por minuto, N=3. ....58
- Figura 8:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA E EDEMATOGÊNICA DE SpV E DE SpSM. SpV e SpSM (60µg) foram injetados (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. (A) Edema local, expresso em porcentagem de aumento, quantificado pela diferença entre a espessura da pata antes e após 30min da injeção. (B) Índice de nocicepção, quantificado pelo tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante um período de 30min. O grupo controle (GC)

recebeu PBS estéril. Resultados expressos pela média  $\pm$  EPM. \*<sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado com GC e SpSM respectivamente. N = 3.....59

**Figura 9:** ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE SpV E DE SpSM. Amostras de SpV (A, B e C) e de SpSM (D, E e F) contendo 5, 10 e 20 $\mu$ g, respectivamente, foram submetidas a zimografia utilizando gel de poliacrilamida (8%) contendo 0,1% de gelatina. Após remoção do SDS dos géis com Triton X-100 (2,5% v/v), estes foram incubados em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 por 2 horas a 37°C para a digestão proteica. Os géis foram revelados com azul de Coomassie R-250. ....61

**Figura 10:** DIGESTÃO PROTEOLÍTICA DO FIBRINOGENO POR SpV E SpSM. Amostras de 15 $\mu$ g de fibrinogênio bovino incubadas com 4 $\mu$ g de (A) SpV e de (B) SpSM a 37°C durante: (A) 0h; (B) 2h; (C) 4h; (D) 8h; (E) 12h e (F) 24h. Sistema SDS-Tricina, gel: 10% de poliacrilamida. O gel foi revelado com azul de Coomassie R-250. Marcadores de peso molecular são mostrados a esquerda do gel. ....62

**Figura 11:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DE SpV E DE SpSM. Amostras de SpV (A, B e C) e de SpSM contendo 10, 20 e 30 $\mu$ g respectivamente, foram submetidas a zimografia utilizando gel de poliacrilamida (8%) contendo 10% de ácido hialurônico como substrato incorporado. Após remoção do SDS dos géis com Triton X-100 (2,5% v/v), estes foram incubados em tampão fosfato 0,2M pH 6,0 por 3 horas a 37°C para degradação enzimática. Os géis foram revelados com Alcian Blue. ....63

**Figura 12:** CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL DE SpV E DE SpSM. Perfis cromatográficos bidimensionais de (A) SpV e de (B) SpSM. Cromatografia de filtração em gel (vertical) realizada em coluna Sephacryl S200 HR, equilibrada e eluída com tampão fosfato 10mM, pH 7,6 com 0,4M de NaCl (fluxo de 7,6mL/h, realizada a 4°C). Aliquotas ( $\approx$ 1,0mg) obtidas da filtração em gel foram submetidas a análise por RPC (horizontal), em sistema HPLC, usando coluna Waters Symmetry 300™ C4 5 $\mu$ m equilibrada com 0,1% de solução aquosa de TFA e eluídas utilizando gradiente segmentado até 100% de solução 0,1% de TFA em ACN com fluxo de 0,5mL/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorvância a 280nm para a primeira etapa e a 218nm para a segunda etapa de fracionamento. ....65

**Figura 13:** DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO DA FILTRAÇÃO MOLECULAR. (A) SpV e (B) SpSM. ....66

**Figura 14:** DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DA MASSA MOLECULAR E % DE ACN. (A) SpV e (B) SpSM.....67

**Figura 15:** DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA EM SpV E EM SpSM.....70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2D-LC</b>	Cromatografia líquida bidimensional
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>AMP's</b>	Peptídeos antimicrobianos
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico
<b>COBEA</b>	Comitê Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DHB</b>	Ácido 2-5 dihidróxibenzóico
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal mediana
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GC</b>	Grupo controle
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	Intraplantar
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>m/z</b>	Relação massa/carga
<b>MALDI-TOF/TOF</b>	Ionização/Desorção a Laser assistida por Matriz – Tempo de Vôo/Tempo de Vôo
<b>MCP-1</b>	Proteína tipo 1 quimiotática de monócitos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MS</b>	Espectrometria de Massas
<b>neoVTX</b>	Neoverrucotoxina
<b>NO</b>	Óxido nítrico

<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAMP's</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PAP</b>	Pressão arterial pulsátil
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PRP's</b>	Proteínas de reconhecimento padrão
<b>RPC</b>	Cromatografia de fase reversa
<b>SA</b>	Ácido sinapínico
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SFAV</b>	<i>Stonefish anti-venom</i>
<b>SNTX</b>	Stonustoxina
<b>Sp-CTx</b>	<i>Scorpaena plumieri Cytolytic Toxin</i>
<b>Sp-GP</b>	<i>Scorpaena plumieri Gelatinolytic Protease</i>
<b>SpH</b>	<i>Scorpaena plumieri Hyaluronidase</i>
<b>Sp-Lec</b>	<i>Scorpaena plumieri Lectin</i>
<b>SpSM</b>	<i>Scorpaena plumieri Skin Mucus</i>
<b>SpV</b>	<i>Scorpaena plumieri Venom</i>
<b>SVMP's</b>	<i>Snake Venom Metallo Proteinases</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Temed</b>	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
<b>TFA</b>	Ácido trifluoracético
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Tx4(6-1)</b>	Toxina isolada da peçonha da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>
<b>UI</b>	Unidade internacional
<b>V</b>	Volts
<b>VTX</b>	Verrucotoxina

# **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A pesquisa sobre peçonhas animais

Os animais venenosos encontram-se amplamente difundidos nos diferentes ecossistemas compreendendo mais de cem mil espécies (Calvete *et al.*, 2009). Esses animais apresentam comportamento de ataque e defesa e contam com a produção de substâncias com ação repelente, paralisante ou com outras ações sobre o sistema biológico. Ao longo do processo evolutivo essas substâncias foram se aprimorando a fim de se obter uma maior eficiência.

Em todos os níveis da escala filogenética, os venenos têm evoluído como poderosos arsenais químicos constituídos de substâncias capazes de atordoar, paralisar ou matar outros organismos, sendo encontrados em animais que habitam o ambiente aquático: águas vivas (*Carybdea*), anêmonas (*Bunossoma*) e peixes (*Pterois*, *Scorpaena* e *Synanceja*), como em animais de hábitos terrestres: aranhas (*Latrodectus*), cobras (*Bothrops*, *Crotalus*) e escorpiões (*Tityus*) (McCormick e Meinwald, 1993; Lewis e Garcia, 2003).

Dentre os animais venenosos, encontram-se os peçonhentos, que apresentam um aparelho especializado que se comunica com dentes ocos, ferrões ou agulhões para a inoculação do veneno, por onde este passa ativamente. De forma geral, as peçonhas consistem de uma mistura complexa de substâncias de composição química diversificada e de amplo espectro de ação farmacológica. Dentre estas substâncias, encontram-se enzimas, neurotransmissores, ácidos nucleicos, sais inorgânicos, monoaminas, toxinas proteicas, toxinas não proteicas e outros compostos orgânicos ainda não identificados (Figueiredo, 1995; Mebs, 2002).

As toxinas encontradas em venenos podem interagir com sistemas vitais da presa ou da vítima ocasionando sérias perturbações em sistemas fisiológicos: nervoso central e periférico, cardiovascular, neuromusculares, na coagulação sanguínea, ou seja, na homeostase (Calvete *et al.*, 2009).

Moléculas constituintes de venenos/peçonhas animais têm sido usadas como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos, ocupando lugar de destaque como instrumental na farmacologia contemporânea. As investigações sobre a composição das peçonhas como fonte de produtos farmacêuticos avançaram nas

últimas décadas, após a caracterização de um peptídeo potencializador da bradicinina isolado a partir da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva, 1949), o qual se tornou o protótipo do primeiro anti-hipertensivo comercial pertencente à classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina o Captopril®. Outro exemplo mais recente da utilização de peçonhas para geração de fármacos é o analgésico ziconotide (Prialt®), aprovado em 2004 pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA), que possui ação bloqueadora de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tipo N e foi desenvolvido a partir da toxina  $\omega$ -Conotoxina M-VII-A, isolada do *Conus magus* (McIntosh *et al.*, 1982).

Além disso, toxinas isoladas de peçonhas de animais também têm sido utilizadas como instrumentos para estudos de sistemas fisiológicos, como por exemplo: Tetrodotoxina, um potente bloqueador de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), isolado do peixe da família Tetraodontidae (Ritchie, 1980); Jorotoxina, uma acilpoliamida obtida da peçonha da aranha japonesa *Nephila clavata*, que atua como antagonista de receptores de glutamato (Saito *et al.*, 1985);  $\omega$ -Agatoxina isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, que foi importante na identificação de subtipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Adams *et al.*, 1990; Teramoto *et al.*, 1993); Tx4(6-1), toxina purificada da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, que apresenta atividade inseticida (Figueiredo *et al.*, 1995); e o fator FC-Bj, purificado da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, que é uma serino-protease que apresenta atividades semelhantes à trombina e à calicreína (Zaganelli *et al.*, 1996).

Entretanto, ao compararmos os estudos de peçonhas de animais terrestres com os de animais marinhos, principalmente de peixes, observa-se que estes têm sido largamente ignorados (Church e Hodgson, 2002a; Halstead, 1988; Tan *et al.*, 2003). Isso pode ser justificado: (i) pelo menor interesse epidemiológico para casos de envenenamentos por peixes, por acarretarem um menor número de acidentes, quando comparados com envenenamentos por animais terrestres (Church e Hodgson, 2002a); (ii) pela dificuldade de captura dos espécimes marinhos (Khoo, 2002) e da extração da peçonha (Church e Hodgson, 2002a); (iii) e também pela natureza lábil das biomoléculas presentes nestas peçonhas (Schaeffer *et al.*, 1971; Carrijo *et al.*, 2003). Grande parte das toxinas bioativas das peçonhas de peixes são proteínas termolábeis de alta massa molecular, as quais são mais susceptíveis à desnaturação (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a) e a ação de enzimas

proteolíticas que hidrolisam outras proteínas bioativas presentes na peçonha (Carrijo *et al.*, 2005).

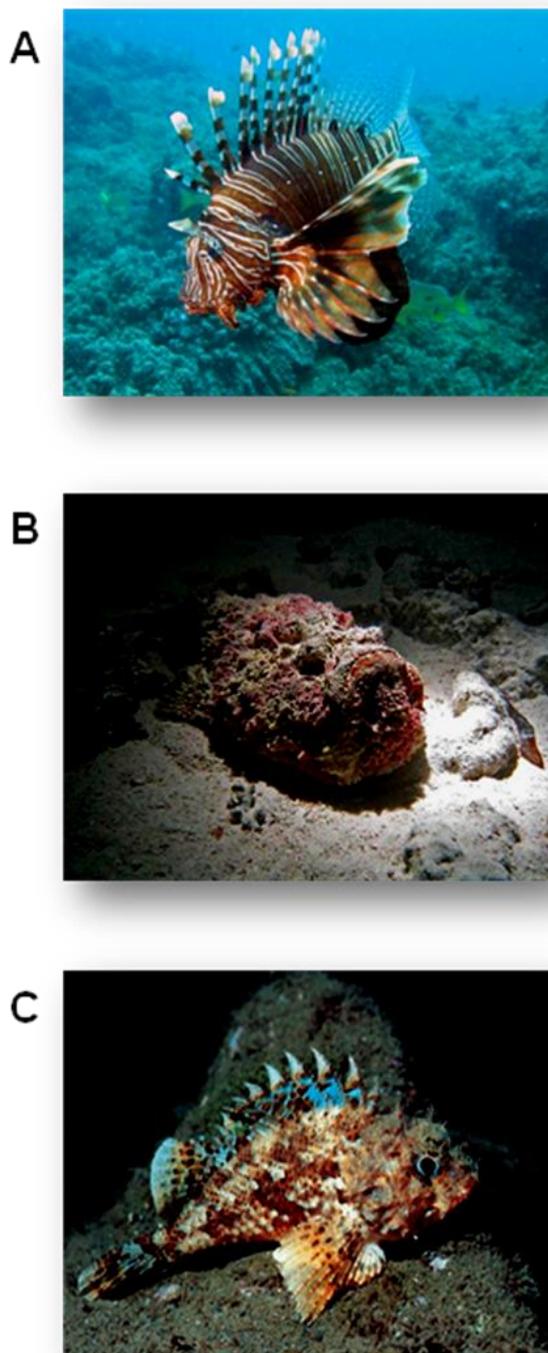
Considerando a falta de informações sobre peçonhas de peixes, estas constituem uma fonte pouco explorada de substâncias bioativas. Além disso, recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que, o muco da pele dos peixes também apresentam moléculas com atividades de interesse farmacológico (Junqueira *et al.*, 2007; Evangelista *et al.*, 2009).

## 1.2 Peixes peçonhentos e o peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

Os peixes peçonhentos encontram-se distribuídos em todo o mundo, e em sua grande parte concentrados em áreas tropicais. Esses peixes tendem a ser extravagantes, com coloração intensa para alertar seus inimigos, ou são especialistas em camuflagem completa, enterrando-se na areia. Eles geralmente nadam lentamente e não apresentam hábitos migratórios (Maretic, 1988). Como exemplo de peixes peçonhentos, têm-se os peixes pedra e escorpião, animais de movimentos lentos, que vivem em águas rasas, em locais protegidos e comumente encontrados em mimetismo com ambientes rochosos e arenosos pelos mares tropicais e temperados de todo o mundo (Russell, 1965; Haddad Jr., 2000). Os hábitos apresentados por estes peixes predispõem a ocorrência de acidentes com humanos (Haddad Jr., 2000).

Em um estudo filogenético, Smith e Wheeler (2006) relatam que mais de 1200 espécies de peixes são venenosos. Este número representa dois terços da população de vertebrados venenosos, e supera o de espécies de serpentes venenosas conhecidas.

Dentre os peixes peçonhentos, os mais perigosos são os pertencentes à família Scorpaenidae, e, de acordo com a morfologia do aparato peçonhento, são classificados em três gêneros principais (figura 1): *Pterois* (peixes-leão), *Synanceja* (peixes-pedra) e *Scorpaena* (peixes-escorpião) (Russell, 1965; Keegan e Macfarlane, 1963), os quais podem ser considerados como subfamílias: Pteroinae, Synanceinae e Scorpaeninae (Eschmeyer, 1998). Os peixes-leão e os peixes-pedra (dos gêneros *Pterois* e *Synanceja* respectivamente) são encontrados na região Indo-Pacífica, não ocorrendo no Oceano Atlântico (Haddad Jr. *et al.*, 2003). No Brasil são encontradas espécies de oito gêneros da família Scorpaenidae (Nomura, 1984;



**Figura 1:** ESPÉCIMES REPRESENTANTES DOS PRINCIPAIS GÊNEROS DE PEIXES PEÇONHENTOS DA FAMÍLIA Scorpanidae. (A) *Pterois* (peixes-leão) (B) *Synanceja* (peixes-pedra) e (C) *Scorpaena* (peixes-escorpião). Fontes: (A) Mário Lins, 2013, (B) Extremamente Curioso, 2013 e (C) Naval, 2013.

Carvalho-Filho,1999), sendo que somente peixes do gênero *Scorpaena* estão associados com envenenamentos em seres humanos (Haddad Jr., 2000). Segundo Figueiredo e Menezes (1980), as espécies do gênero *Scorpaena* encontradas na costa brasileira são:

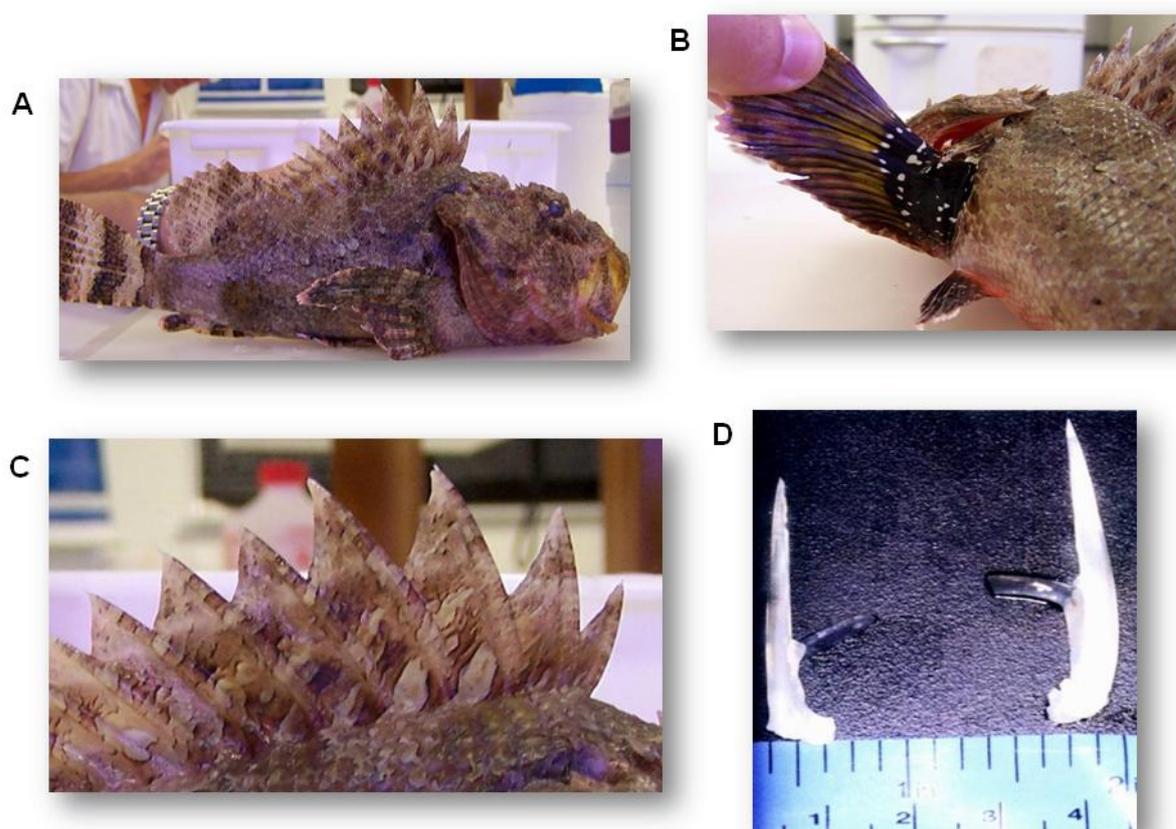
- *S. plumieri* Bloch, 1789;
- *S. brasiliensis* Cuvier, 1829;
- *S. grandicornis* Cuvier e Valenciennes, 1829;
- *S. isthmensis* Meek e Hildebrand, 1928;
- *S. dispar* Longley e Hildebrand, 1940

O aparato peçonhento desses animais é constituído por espinhos localizados nas nadadeiras dorsais (11-13 espinhos), pélvicas (2), e anais (3) (Russell, 1965). De forma geral os espinhos são constituídos de uma estrutura óssea rígida envolvidos por uma bainha tegumentar, entretanto, apresentam particularidades para cada gênero. Na base de cada um dos espinhos encontram o tecido glandular produtor da peçonha (Russel, 1965) (figura 2). Uma película de muco, que recobre todo o corpo desses animais, muitas vezes recobre também os espinhos (Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2011).

Embora os acidentes envolvendo os peixes peçonhentos sejam considerados graves, surpreende-se que poucos estudos tenham sido focados em amenizar ou reverter os sinais e sintomas apresentados nos envenenamentos (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998), dado as ameaças à saúde que as peçonhas desses animais apresentam (Smith e Wheeler, 2006). O envenenamento em humanos, em geral, ocorre por pressão mecânica ao pisar ou tocar nos espinhos do peixe. Ao se sentir ameaçado o peixe eriça seus espinhos dorsais e estes perfuram a pele da vítima, causando o rompimento e/ou afastamento da bainha tegumentar que envolve o espinho, liberando a peçonha para o interior do ferimento (Russell, 1965).

A sintomatologia do envenenamento por peixes peçonhentos é desproporcional ao tamanho da lesão. A gravidade depende do número e tipo de espinhos envolvidos, espécie, grau de liberação do veneno, e de fatores relacionados à vítima como idade e estado de saúde (Auerbach, 1987).

Embora o número de casos de morte de humanos causado por acidentes com peixes peçonhentos seja pequeno, a maior parte da injúria causada pode levar a



**Figura 2:** PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri* E SEU APARATO PEÇONHENTO. (A) Vista lateral do espécime. (B) Coloração e manchas da região axilar característica da espécie. (C) Espinhos dorsais e membrana tegumentar. (D) Espinhos dissecados mostrando o tecido cinzento no qual se encontram as glândulas produtoras da peçonha. Fonte: (A), (B) e (C), Cassoli, 2008, (D), Haddad Jr., 2000.

diferentes graus de morbidade. As manifestações clínicas dos acidentes com peixes peçonhentos são majoritariamente locais, e inclui dor, edema, eritema e em alguns casos, necrose; entretanto, as manifestações sistêmicas como desordens cardiorrespiratórias são observadas principalmente em acidentes envolvendo peixes da família Scorpaenidae (Figueiredo *et al.*, 2009).

Magalhães e colaboradores (2006) observaram experimentalmente que quando os venenos das arraias *Potamotrygon* cf. *scobina* e *Potamotrygon* gr. *orbigny* eram injetados em conjunto com a secreção de muco da pele na pata de camundongos, a atividade necrotizante foi mais vigorosa do que quando somente o veneno foi injetado. Esta observação demonstra que componentes do muco da pele desses peixes sinergizam o efeito de toxinas presentes no veneno. Entretanto essas ações ainda permanecem pouco investigadas (Ramos *et al.*, 2012).

O Brasil, com sua ampla faixa costeira de aproximadamente 7.400km de extensão, apresenta uma rica diversidade de fauna marinha, com grande número de animais potencialmente perigosos. Associado a isso, o clima tropical propicia grande frequência de banhistas nas praias, a pesca comercial/esportiva e o mergulho autônomo, favorecendo a ocorrência de vários acidentes com humanos envolvendo peixes peçonhentos (Mondin, 2007). Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil, com destaque para as arraias, bagres, niquim e os peixes-escorpião, sendo estes últimos os que mais comumente estão relacionados com os acidentes (Haddad Jr., 2003).

Haddad Jr. e colaboradores (2003) relataram as manifestações clínicas locais e sistêmicas de acidentes em humanos com o peixe-escorpião *S. plumieri*. Dentre os sintomas, incluem-se: dor intensa e irradiada, adenopatia precoce na raiz do membro afetado, edema, eritema, náuseas, vômitos, febre, agitação, mal-estar, sudorese, diarreia, taquicardia, arritmias e hipotensão arterial (Haddad Jr., 2000), não havendo relatos de casos de óbitos.

No que diz respeito às estratégias terapêuticas dos acidentes com peixes peçonhentos, geralmente o protocolo de tratamento das vítimas é apenas paliativo e sintomático e alguns dos efeitos locais são aliviados pela imersão do membro afetado em água quente, não escaldante. As vezes faz-se o uso de infiltrações anestésicas ou mesmo de opiáceos, resultando em ligeira diminuição dos sintomas (Haddad Jr. *et al.*, 2003; Haddad Jr., 2000).

O único soro disponível comercialmente para envenenamentos por peixes é o produzido para o peixe-pedra da região Indo-Pacífica, *Synanceja trachynis*, (SFAV, Stonefish Antivenom, produzido pela empresa australiana Commonwealth Serum Laboratories - Melbourne Austrália). O SFAV é capaz de neutralizar a atividade hemolítica, letal e/ou cardiovascular de *Synanceja verrucosa* (Shiomi *et al.*, 1989) assim como de peixes pertencentes a outros gêneros como o *Pterois*, *Dendrochirus*, *Inimicuse* e *Gymnapistes* (Shiomi *et al.*, 1989; Church e Hodgson, 2002b, 2003). Em estudo recente (Gomes *et al.*, 2011) observou-se a capacidade de SFAV em neutralizar as atividades inflamatórias e cardiovasculares induzidas pelo veneno do peixe-escorpião *S. plumieri* pertencente ao gênero *Scorpaena*.

### 1.3 Caracterização das peçonhas de peixes

Conforme descrito anteriormente, as peçonhas animais contém uma grande variedade de toxinas com ação fisiológica, com afinidade elevada o suficiente para provocar a imobilização ou a morte da presa ou do predador (Sivan, 2009). Assim como as peçonhas dos animais terrestres, as de peixes apresentam uma enorme diversidade estrutural e farmacológica (Conceição *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Russell, 1971; Smith e Wheeler, 2006).

As peçonhas de peixes possuem características químicas e farmacológicas sensivelmente diferentes daquelas observadas em animais terrestres (Russell, 1996), mas compartilham entre si similaridades importantes. Estudos sobre as propriedades das peçonhas de peixes demonstram uma gama de atividades farmacológicas/fisiológicas (cardiovascular, hemolítica/citolítica, inflamatória, tóxica e letal) e a presença de enzimas, proteínas, peptídeos, aminas biogênicas e outras substâncias desconhecidas (Conceição *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Russell, 1971; Smith e Wheeler, 2006).

Com relação aos efeitos locais em humanos, os sinais e sintomas do envenenamento são consideravelmente semelhantes, principalmente os relacionados à dor (Sutherland e Tibballs, 2001).

Estudos de peçonhas de peixes da família Scorpaenidae têm sido focados principalmente nas espécies *Pterois volitans* (peixes-leão) (Saunders e Taylor, 1959; Choromanski *et al.*, 1984; Nair *et al.*, 1985; Cohen e Olek, 1989; Elston, 2006; Kiriake e Shiomi, 2011) e *Synanceja horrida*, *Synanceja trachynis* (atualmente

classificado com *S. horrida*), *Synanceja verrucosa* (peixes-pedra) e *Thalassophryne nattereri* niquim ou miquim (peixe-sapo) (Saunders e Taylor, 1959; Poh *et al.*, 1991; Kreger *et al.*, 1993; Hopkins *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1995; Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Magalhães *et al.*, 2006; Pareja-Santos *et al.*, 2009).

Poucos estudos têm sido realizados com a peçonha de peixes-escorpião. Carlson e colaboradores (1971) descrevem o efeito cardiovascular e letal da peçonha do peixe-escorpião californiano *Scorpaena guttata*. Estudos realizados com a peçonha do peixe escorpião brasileiro *S. plumieri* demonstraram sua natureza principalmente protéica, atividade letal (DL<sub>50</sub> i.v. 0,28mg/kg em camundongos), hemolítica/citolítica (formadora de poros), cardiovascular, inflamatória, inibitória de integrinas e enzimáticas (Carrijo *et al.*, 2005; Evangelista *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Andrich *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2012, Gomes *et al.*, 2013).

Apesar das varias atividades farmacológicas induzidas por peçonhas de peixes, estudos dedicados ao isolamento de toxinas bioativas responsáveis por estes efeitos são escassos (para revisão ver Figueiredo *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Atividade cardiovascular

Uma das mais pronunciadas e potentes características farmacológicas do envenenamento por peixes peçonhentos são sobre o sistema cardiovascular. As respostas cardiovasculares evocadas parecem resultar, ao menos em parte, da ação direta e/ou indireta dos componentes da peçonha sobre receptores adrenérgicos e/ou muscarínicos (para revisão ver Church e Hodgson, 2002a). Entretanto, a resposta contrátil induzida pelas peçonhas de *Heteropneustes fossilis* e *Plotosus caninus* em diferentes tipos de musculaturas lisas, parece envolver prostaglandinas (Auddy *et al.*, 1994).

Embora as atividades cardiovasculares induzidas por venenos de peixes variem entre estudos, algumas destas atividades são semelhantes para todas as espécies (para revisão ver, Church e Hodgson, 2002a). As peçonhas de peixes testadas em preparações cardíacas apresentam uma combinação de efeitos ionotrópicos positivos e negativos por atividade direta ou indireta em adrenoreceptores. Respostas envolvendo receptores muscarínicos também foram observadas (Church e Hodgson, 2002a).

Quando administradas *in vivo*, as peçonhas produzem uma resposta bifásica, consistindo de uma hipotensão, as quais são devido à vasodilatação periférica, e uma resposta hipertensora, mediada por diferentes mecanismos (Carlson *et al.*, 1973; Hopkins e Hodgson, 1998a,b). Esses efeitos foram observados em estudos com a peçonha do peixe-escorpião *S. guttata* (Carlson *et al.*, 1971), do peixe-soldado *Gymnapistes marmoratus* (Hopkins e Hodgson, 1998b), do peixe-pedra *S. trachynis* e do peixe-leão *P. volitans* (Church e Hodgson, 2002b). Gomes e colaboradores em 2010 demonstraram que o veneno de *S. plumieri* induz vasoconstrição coronariana, efeito cronotrópico, lusitrópico e ionotrópico positivo em corações isolados de ratos.

Além dos efeitos sobre o músculo cardíaco, as peçonhas de peixes também afetam a função de vasos sanguíneos, produzem resposta contrátil e vasodilatadora, independente e dependente do endotélio, respectivamente, e tem sido demonstrado que a síntese de óxido nítrico (NO) pode estar envolvida na vasodilatação induzida por essas peçonhas (Church e Hodgson, 2002b).

### 1.3.2 Atividade hemolítica e citotóxica

Quase todas as peçonhas de peixes exibem atividade hemolítica. Devido à importância das células sanguíneas na homeostase, elas constituem um alvo importante de diversas toxinas (Sivan, 2009). O forte efeito hemolítico sobre eritrócitos tem sido demonstrado *in vitro* para várias peçonhas de peixes, como por exemplo, as peçonhas de *S. trachynis* (Kreger, 1991), *S. horrida* (Poh *et al.*, 1991), *S. verrucosa* (Garnier *et al.*, 1995), *Trachinus draco* (Chhatwal e Dreyer, 1992b), *T. nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998, 2001), *S. guttata* (Carlson *et al.*, 1971) e *S. plumieri* (Carrijo *et al.*, 2005).

Essa atividade tem sido estudada em eritrócitos de diferentes animais (Poh *et al.*, 1991), apresentando alta seletividade para eritrócitos de coelho. Fraca atividade hemolítica foi observada para eritrócitos de camundongos, gatos e cabras e eritrócitos de humanos porcos e galinhas são resistentes à hemólise (Shiomi *et al.*, 1989; Kreger, 1991; Chhatwal e Dreyer, 1992a).

Tem sido sugerida que a atividade hemolítica/citolítica destes venenos é direta sobre as membranas celulares, devido à ausência de atividade fosfolipásica  $A_2$  nas peçonhas de peixes (Shiomi *et al.*, 1989; Khoo *et al.*, 1992; Hopkins *et al.*,

1994; Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Hopkins e Hodgson, 1998a; Hahn e O'Connor, 2000; Sivan *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2009).

Além do efeito hemolítico sobre eritrócitos, algumas peçonhas de peixes são capazes de induzir efeito citolítico/citotóxico sobre outros tipos celulares, particularmente sobre células musculares (Lopes-Ferreira *et al.*, 2001) e tumorais (Fahim *et al.*, 1996; Soprani, 2008).

Foi demonstrado que a peçonha de *S. plumieri* possui potente efeito antitumoral em células cultivadas de glioblastoma murino (RT2) e células tumorais ascíticas de Ehrlich (Soprani, 2008). Observou-se que a peçonha de *S. plumieri* reduz significativamente o metabolismo celular e induz alterações morfológicas, tais como a redução do volume citoplasmático e formato celular arredondado, sendo essas alterações indicativas de lesão celular. A peçonha também inibiu a adesão e proliferação celular. Esses resultados sugerem que o efeito antitumoral desencadeado pela peçonha do peixe-escorpião seja mediado pela indução de apoptose (Soprani, 2008).

### 1.3.3 Atividade inflamatória

Uma das manifestações fisiopatológicas mais comuns que os acidentados apresentam após o envenenamento envolvendo peixes peçonhentos, é a resposta inflamatória local (Sivan, 2009) caracterizada clinicamente por dor e edema. Essas ações são dependentes de um sinergismo entre os mediadores envolvidos, aumentando a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo local (Brain e Williams, 1985).

Lima *et al.*, (2003) e Lopes-Ferreira *et al.*, (2004), demonstraram que a peçonha de *Thalassophryne nattereri* induziu uma resposta inflamatória local aguda, dose-dependente, com liberação local de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e esta resposta foi resistente aos anti-inflamatórios convencionais (indometacina e a dexametasona). Porém, foi observado que os sintomas inflamatórios (dor e edema) foram reduzidos com a utilização de um inibidor da calicreína tecidual, demonstrando o envolvimento da atividade semelhante à calicreína nesta resposta. Conforme sugerido por Lopes-Ferreira *et al.*, (2004), esta última observação deve ser levada em consideração para tratamentos efetivos em acidentes com humanos. Resposta inflamatória semelhante à induzida por *T. nattereri* foi descrita no

envenenamento pelo peixe-gato *Cathorops spixii*, e os dois tipos de componentes de defesa presentes nessa espécie (muco da pele e o veneno do espinho) possuem capacidades diferentes de provocar reações inflamatórias em camundongos (Junqueira *et al.*, 2007). Esses autores demonstraram que a resposta inflamatória induz a infiltração de neutrófilos e macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos.

A atividade inflamatória dos venenos dos peixes *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi*, descrita por Magalhães e colaboradores (2006), demonstra que o envenenamento por esses peixes também induz respostas edematogênica e nociceptiva, apresentando aumento da infiltração leucocitária e de células aderentes ao endotélio do músculo cremaster após a aplicação do veneno.

#### 1.3.4 Atividades enzimáticas

Peçonhas de peixes, de forma semelhante à de animais terrestres, contêm uma variedade de atividades enzimáticas (Shiomi *et al.*, 1989; Hopkins e Hodgson, 1998b).

Existem várias razões para a presença de enzimas em peçonhas animais, estas podem estar envolvidas no processamento de toxinas do próprio veneno, aumentando a permeabilidade tecidual ou facilitando a difusão da peçonha (Faiz *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2002). Além disso, as enzimas podem ser responsáveis por algumas atividades patológicas, contribuindo para os efeitos locais e/ou sistêmicos observados nos envenenamentos.

As manifestações locais apresentadas no sítio de introdução do veneno, como dor intensa, edema, eritema e necrose sugerem a degradação de proteínas e glicosaminoglicanos da matriz extracelular de tecidos conectivos em torno de vasos sanguíneos e capilares. Estas manifestações podem estar associadas com a presença de proteases e outras enzimas (hialuronidases) nesses venenos, sendo estas consideradas importantes “fatores de dispersão” potencializando a toxicidade do veneno.

#### 1.3.5 Hialuronidases

As hialuronidases consistem em um grupo de enzimas que hidrolisam principalmente o ácido hialurônico, e em alguns casos, a condroitina, os quais são componentes da matriz extracelular (MEC) de vertebrados. Estas enzimas estão largamente distribuídas em uma diversidade de organismos, incluindo vários animais venenosos e peçonhentos, tais como cobras, lagartos, peixes, escorpiões, aranhas e abelhas (Kreil, 1995).

Embora as hialuronidases isoladas a partir de venenos e peçonhas de animais não são consideradas toxinas, elas atuam facilitando a difusão de toxinas nos tecidos da vítima ou presa devido ao efeito degradante da MEC, aumentando assim, os efeitos das toxinas presentes nos venenos e peçonhas (Girish *et al.*, 2004).

Atividade hialuronidásica em peçonhas animais foi descrita pela primeira vez para as aranhas *Lycosa raptorial* e *Ctenus nigriventer* (*Phoneutria nigriventer*), por Kaiser, (1956). Esta atividade também foi descrita nas peçonhas de varias espécies da aranha *Loxocoles* (Young e Pincus, 2001, Barbaro *et al.*, 2005, Silveira *et al.*, 2007).

As hialuronidases mais estudadas de peçonhas animais são as de serpentes, as quais já foram detectadas para as famílias Elapidae, Viperidae e Crotalidae. Girish *et al.* (2004), descreveram que os efeitos sistêmicos provocados pelo envenenamento por serpentes, dependem da concentração e da taxa de difusão de toxinas para a circulação sistêmica, os quais são precedidos de dano tecidual.

Atividade hialuronidásica em peçonhas de animais marinhos foi descrita pela primeira vez por Austin *et al.* (1965) na peçonha do peixe-pedra *Synanceja horrida*. Posteriormente em peçonhas de duas espécies de arraias de água doce *Potamotrygon falkneri* (Haddad *et al.*, 2004; Barbaro *et al.*, 2007) e *Potamotrygon motoro* (Magalhães *et al.*, 2008), e em espécies de peixe-pedra, *Synanceja trachynis* (Hopkins e Hodgson, 1998a) e *Synanceia verrucosa* (Austin *et al.*, 1965; Shiomi *et al.*, 1993; Garnier *et al.*, 1995; Madakoro *et al.*, 2011).

O potencial terapêutico das hialuronidases está relacionado ao seu efeito biológico mais pronunciado, que é o aumento da permeabilidade tecidual. Estudos farmacocinéticos mostraram que, a aplicação simultânea de hialuronidases com certas drogas aumenta a velocidade de absorção e diminui o desconforto causado pela aplicação (Menzel e Farr, 1998).

Tem sido demonstrado que a permeabilidade dos vasos capilares a drogas, o efeito terapêutico da vimblastina no tratamento do sarcoma de Kaposi, a passagem de antibióticos da circulação para o líquido sinovial e a biodisponibilidade sistêmica de proteínas como o interferon  $\alpha_2$  aumentam quando administradas juntamente com hialuronidases (Smith *et al.*, 1997).

Além disso, as hialuronidases têm sido empregadas com sucesso em terapias que utilizam o extravasamento tecidual através da injeção de microesferas contendo hialuronidases (Menzel e Farr, 1998). As microesferas são preparadas por emulsão água/óleo, empregando albumina ou gelatina, como polímeros naturais. As hialuronidases são incorporadas a esses polímeros por ligações cruzadas, obtendo-se microesferas com hialuronidases com atividade preservada (Menzel e Farr, 1998)

#### 1.3.6 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como amida-hidrolases, realizam hidrólise de ligações peptídicas e são conhecidas como peptidases ou proteases (Barrett *et al.*, 2003). As proteases são classificadas em quatro grupos: serino, metalo, cisteíno e aspartil proteases, as quais diferem entre si na estrutura do aparato catalítico e no mecanismo de ação (Antonov, 1993).

Proteases são amplamente distribuídas em organismos vivos, onde apresentam uma diversidade de funções: regulam o destino, localização e atividade de proteínas, modulam interações proteína-proteína, criam novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento de informações celulares e geram transdução e amplificação de sinais moleculares.

O entendimento dos processos de regulação da função de proteases e das características de especificidade peculiares de seus substratos é essencial para desvendar os mecanismos fisiológicos e patológicos, nos quais estas estão envolvidas, o que pode levar ao desenvolvimento de novas terapias. Várias pesquisas têm sido realizadas visando o desenvolvimento de inibidores efetivos de proteases, os quais são possíveis agentes terapêuticos. Além disso, os inibidores também podem ser utilizados como instrumentos para o entendimento a nível molecular de diversas patologias, onde essas enzimas possuem atividade crucial (Castro *et al.*, 2011). Essas enzimas são consideradas importantes instrumentos da indústria biotecnológica, devido à sua utilidade como agentes bioquímicos ou na

fabricação de produtos diversos (Saeki *et al.*, 2007), aplicáveis a medicina, agricultura, nutrição e a outras tecnologias (Barret *et al.*, 2004).

Proteases são amplamente distribuídas nos venenos de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (Nakar *et al.*, 1986; Faiz *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998). Já foram relatadas enzimas proteolíticas que aumentam a permeabilidade do tecido alvo a outros componentes do veneno, degradam oligopeptídeos, neurotransmissores e neuromoduladores, apresentam atividade hemorrágica e colagenolítica (Tan e Ponnudurai, 1992; Faiz *et al.*, 1996; Kamiguti *et al.*, 1996), fibrinogenolítica (Pandya *et al.*, 1983; Siigur *et al.*, 1991; Samel *et al.*, 2002) e efeitos inibidores e ativadores da trombose e hemostase (Zaganelli *et al.*, 1996; Markland *et al.*, 1998; Jagadeesha *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2002).

Proteases que clivam ligações peptídicas na molécula de fibrinogênio, provocando coagulabilidade ou incoagulabilidade sanguínea, também são frequentemente encontradas em venenos de serpentes. A maioria das proteases de peçonhas de serpentes é do tipo serino e metaloproteases, existindo apenas poucas evidências da presença de cisteíno e aspartato-proteases (Felicori *et al.*, 2003).

Duas serino proteases de natureza glicoproteica, foram isoladas da peçonha da surucucu *Lachesis muta muta*, a primeira possui a propriedade de ativar indiretamente o plasminogênio a plasmina, através da formação de um complexo molecular conhecido como ativador de plasminogênio (Sanchez *et al.*, 2000); a segunda possui atividade semelhante à calicreína, liberando bradiginina a partir de cininogênio, causando queda na pressão arterial em ratos experimentais (Felicori *et al.*, 2003).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (Snake Venom Metallo Proteinases - SVMP's) são enzimas envolvidas nos efeitos tóxicos observados nos envenenamentos humanos (Bjarnason e Fox, 1994, 1995), e mais de 100 SVMP's já foram purificadas. A maioria destas metaloproteases provoca hemorragia (Bjarnason e Fox, 1995), e algumas destas têm a habilidade de hidrolisar componentes proteicos da MEC como fibronectina, enactina, laminina e colágeno tipo IV, e gelatina desnaturada (Baramova *et al.*, 1989; Bjarnason e Fox, 1995).

Em venenos de aranhas, encontram-se proteases com atividade colagenolítica (Kaiser e Raab, 1967). No veneno da aranha marrom *Loxocles intermedia* foram detectadas metaloproteases com atividades fibrinectinolíticas, fibrinogenolíticas e gelatinolíticas. As proteases de aranhas têm sido relatadas como

causadoras de dermonecrose no local da picada, disseminadoras de coagulação intravascular e de agregação de plaquetas, além da ação hemolítica (Feitosa *et al.*, 1998).

Pouco se conhece sobre proteases de peçonhas de animais marinhos. A presença de proteases foi relatada em algumas espécies de peixes, como em arraias (Haddad Jr. *et al.*, 2004), niquim (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998) e para peixes-pedra (Khoo *et al.*, 1992; Gwee *et al.*, 1994; Garnier *et al.*, 1995).

Algumas atividades enzimáticas têm sido descritas em diversas peçonhas de peixes, como a gelatinolítica e caseinolítica em *P. falkneti* (Haddad *et al.*, 2004) e *T. maculosa* (Sosa-Rosales *et al.*, 2005). Enzimas aminopeptidásicas foram detectadas na peçonha de peixe-pedra *S. verrucosa* (Garnier *et al.*, 1995) e semelhantes à trombina no peixe-pedra *S. horrida* (Khoo *et al.*, 1992).

Apesar da presença de proteases ter sido relatada na peçonha de alguns peixes (Khoo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1995; Carrijo *et al.*, 2003; Haddad Jr. *et al.*, 2004), somente algumas enzimas foram isoladas e caracterizadas química e farmacologicamente a partir dessas peçonhas. A protease com atividade gelatinolítica (Sp-GP– *Scorpaena plumieri* Gelatinolytic Protease) foi a primeira isolada de peçonha de peixe (Carrijo *et al.*, 2005). Uma nova classe de proteínas semelhantes à calicreína, as Natterinas, foram isoladas da peçonha do peixe *T. nattereri* (Magalhães *et al.*, 2005).

O estudo sistemático de proteases que compõem peçonhas animais tem contribuído para a compreensão a nível molecular dos mecanismos que envolvem a ação destas toxinas.

#### 1.4 Caracterização do muco da pele de peixes

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que além da peçonha (veneno produzido por um tecido glandular), o muco que recobre o corpo de peixes também apresenta moléculas com atividade de interesse farmacológico.

A pele de peixes não possui um extrato córneo, sendo composta de células vivas, portanto, a epiderme está susceptível ao ataque direto de patógenos (Tsutsui *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2003). Como sistema de proteção primário, a pele é revestida por uma camada de muco, que é secretado pelas células caliciformes da epiderme (Harris e Hunt, 1975; Alexander *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 2003). As suas

propriedades funcionais são dependentes da capacidade em formar um gel na superfície epitelial (Bragadeeswaran e Thangaraj, 2011). Outros mecanismos também estão envolvidos na produção de componentes do muco, incluindo possivelmente a transferência de substâncias bioativas a partir do sistema circulatório (Easy e Ross, 2009). De acordo com Ellis (1981), o muco que recobre a camada epitelial da pele do peixe é considerado um componente chave do seu mecanismo inato de defesa.

O muco constitui uma barreira mecânica e bioquímica entre a superfície do corpo do peixe e a água circundante do ambiente, a qual apresenta abundante diversidade de microrganismos incluindo os patogênicos (Pickering, 1974; Tsutsui *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012). Além disso, apresentam funções lubrificantes, de locomoção, papéis importantes na formação de cardumes, reconhecimento de indivíduos e até na migração de determinadas espécies (Hara e McDonald, 1976). O papel de defesa química contra predadores, também tem sido atribuído ao muco de inúmeras famílias de peixes (Ostracidae, Grammistidae, Soleidae e Siluridae) (Hashimoto e Oshima, 1972; Bond, 1979; Clark e George, 1979; Goldberg *et al.*, 1982; Tachibana, 1984), com atividade repelente ou incapacitante para outros animais marinhos (Klaassen e Watkins, 1999).

No muco, têm sido detectados várias macromoléculas, dentre elas moléculas de defesa humorais tais como imunoglobulinas tipo M (IgM), complemento, aglutininas (lectinas), juntamente com fatores do sistema imune adquirido (Hjelmeland, 1983; Alvarez-Pellitero, 2008), proteína C reativa, anidrase carbônica, calmodulina, hemolisinas, glicopeptídeos, glicolipídeos, peptídeos antimicrobianos (lisosima) e principalmente proteases (Ingram, 1980; Hjelmeland, 1983; Alexander and Ingram, 1992; Yano, 1996; Fast *et al.*, 2002; Birkemo *et al.*, 2003; Whyte, 2007; Palaksha *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Klesius *et al.*, 2008).

Os principais componentes macromoleculares do muco são as glicoproteínas, dentre elas as mucinas são as principais (Phillipson *et al.*, 2008). Estas proteínas são fortemente glicosiladas o que confere às camadas mucosas propriedades viscoelásticas e reológicas (Thornton *et al.*, 2008).

Membros de algumas famílias de peptídeos antimicrobianos (AMP's) foram encontrados como sendo importantes componentes de defesa inatos no muco de diferentes espécies; solha de Moisés (*Pardachirus marmoratus*), solha do inverno (*Pleuronectes americanus*) e o bagre (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Oren e Shai, 1996;

Cole *et al.*, 2000 e Su, 2011). Entretanto as funções biológicas específicas dos peptídeos do muco da pele permanecem não totalmente esclarecidas (Conlon *et al.*, 2009).

O papel antiviral do muco foi recentemente descrito por Rajan e colaboradores (2011). Estes autores, utilizando técnicas de bioimagem mostraram que o vírus *Koi herpes* se liga a superfície da pele nos locais onde o muco foi removido manualmente, o que sugere que uma superfície mucosa intacta é a defesa do hospedeiro contra a infecção.

As lectinas, definidas como proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos (Sharon e Lis, 1972; Sharon, 1993), também podem ser encontradas nas secreções da pele de peixes (Suzuki *et al.*, 2003). O ambiente aquático apresenta considerável diversidade de microrganismos patogênicos, por conseguinte, é provável que diferentes tipos de lectinas, agindo como proteínas de reconhecimento padrão (PRP's), estejam presentes na mucosa da pele de várias espécies de peixes. (Tsutsui *et al.*, 2009). No sistema de auto-defesa, as lectinas desempenham um importante papel, agindo como PRP's que se ligam aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) com desencadeamento de respostas celulares e humorais (Tsutsui *et al.*, 2009). Acredita-se que medeiam a imunidade inata pela ligação específica a sacarídeos da superfície de microrganismos patogênicos (Tsutsui *et al.*, 2011). De fato, algumas lectinas do muco da pele de peixes aglutinam bactérias (Kamiya e Shimizu, 1980) favorecendo a sua absorção pela captação fagocitária de macrófagos (Nakamura *et al.*, 2006).

Uma lectina tipo B denominada Plumieribetin, que inibe a ligação da integrina  $\alpha 1\beta 1$  ao seu correspondente na matriz extracelular (colágeno tipo IV), foi isolada tanto da peçonha quanto do muco da pele de *S. plumieri* por nosso grupo de pesquisa (Evangelista *et al.*, 2009). Devido ao envolvimento de integrinas com vários processos fisiológicos (angiogênese, agregação plaquetária e integridade da pele, rim e pulmões) estas moléculas são consideradas alvos importantes para tratamento de várias doenças, e o seu papel no sistema de defesa não pode ser descartado.

Várias proteases têm sido encontradas no muco de peixes (Firth *et al.*, 2000; Salles *et al.*, 2007) e a sua atividade proteolítica no âmbito da pele de peixes pode ser considerada um mecanismo fundamental na defesa primária. Uma atividade proteásica aumentada foi observada para o muco da pele do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em exemplares infectados com o piolho de salmão *Lepeophtheirus*

*salmonis*, quando comparados aos não infectados (Ross *et al.*, 2000). As proteases podem ter um efeito direto sobre os agentes patogênicos no muco (Hjelmeland *et al.*, 1983), ou poderiam ativar outras substâncias imunológicas presentes no muco, tal como demonstrado em sistemas de mamíferos (Morrissey, 1998).

As informações descritas acima demonstram o potencial da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião brasileiro *S. plumieri* como fonte de novas moléculas e nos motivaram a realizar uma prospecção inicial de atividades e moléculas bioativas nesses venenos.

O objetivo deste trabalho foi dar continuidade ao estudo da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*, considerado um dos mais venenosos da costa brasileira, que vem sendo realizado pelo nosso grupo de pesquisa na Universidade Federal do Espírito Santo, e iniciar a caracterização farmacológica e bioquímica do muco da pele deste peixe, a qual nunca foi explorada. Esta análise visa desvendar a complexa composição destes dois venenos e comparar suas atividades fisió/farmacológicas, o que poderá levar a identificação de moléculas que apresentem interesse químico/terapêutico, as quais podem ser utilizadas como protótipo para desenvolvimento de drogas de interesse farmacêutico/clínico e/ou ao entendimento das manifestações clínicas do envenenamento para condução de terapias efetivas.

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar comparativamente as propriedades farmacológicas e bioquímicas do muco da pele com aquelas já descritas para a peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Investigação das atividades farmacológicas da peçonha e do muco da pele de *S. plumieri*:

- Atividade hemorrágica;
- Atividade citolítica;
- Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>;
- Atividade cardiovascular;
- Atividade inflamatória;

2. Investigação das atividades bioquímicas da peçonha e do muco da pele de *S. plumieri*:

- Atividade gelatinolítica;
- Atividade fibrinogenolítica;
- Atividade hialuronidásica;
- Atividade hemaglutinante;

3. Análise proteômica parcial da peçonha e do muco da pele de *S. plumieri*:

Análise parcial da composição proteica do muco da pele e da peçonha de *S. plumieri* utilizando a abordagem 2D-LC-MS (separação das proteínas utilizando cromatografia de filtração em gel convencional, seguida por cromatografia de fase reversa das frações da gel filtração utilizando HPLC e posterior análise das frações da fase reversa por espectrometria de massa MALDI-TOF).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, procedente da Merck, Sigma, Bio-Rad, GE e Dinâmica. Os reagentes utilizados nas cromatografias foram de grau HPLC procedentes da Merck, Tedia e J. T. Baker. A resina Sephacryl S200 HR e a coluna de fase reversa Symmetry 300™ C4 5µm foram adquiridas da Waters e da GE Life Sciences respectivamente. As soluções foram preparadas em água purificada em sistema Milli-Q.

### 3.2 Animais

Os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos respeitando-se as normas de proteção, de acordo com o recomendado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o número 005/2009 para ratos e sob o número 105/2011 para camundongos.

Foram utilizados exemplares selvagens de peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* capturados por mergulhadores licenciados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) com auxílio de um puçá manual. A captura foi realizada em locais de águas rasas, próximos a rochas e recifes de coral situados no litoral do município de Fundão, no estado do Espírito Santo. Os espécimes foram mantidos em aquário com água marinha e suprimento adequado de oxigênio e alimento até sua identificação e posterior extração da peçonha bruta e do muco da pele. A identificação dos exemplares animais foi feita pela visualização de manchas brancas sobre a coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie (figura 2B), conforme descrito por Figueiredo e Menezes, (1980).

Os bioensaios utilizaram ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 250 e 300g, com aproximadamente três meses de idade e, camundongos machos da linhagem Swiss, com peso entre 20 e 25g, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) localizado no Centro de Ciências da

Saúde (CCS). Os animais foram mantidos em gaiolas de dimensões apropriadas com água e ração *ad libitum* em ambientes com controle de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 em 12 horas).

O sangue do coelho utilizado no ensaio da atividade hemolítica direta e de hemaglutinação foram cedidos pelo Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) localizados no CCS, UFES.

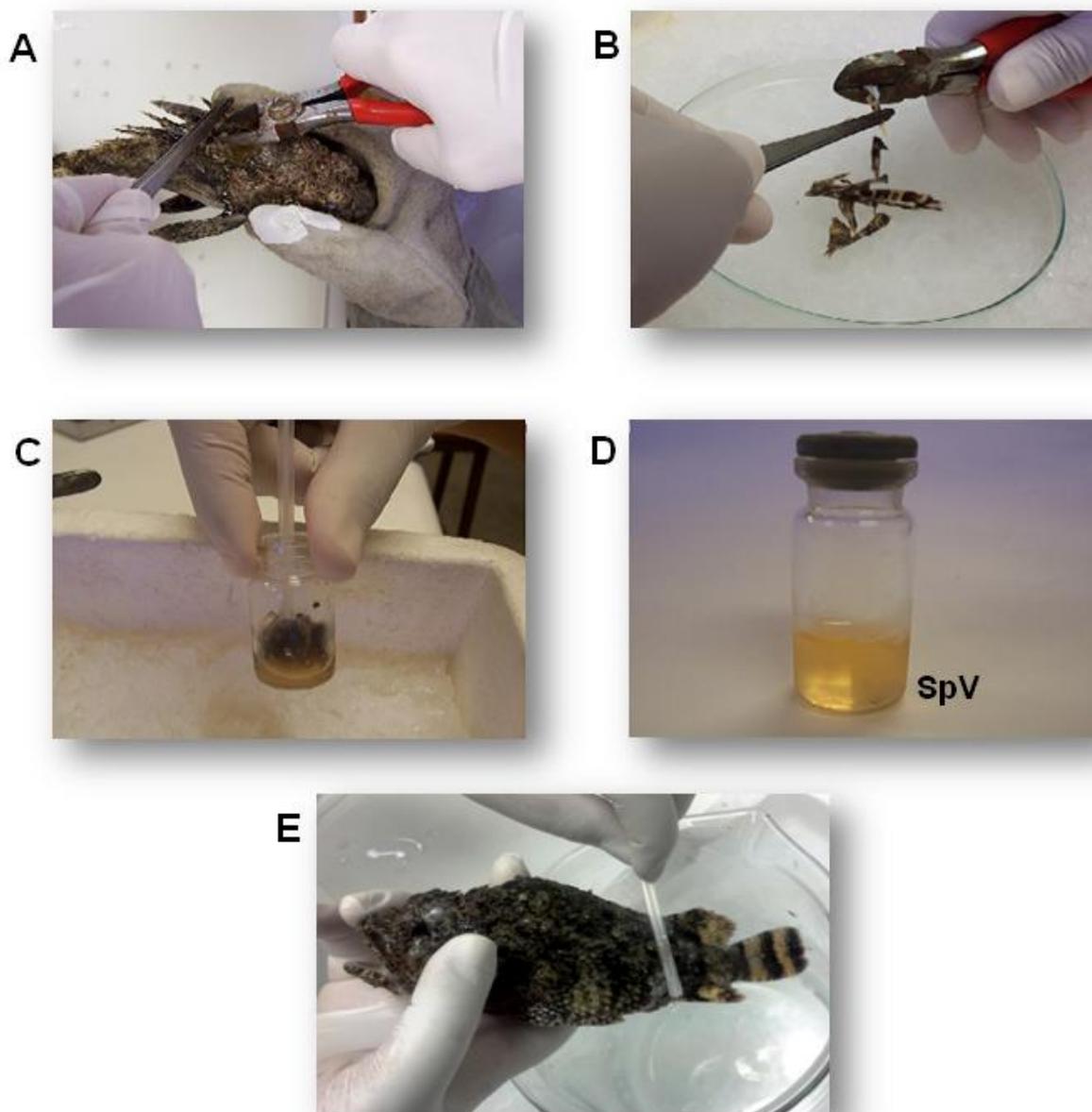
### 3.3 Obtenção dos extratos proteicos do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 3.3.1 Obtenção da peçonha

A peçonha foi extraída dos espinhos dorsais (12) e anais (3) de espécimes selvagens de *S. plumieri*, de acordo com o método *Batch*, desenvolvido por Schaeffer *et al.* (1971). Os espinhos, removidos dos peixes previamente sedados por resfriamento (-20°C), foram triturados manualmente com o auxílio de um alicate. Após essa etapa os animais foram eutanasiados. Os fragmentos foram transferidos para um frasco de vidro contendo água ultrapura (4°C) e homogeneizados manualmente para a solubilização de seu conteúdo. Todo o processo foi realizado em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C para a remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante obtido, correspondente à fração solúvel da peçonha bruta SpV (do inglês *Scorpaena plumieri* *V*enom), foi alíquotado e armazenado em nitrogênio líquido (-196°C) até ser destinado aos ensaios biológicos ou ao fracionamento. Um esquema do processo de extração da peçonha é mostrado na figura 3.

#### 3.3.2 Obtenção do muco da pele

O muco da pele dos peixes foi coletado, seguindo metodologia descrita por Nigam *et al.* (2012) e Palaksha *et al.* (2008) com adaptações. A pele da região dorso lateral do corpo do peixe foi suavemente raspada com uma espátula (figura 3), tomando cuidado para não danificá-la, evitando-se assim a contaminação com sangue ou secreções de células epiteliais/circulação periférica. Durante este procedimento, a superfície da pele foi mantida úmida utilizando água ultrapura (4°C)



**Figura 3:** OBTENÇÃO DA PEÇONHA E DO MUCO DA PELE. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Seccionamento dos espinhos. (C) Homogeneização dos espinhos fatiados em água purificada (Milli-Q). (D) Fração solúvel da peçonha bruta após centrifugação. (E) Remoção do muco da pele por raspagem da parte lateral do corpo do peixe.

e o material foi transferido para um frasco de vidro graduado. O homogenato obtido foi centrifugado a 30.000 x g durante 10 minutos a 4°C para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante obtido, correspondente à fração solúvel do muco SpSM (do inglês *Scorpaena plumieri* Skin Mucus). Este foi aliquotado armazenando em nitrogênio líquido (-196°C) até ser destinado às atividades experimentais ou submetido a fracionamento.

### 3.4 Dosagem de proteína

O conteúdo proteico de SpV, SpSM e das amostras obtidas nas etapas de fracionamento foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA – Sigma) como padrão.

### 3.5 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 3.5.1 Ensaio da atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi avaliada segundo metodologia descrita por Kondo *et al.* (1960), utilizando camundongos da linhagem Swiss, (20-25g) previamente tricotomizados no dorso. A injeção foi feita no dorso dos animais por via intradérmica (i.d.) com 30µL de solução salina (NaCl 0,9% p/v e 0,25mg/mL de BSA) contendo 75µg de proteínas de SpV e de SpSM. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Após 24 horas, os animais foram sacrificados (deslocamento cervical) e as peles removidas para a avaliação visual da sua superfície interna. A identificação de formação de halos hemorrágicos indica resultado positivo para a atividade hemorrágica. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 3.5.2 Ensaio da atividade hemolítica direta

A atividade hemolítica foi avaliada sobre eritrócitos de coelho de acordo com metodologia descrita por Habermann *et al.* (1981), com adaptações.

O sangue do coelho foi coletado por punção cardíaca e imediatamente misturado com solução anticoagulante de Alsever (glicose 2,05%, cloreto de sódio

0,42%, citrato trisódico 0,8%, ácido cítrico 0,055% em água destilada (Alsever e Ainslie, 1941) na proporção 1:1. Para obtenção das hemácias, uma alíquota do sangue não coagulado foi diluída (1:10 v/v) em solução salina (NaCl 0,15M) e centrifugada a 3.000 x g por 3min. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram ressuspensas em salina e novamente centrifugadas (3.000 x g por 3min). Este procedimento foi repetido por três vezes ou até que se obtivesse um sobrenadante incolor. As células lavadas foram ressuspensas em tampão fosfato (PBS) de maneira a obter uma suspensão 2% (v/v).

Amostras de SpV (1 e 10 $\mu$ g) e de SpSM (1-100 $\mu$ g) contidas em 1mL de PBS foram incubadas por 30min a 37°C com 50 $\mu$ l da suspensão de eritrócitos em PBS (2% v/v). Após a incubação, os eritrócitos intactos foram removidos por centrifugação (14.000 x g por 1 min), e a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada pela absorvância a 540nm (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech).

O percentual de hemólise foi calculado pela relação entre a absorção do sobrenadante gerada na presença das amostras testadas e pela absorção dos sobrenadantes gerados pela incubação dos eritrócitos em água destilada. Esse foi considerado o controle positivo (ou 100% de hemólise). Para o controle negativo utilizou-se PBS. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como a média  $\pm$  DP.

### 3.5.3 Ensaio cardiovascular

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 e de SpSM e o acesso à artéria carótida foi utilizado para a obtenção dos registros de pressão e frequência cardíaca.

Amostras de SpV e de SpSM (300 $\mu$ g de proteína/kg de peso corporal) foram administradas *in bolus* em um volume de 100 $\mu$ l de solução salina. A dose utilizada foi selecionada de acordo com trabalho anterior realizado por Gomes *et al.*, (2010). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por meio de um transdutor de pressão sanguínea (Grass Instrument Div.,Warnick, USA) e os sinais foram processados utilizando o sistema BIOPAC (MP100, Modelo PT300, Santa Barbara, EUA). A

pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram obtidas simultaneamente a partir do sinal PAP. Após a injeção de SpV e de SpSM, os valores de pico de PAM e FC foram medidos.

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 do anestésico foram administradas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média), e foram avaliadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc de Tukey. Os resultados também foram avaliados pelo teste t de Student. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

#### 3.5.4 Ensaio da atividade inflamatória

Os ensaios das atividades nociceptiva e edematogênica de SpV e de SpSM foram realizadas utilizando o teste da pata traseira de camundongos, de acordo com metodologia descrita por Hunskaar *et al.* (1985) e Lima *et al.* (2003). Os camundongos foram inicialmente mantidos por 10 minutos, para adaptação, em uma câmara com fundo espelhado para facilitar a observação do comportamento do animal.

Para a atividade nociceptiva os animais receberam por via intraplantar (i.pl.) 30 $\mu$ L de PBS contendo 60 $\mu$ g de SpV ou de SpSM. O índice de nocicepção foi determinado pelo tempo em segundos que o animal permaneceu com a pata na boca (ato de lambar ou morder) durante 30min de avaliação experimental.

Para a avaliação da atividade edematogênica de SpV e de SpSM, 60 $\mu$ g de proteína em 30 $\mu$ l de PBS foram injetados (i.pl.). O edema local foi avaliado pela diferença a espessura (aferida em milímetros) da pata antes (0min) e após 30min da injeção da amostra utilizando um paquímetro digital (Zaas Precision). Os resultados foram expressos como a média da porcentagem do aumento da pata em relação à espessura inicial (Lima *et al.*, 2003). Os animais do grupo controle receberam 30  $\mu$ L de PBS e o experimento foi realizado em triplicata.

Os resultados do ensaio da atividade inflamatória foram apresentados como média  $\pm$  EPM e comparados através da ANOVA de uma ou duas vias seguida de um pós-teste de Tukey (Prism Graph 5.0). As diferenças foram consideradas

estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3.6 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 3.6.1 Atividades enzimáticas

A atividade proteásica sobre a gelatina e a hialuronidásica sobre o ácido hialurônico de SpV e de SpSM foram avaliadas por zimografia em gel de poliacrilamida. A atividade fibrinogenolítica foi avaliada pela visualização da hidrólise do fibrinogênio em sistema SDS-PAGE e a atividade fosfolipásica  $A_2$  testada sobre fosfolipídios (gema de ovo de galinha) em meio de cultura enriquecido *in vitro*.

#### 3.6.2 Atividade gelatinolítica

A atividade gelatinolítica foi avaliada utilizando-se zimografia, com gelatina (Sigma) como substrato copolimerizado ao gel, realizada de acordo com metodologia adaptada descrita por Heunssen e Dowdle (1980) e Laemmli (1970).

O gel de separação (8%) foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida em água (29,2:0,8%), contendo 0,1% SDS p/v, 0,1% persulfato de amônio p/v, 0,1% Temed v/v e 0,375M Tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de gelatina. Utilizou-se um mini-sistema de eletroforese Bio-Rad, no qual as placas para polimerização medem 10,0cm de comprimento por 8,2cm largura e a espessura do gel foi de 0,75mm. O gel foi polimerizado à temperatura ambiente e posteriormente mantido a 4°C por um tempo mínimo de 4h.

Amostras contendo 5, 10 e 20µg de SpV e de SpSM foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,125M pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 20% glicerol p/v e 1% azul de bromofenol p/v. Foi utilizado o padrão de peso molecular SDS-PAGE – BROAD – RANGE da Bio-Rad. Após a aplicação das amostras, a eletroforese foi conduzida em camara fria (4°C) à 50V por 30 minutos e posteriormente a 100V até o término da corrida. Utilizou-se Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M, contendo 0,1% de SDS, pH 8,3 como tampão de corrida.

Após o término da eletroforese, indicado pela migração em linha frontal do azul de Bromofenol, o gel foi removido da placa e imerso por uma hora em solução

2,5% de Triton X-100 v/v em água, para remoção do SDS. Em seguida o gel foi lavado rapidamente com água destilada. Posteriormente o gel foi incubado em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 a 37°C durante 2h. Para coloração, o gel foi imerso em solução 0,25% de azul de coomassie R-250 em metanol; ácido acético; água (5:1:5), durante 30 minutos. A descoloração foi realizada em solução etanol; ácido acético; água (1:2:9). A atividade gelatinolítica foi detectada pela visualização de bandas ou halos claros, as quais não aparecem coradas no gel devido à ação das enzimas proteolíticas sob o substrato de gelatina.

### 3.6.3 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica de SpV e de SpSM foi testada sobre o fibrinogênio bovino conforme descrito por Ouyang e Teng (1976). Amostras (300µL) de SpV e de SpSM na concentração de 1,17µg/µL foram incubadas a 37°C com 300µL de solução de fibrinogênio bovino (4mg/mL) em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4 contendo 50mM de NaCl. Alíquotas de 30µL da solução de incubação foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 24h e a reação paralisada pela adição de 10µL de tampão da amostra (tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 12% de glicerol p/v, 0,01% de azul brilhante G p/v.), contendo 5% v/v de β-mercaptoetanol, do sistema de eletroforese SDS-Tricina.

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) SDS-Tricina foi realizada conforme descrito por Schagger e Von Jagow (1987). A partir de solução de acrilamida-bisacrilamida na relação 48:1,5% em água, preparou-se o gel de separação a 10%, contendo 13,3% de glicerol p/v, 0,033% de persulfato de amônio p/v, 0,033% Temed v/v, 0,1% de SDS p/v e Tris-HCl 1M pH 8,5. Sobre o gel de separação foi preparado o gel de concentração a 5%, a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de todos os reagentes citados acima, com exceção do glicerol. Para a polimerização utilizou-se o mini-sistema de eletroforese Bio-rad, no qual as placas para polimerização medem 10,0cm de comprimento por 8,2cm largura e a espessura do gel foi de 0,75mm.

A eletroforese foi conduzida a 50V por 30 minutos e posteriormente a 100V até o término da corrida. Foi utilizado como tampão do anodo Tris-HCl 0,2M pH 8,9 e como tampão do catodo Tris-HCl 0,1M contendo 0,1M de tricina e 0,1% de SDS pH 8,25. Foi utilizado o padrão de peso molecular SDS-PAGE – BROAD – RANGE da

Bio-Rad.

Para coloração, o gel foi imerso primeiramente em solução 0,25% de azul de Coomassie R-250 em metanol; ácido acético; água (5:1:5), durante 30 minutos. A descoloração foi realizada em solução etanol: ácido acético: água (1:2:9). A presença de atividade fibrinogenolítica é observada no gel pela visualização da degradação das bandas protéicas correspondentes às cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) do fibrinogênio.

#### 3.6.4 Atividade hialuronidásica

A presença de atividade hialuronidásica nas amostras de SpV e de SpSM foi também avaliada utilizando zimografia em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970), seguindo metodologia descrita por Cevallos *et al.* (1992) com adaptações. O gel foi preparado de acordo com o item 3.6.2, usando como substrato o ácido hialurônico (3,14mg/mL).

Amostras contendo 10, 20 e 30 $\mu$ g de SpV e de SpSM foram solubilizadas em tampão da amostra conforme item 3.6.2.

Após o término da eletroforese, indicado pela migração frontal do azul de Bromofenol, o gel foi removido da placa e imerso em solução 2,5% de Triton X-100 v/v em água, sob agitação durante uma hora, para remoção do SDS. Em seguida o gel foi lavado com água destilada para remoção do Triton X-100. Posteriormente incubado por 3h a 37°C em tampão fosfato 0,2M pH 6,0. O gel foi novamente lavado com água destilada para remoção do excesso de solução da etapa anterior e mantido por 30 minutos em solução 12,5% de ácido tricloroacético (TCA) à temperatura ambiente. E posteriormente lavado seis vezes com solução 3% de ácido acético seguido da incubação com solução 1% de ácido periódico por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação no escuro. Para a etapa seguinte o gel foi novamente lavado com água destilada e mantido em solução 0,5% de metabissulfito de potássio por 30min à temperatura ambiente. Antes da adição do corante, o gel foi lavado novamente com água destilada e posteriormente imerso em solução 0,5% de Alcian Blue durante 4 horas à temperatura ambiente. Utilizou-se solução 7% de ácido acético para descorar o gel. O armazenamento do gel foi feito em água destilada.

A atividade hialuronidásica pôde ser detectada pela visualização de bandas

ou halos claros no gel, devido à ação das enzimas sob o substrato de ácido hialurônico.

### 3.6.5 Ensaio de hemaglutinação

A atividade hemaglutinante para as amostras do muco da pele de *S. plumieri* foi avaliada sobre eritrócitos de coelho, o qual foi preparado conforme descrito no item 3.5.2.

Os ensaios de aglutinação foram realizados em placas de microtitulação contendo 96 poços com fundo cônico, o que possibilita a visualização do sedimento das hemácias que não se aglutinam. Para o controle negativo os poços foram preenchidos com 50µl de PBS acrescido de 50µl de suspensão de eritrócitos (conforme item 3.5.2).

Para a avaliação da atividade hemaglutinante os poços foram preenchidos com 50µl de PBS. Em seguida foram acrescidos 50µl de SpV ou de SpSM (10µg/µl) nos dois primeiros poços da fileira. A partir da solução contida no segundo poço a amostra foi diluída serialmente, com agitação e transferência de 50µl para o poço seguinte até o último poço da fila com descarte de 50µl. Terminadas as diluições, foram adicionados 50µl da suspensão de eritrócitos a 5,0% (v/v) e as placas foram deixadas em repouso por aproximadamente 2h à temperatura ambiente (25°C). A hemaglutinação era visualizada pela formação de um tapete ou um botão de eritrócitos. A concentração mínima que permite visualizar os eritrócitos aglutinados foi denominada título hemaglutinante.

### 3.6.6 Atividade fosfolipase A2

A atividade fosfolipásica foi ensaiada em meio de cultura *in vitro* em placas de Petri contendo ágar (15g/L), 1M de CaCl<sub>2</sub> e gema de ovo (25% em PBS). A mistura foi colocada em banho-maria (37°C) até a solubilização dos componentes e posteriormente deixados a temperatura ambiente para a polimerização do ágar, conforme metodologia modificada descrita por Habermann e Hardt (1972). Amostras de SpV e de SpSM (20, 200 e 2000ug/mL) foram preparadas em PBS e 12µL de cada foi aplicada em duplicata nos sulcos do meio de cultura. Após incubação em estufa a 37°C por 20h em atmosfera úmida. A presença de atividade PLA<sub>2</sub> pode ser

detectada por meio da visualização de halos translúcidos devido à hidrólise do substrato. PBS foi utilizado como controle negativo e o veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 50µg/mL utilizado como referência de atividade fosfolipásica, nas placas testes. Adicionalmente, foi construída uma curva padrão de atividade, aplicando concentrações crescentes (12,5 a 200ug/mL) do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*.

### 3.7 Análise proteômica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 3.7.1 Cromatografia líquida bidimensional (2D-LC)

Amostras de SpV e de SpSM foram inicialmente fracionados por cromatografia de gel filtração (primeira dimensão), e as frações eluídas na primeira dimensão foram separadas por cromatografia de fase reversa (RPC) (segunda dimensão).

#### 3.7.2 Primeira dimensão – Cromatografia por filtração em gel

Amostras de SpV (95mg) e de SpSM (110mg) foram solubilizadas em 12mL tampão fosfato 20mM, pH 7,4 com 150mM de NaCl e submetidas a cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S200-HR (2,0 x 120cm) (GE Life Sciences) conforme descrito por Carrijo *et al.* (2005). A coluna foi previamente equilibrada e eluída com tampão fosfato 20mM, pH 7,6 com 0,4M de NaCl. A cromatografia foi conduzida a 4°C, com fluxo de 7,6mL/h, coletando-se frações com média de volume de 1,9mL. O conteúdo protéico das frações eluídas foi estimado pela leitura da absorbância a 280nm (espectrofotômetro UV/visível Ultrospec 1000, Amersham, Uppsala, Suécia).

#### 3.7.3 Segunda dimensão – Cromatografia de fase reversa (RPC)

A cromatografia de fase reversa (RPC) foi realizada em sistema Prominence HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan), utilizando o software LCsolution (version 1.25).

Amostras ( $\approx 1,0$ mg) das frações de SpV e de SpSM obtidas da primeira etapa de fracionamento, foram submetidas à cromatografia de fase reversa (RPC). As amostras foram aplicadas em coluna Symmetry 300<sup>TM</sup> C4 5  $\mu$ m (Waters, Ireland), previamente equilibrada com solução H<sub>2</sub>O/TFA 0,1%. A eluição foi realizada usando um gradiente segmentado com 0,1% TFA em acetonitrila (ACN) com fluxo de 0,5mL/min, seguindo o programa: 0-20min: 0% ACN; 20-25min: 20% ACN; 25-60min: 60% ACN; 65-75min: 100% ACN; 75-80min: 100% ACN. Os eluatos foram monitorados pela absorção a 218nm e coletados manualmente. As frações eluídas da coluna de RPC foram liofilizadas e armazenadas a 4°C para posterior análise por espectrometria de massas.

#### 3.7.4 Análise por espectrometria de massas

As amostras liofilizadas, obtidas na cromatografia de fase reversa foram solubilizadas em H<sub>2</sub>O/TFA 0,1 % (v/v) e misturadas com solução matriz (CHCA - ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnâmico, SA - ácido sinapínico e DHB - ácido 2-5 dihidróxibenzóico, na proporção 1:3, v/v, solução saturada em TFA 0,1%), e aplicadas 1 $\mu$ L em triplicata em placa MTP AnchorChip 384 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Após secagem a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massas utilizando-se diferentes frequências de laser. Os dados foram adquiridos nas janelas massa/carga (m/z) para até 5KDa, 5-20KDa e 20-100KDa.

Os espectros de massas foram obtidos em sistema MALDI-TOF/TOF AutoFlex III TM Smartbeam, softwares FlexControl<sup>TM</sup> e FlexAnalysis<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA), operando no modo positivo/linear. A calibração externa do modo MS foi realizada usando Peptide Calibration Standard II, Protein Calibration Standard I e II (Bruker Daltonics).

As análises de espectrometria de massas foram gentilmente realizadas pela Dra. Márcia Helena Borges e pela M.<sup>a</sup> Jomara Gonçalves no Laboratório de Química de Proteínas da Fundação Ezequiel Dias.

# **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtenção da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*.

De um exemplar de tamanho médio (15-20cm, pesando aproximadamente 350g), obteve-se dos espinhos dorsais e anais em média 8mg e 6mg/proteínas da peçonha (SpV) e do muco da pele (SpSM) respectivamente.

### 4.2 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 4.2.1 Atividade hemorrágica

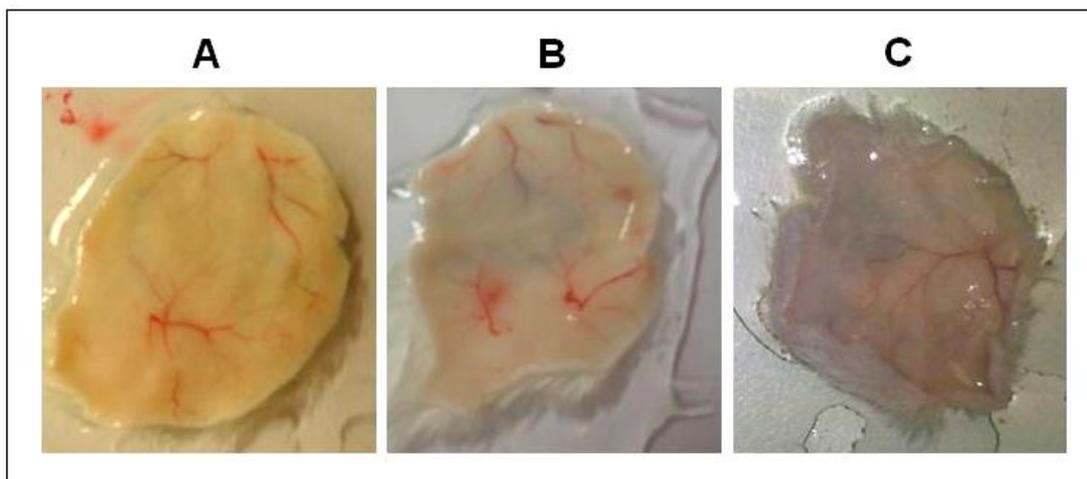
A atividade hemorrágica foi avaliada, na pele do dorso de camundongos por administração intradérmica. Conforme mostrado na figura 4, 75µg de SpV e de SpSM não induziram a formação de halo hemorrágico Demonstrando que ambas as amostras são destituídas de atividade hemorrágica direta.

#### 4.2.2 Atividade citolítica

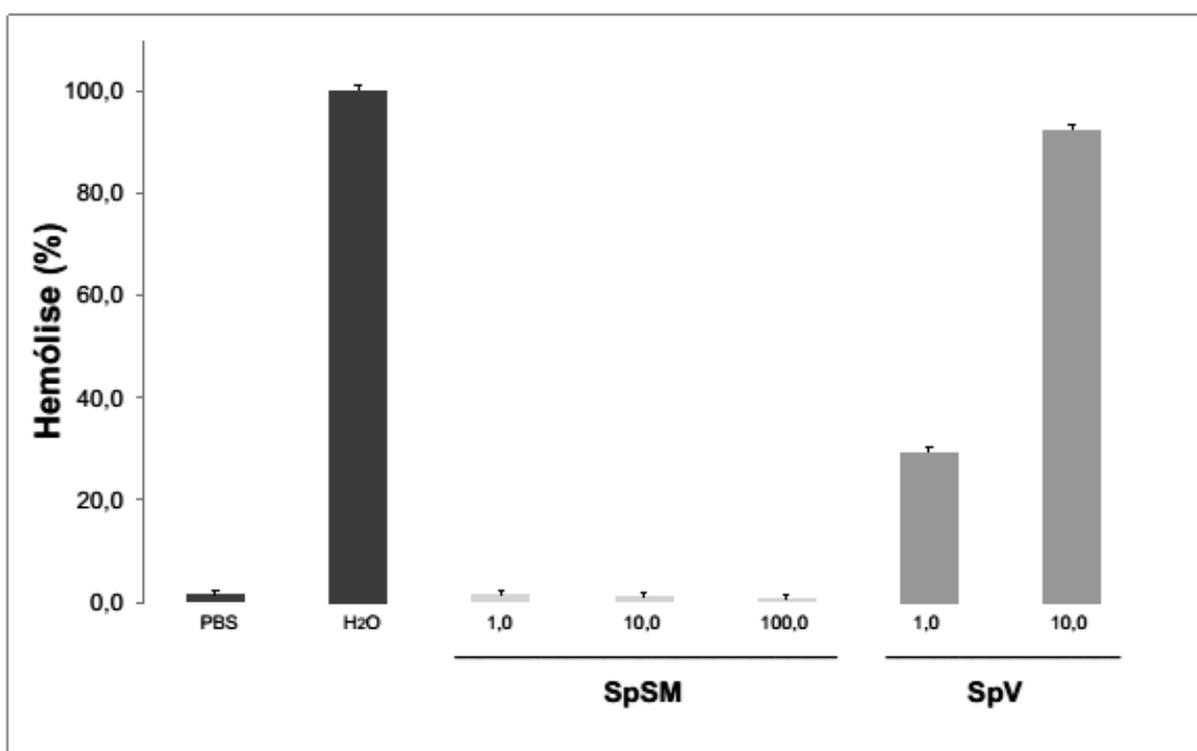
A figura 5 mostra os resultados da avaliação da atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho da peçonha e do muco. A peçonha de *S. plumieri* induziu hemólise, chegando a 92% na concentração de 10µg/ml. Entretanto, uma dose 10 vezes maior de SpSM (maior dose testada 100µg/ml), não lisou os eritrócitos.

#### 4.2.3 Atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>

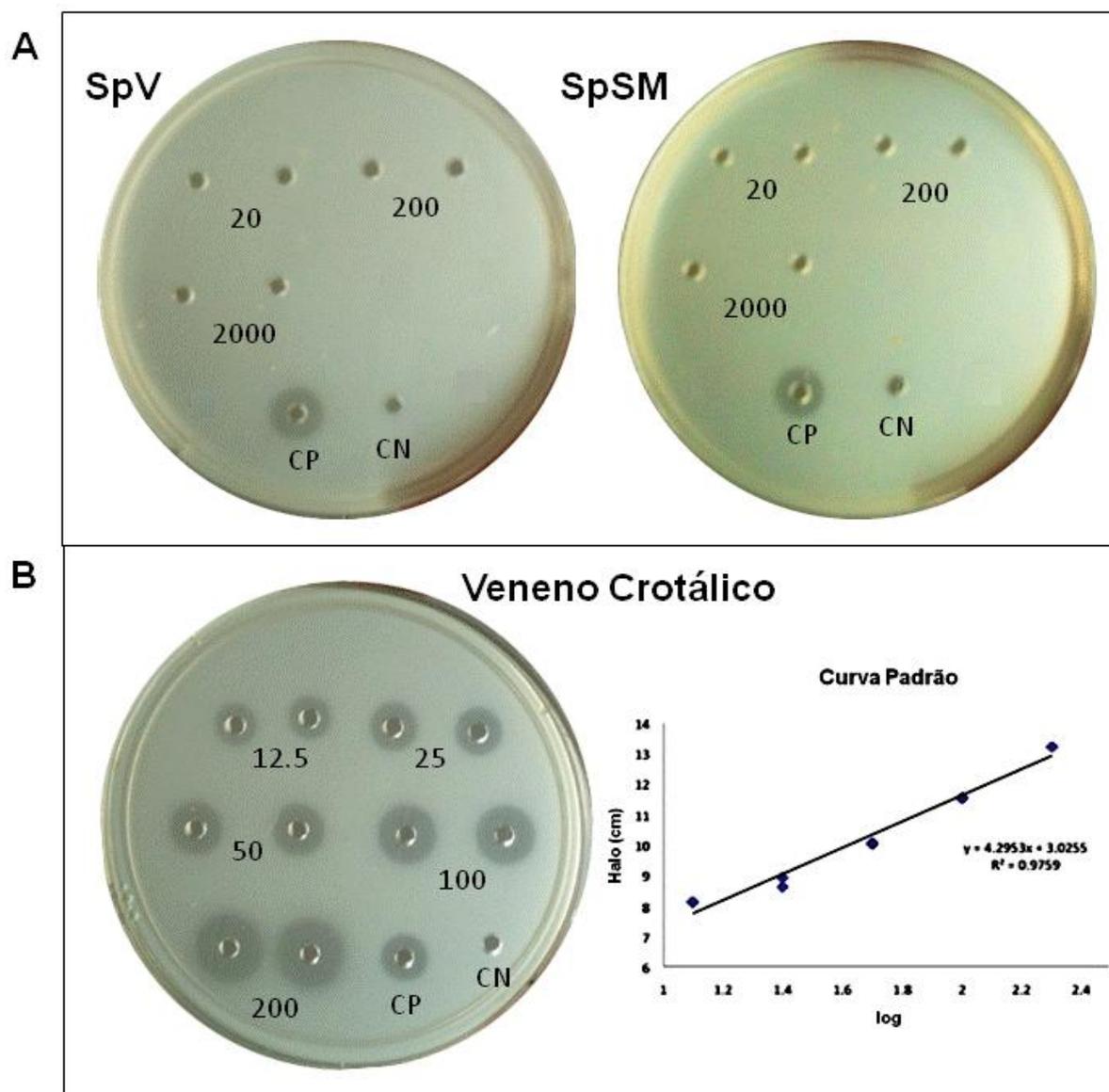
A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi avaliada *in vitro* em meio de cultura contendo gema de ovo como substrato. Como pode ser observado na figura 6, nenhuma das doses avaliadas de SpV e SpSM (20, 200 e 2000ug/mL) induziu a formação de halos de degradação do substrato, os quais são característicos de atividade fosfolipásica. Este resultado sugere que ambas as amostras são destituídas dessa atividade.



**Figura 4:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE SpV E DE SpSM EM PELE DE CAMUNDONGOS. Superfície interna da pele de camundongos 24h após injeção intradérmica das amostras: (A) Controle negativo: solução salina (NaCl 0,9% p/v) contendo soroalbumina bovina (0,25mg/mL); (B) e (C) 75µg de proteína de SpV e de SpSM respectivamente. N=3.



**Figura 5:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA DE AMOSTRAS DE SpV E DE SpSM. As amostras de SpSM (1-100 $\mu$ g/ml) e de SpV (1 e 10 $\mu$ g/ml) foram incubadas com suspensão de eritrócitos de coelho 2% v/v em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente (25-30°C). A hemólise foi detectada pela absorção a 540nm da hemoglobina liberada. Resultados foram expressos como a média  $\pm$  DP da porcentagem de hemólise por comparação com controle positivo (hemácias incubadas com água destilada). Ensaio realizado em duplicata.



**Figura 6:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA  $A_2$  DE SpV E DE SpSM. (A) Amostras de SpV e de SpSM (20, 200 e 2000 $\mu$ g/mL) foram aplicadas em meio de cultura de ágar enriquecido com gema de ovo incorporado. (B) Placa com diferentes concentrações de veneno crotálico utilizado para construção da curva padrão de atividade fosfolipásica  $A_2$ . Depois da aplicação as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 20h em atmosfera úmida. CP: Controle Positivo (veneno crotálico) CN: Controle Negativo (PBS).

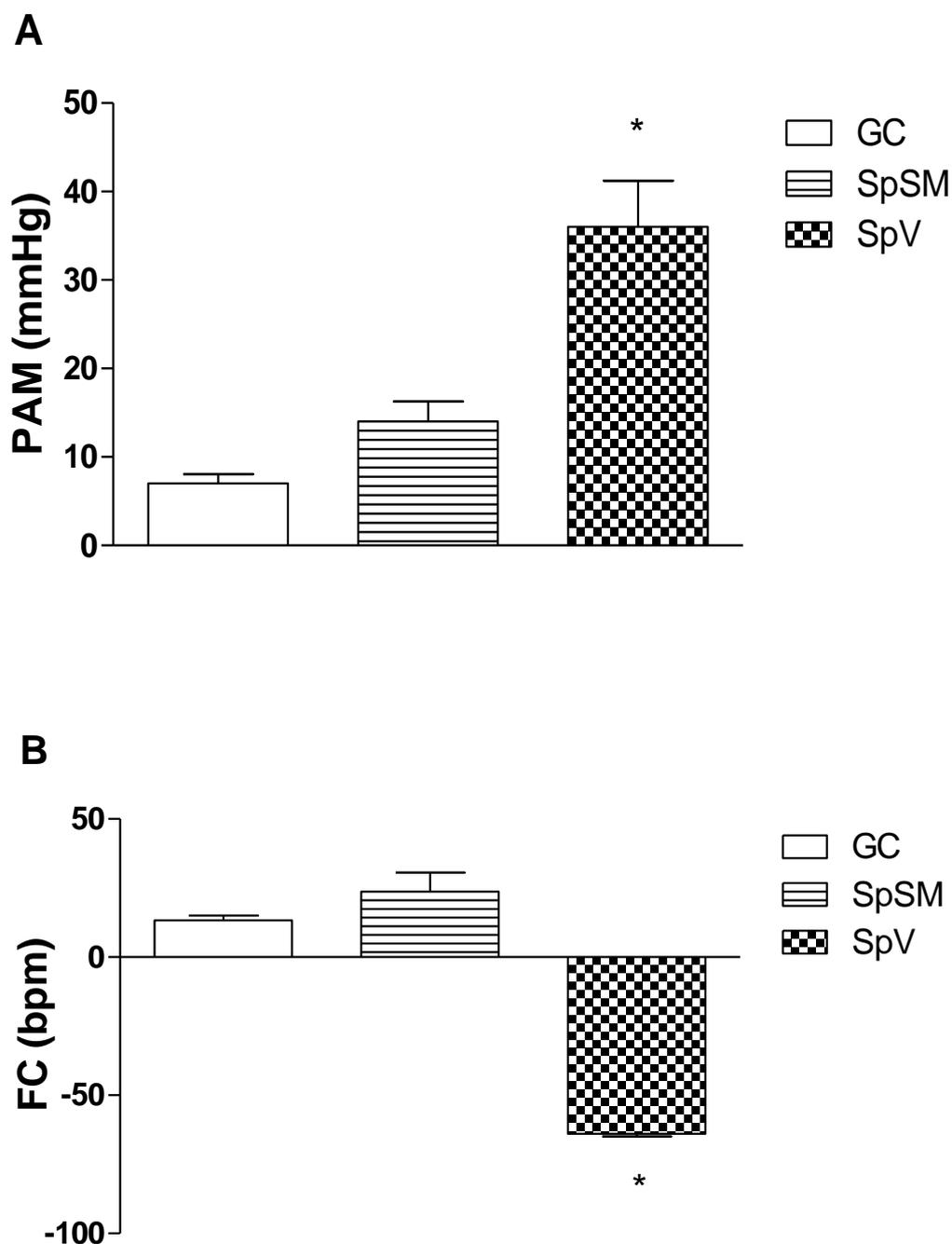
#### 4.2.4 Atividade cardiovascular

Os resultados da avaliação da atividade cardiovascular de SpV e SpSM (300ug/kg, i.v.) em ratos anestesiados são mostrados na figura 7. SpV induziu resposta pressora (figura 7A), observada pelo aumento de  $36,9 \pm 4,0$ mmHg da pressão arterial média, e bradicardia de  $65,6 \pm 9,2$ bpm (figura 7B). Estes efeitos foram imediatos e transientes, e os valores de PAM e da FC retornaram aos níveis basais após 2-6min. O SpSM não alterou os parâmetros analisados. Os valores iniciais de pressão sistólica, diastólica e os valores da FC dos ratos anestesiados foram  $120 \pm 4,5$ mmHg,  $80 \pm 7,0$ mmHg e  $320 \pm 20$ bpm, respectivamente.

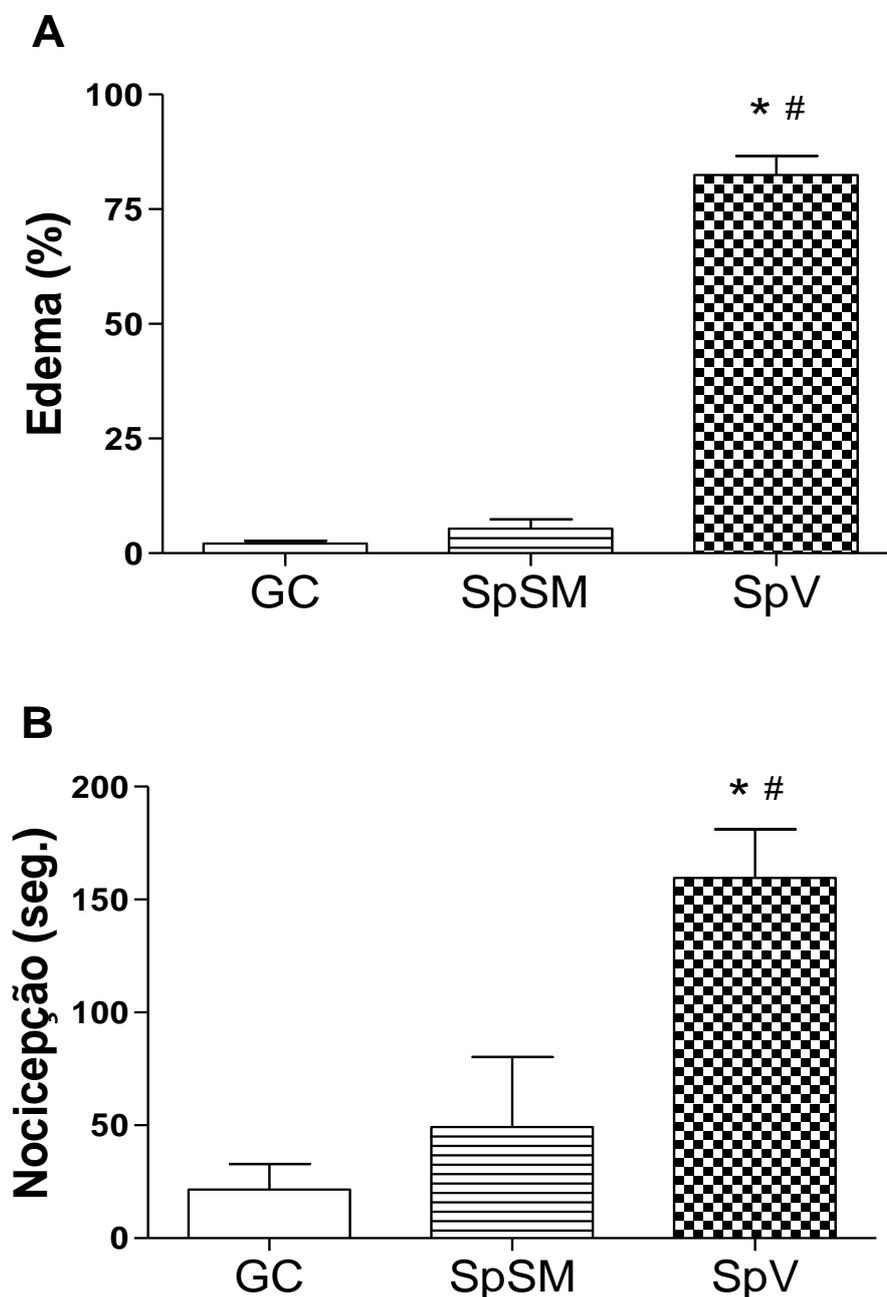
#### 4.2.5 Atividade inflamatória

As atividades edematogênica e nociceptiva de SpV e SpSM foram avaliadas pelo teste da pata do camundongo pela injeção de 60µg proteína. A figura 8A mostra o percentual de formação do edema local, 30 minutos após a injeção de SpV e de SpSM. Esta dose de SpV induziu resposta edematogênica considerável resultando num aumento de  $82,5 \pm 3,8\%$  na espessura da pata injetada. Entretanto SpSM não induziu aumento significativo na espessura da pata injetada.

A figura 8B mostra os resultados da avaliação da atividade nociceptiva após injeção de SpV e de SpSM. O veneno causou intensa nocicepção local, índice de  $159,5 \pm 18,3$ s após a injeção. Entretanto, o muco da pele não induziu nocicepção local ( $49,3 \pm 31,4$ s). Este índice não apresenta diferença significativa quando comparado ao obtido para o grupo controle ( $21,5 \pm 11,4$ s).



**Figura 7:** EFEITOS DE SpV E DE SpSM SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS ANESTESIADOS. Alterações induzidas por SpV e por SpSM, após a injeção i.v (300ug de proteína/kg de peso corporal em 100 $\mu$ l de solução salina), sobre (A) PAM (Pressão Arterial Média). e (B) FC (Frequência Cardíaca). Cada coluna é representada pela média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em comparação com o controle (PBS). bpm: batimentos por minuto, N=3.



**Figura 8:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA E EDEMATOGÊNICA DE SpV E DE SpSM. SpV e SpSM (60 $\mu$ g) foram injetados (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. (A) Edema local, expresso em porcentagem de aumento, quantificado pela diferença entre a espessura da pata antes e após 30min da injeção. (B) Índice de nocicepção, quantificado pelo tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante um período de 30min. O grupo controle (GC) recebeu PBS estéril. Resultados expressos pela média  $\pm$  EPM. \*,#  $p < 0,05$  comparado com GC e SpSM respectivamente. N = 3.

### 4.3 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

#### 4.3.1 Atividades enzimáticas

##### 4.3.1.1 Atividade gelatinolítica

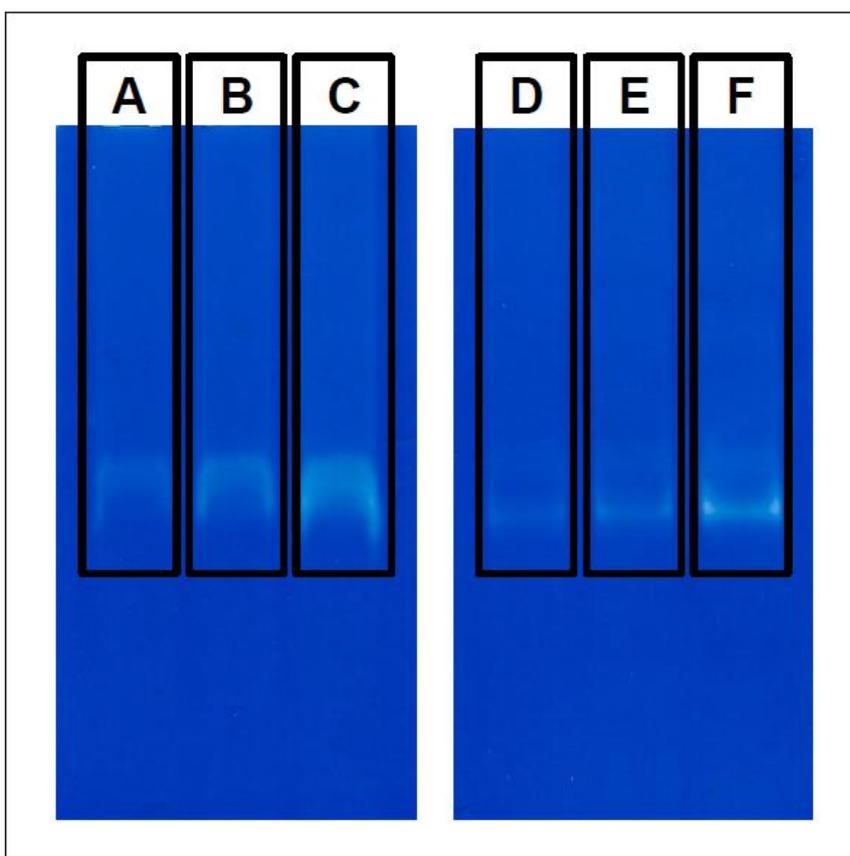
A atividade proteásica sobre gelatina foi avaliada por zimografia. Como mostrado na figura 9, ambos os venenos (SpV e de SpSM) apresentaram atividade gelatinolítica, observada pela formação de halo de hidrólise do substrato, em todas as doses testadas. O halo de hidrólise de substrato de SpV e SpSM ocorre na mesma posição no do gel, demonstrando que a enzima responsável por esta atividade, em ambas as amostras, apresenta o mesmo peso molecular aparente,

##### 4.3.1.2 Atividade Fibrinogenolítica.

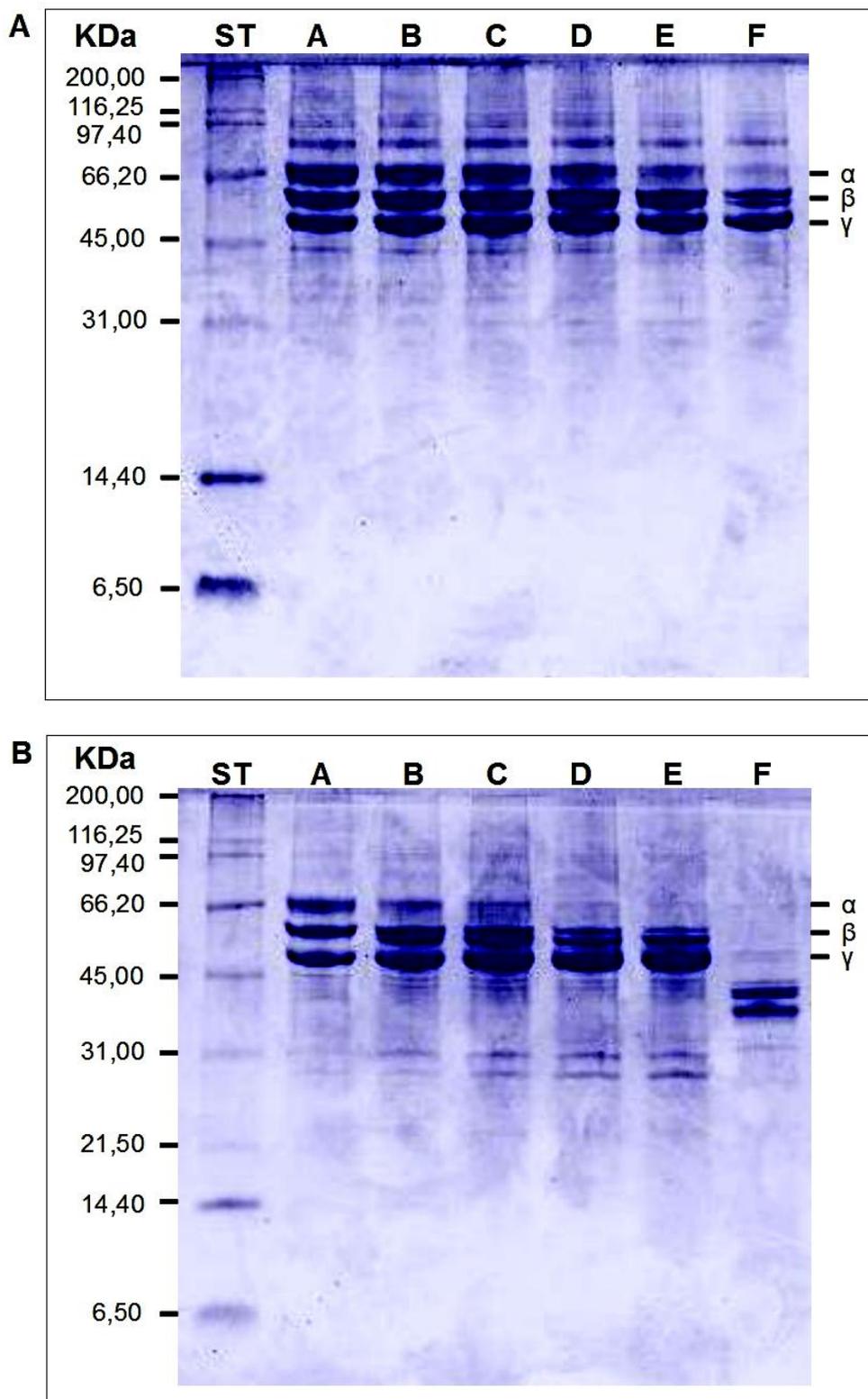
A presença de atividade fibrinogenolítica de SpV e SpSM foi avaliação pela visualização da proteólise do fibrinogênio em SDS-PAGE (figura 10). Observa-se que ambas as amostras digerem preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. A degradação da cadeia  $\alpha$  iniciou-se com 8h de incubação para SpV e com 2h para SpSM, e a degradação total da cadeia ocorreu em 24h e 12h para SpV e SpSM respectivamente. SpSM hidrolisou totalmente as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  após 24h de incubação.

##### 4.3.1.3 Atividade hialuronidásica

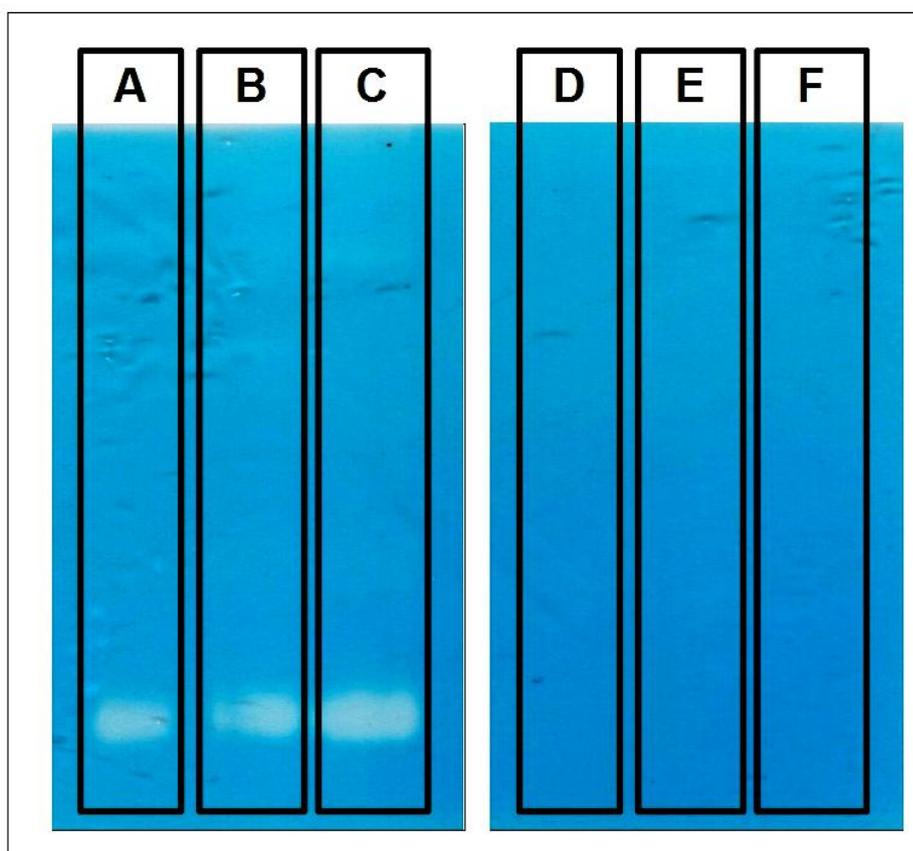
A figura 11 mostra o perfil da zimografia para avaliação da atividade hialuronidásica. Somente nas canaletas onde foi aplicado amostras de SpV, pode-se visualizar bandas claras, correspondentes à hidrólise do ácido hialurônico, contra o fundo azul de substrato não degradado. Entretanto, o mesmo não ocorre onde foram aplicadas amostras de SpSM. Demonstrando que SpSM não apresenta atividade hialuronidásica.



**Figura 9:** ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE SpV E DE SpSM. Amostras de SpV (A, B e C) e de SpSM (D, E e F) contendo 5, 10 e 20µg, respectivamente, foram submetidas a zimografia utilizando gel de poliacrilamida (8%) contendo 0,1% de gelatina. Após remoção do SDS dos géis com Triton X-100 (2,5% v/v), estes foram incubados em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 por 2 horas a 37°C para a digestão proteica. Os géis foram revelados com azul de Coomassie R-250.



**Figura 10:** DIGESTÃO PROTEOLÍTICA DO FIBRINOGENO POR SpV E SpSM. Amostras de 15 $\mu$ g de fibrinogênio bovino incubadas com 4 $\mu$ g de (A) SpV e de (B) SpSM a 37°C durante: (A) 0h; (B) 2h; (C) 4h; (D) 8h; (E) 12h e (F) 24h. Sistema SDS-Tricina, gel: 10% de poliacrilamida. O gel foi revelado com azul de Coomassie R-250. Marcadores de peso molecular são mostrados a esquerda do gel.



**Figura 11:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DE SpV E DE SpSM. Amostras de SpV (A, B e C) e de SpSM contendo 10, 20 e 30µg respectivamente, foram submetidas a zimografia utilizando gel de poliacrilamida (8%) contendo 10% de ácido hialurônico como substrato incorporado. Após remoção do SDS dos géis com Triton X-100 (2,5% v/v), estes foram incubados em tampão fosfato 0,2M pH 6,0 por 3 horas a 37°C para degradação enzimática. Os géis foram revelados com Alcian Blue.

#### 4.4 Atividade hemaglutinante

SpSM foi capaz de induzir a aglutinação em eritrócitos de coelho com concentração mínima hemaglutinante de 2,5mg/mL (dados não mostrados). Esta atividade não foi avaliada para as amostras de SpV, pois o mesmo provoca hemólise, o que impossibilita a visualização da hemaglutinação.

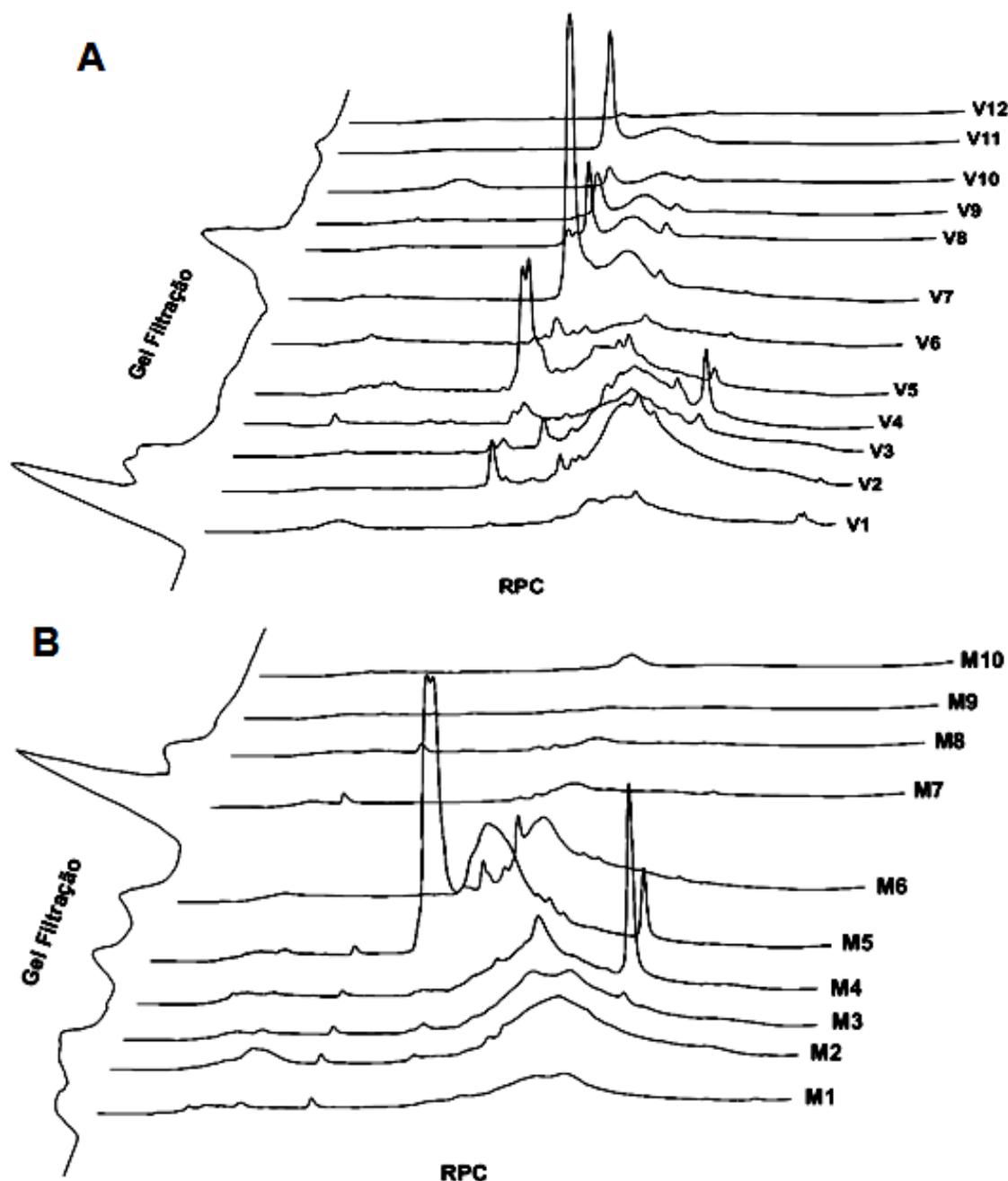
#### 4.5 Análise proteômica parcial da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *S. plumieri*

##### 4.5.1 Fracionamento de SpV e de SpSM através de cromatografia líquida bidimensional (2D-LC)

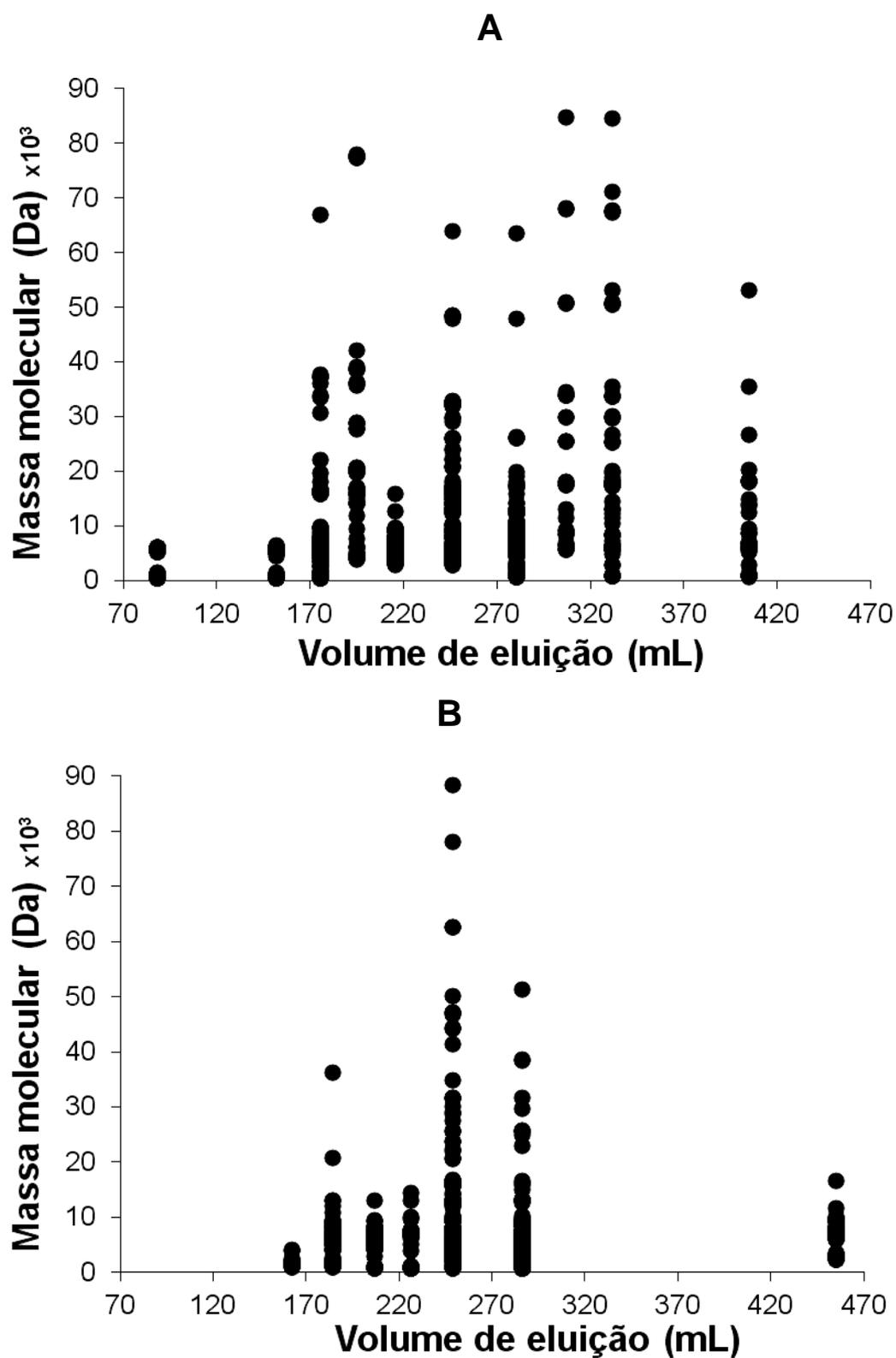
Para a análise dos perfis 2D-LC, as frações mais hidrofílicas, provavelmente não protéicas da cromatografia de fase reversa, eluídas entre 0-20min, não foram incluídas no gráfico, pois algumas apresentavam alta absorção e mascaravam a absorção das demais moléculas. A análise de moléculas não proteicas de baixa massa molecular presentes nestas amostras poderá ser alvo de estudos futuros em nosso laboratório.

A figura 12 mostra os perfis da análise 2D-LC. No eixo vertical da primeira dimensão (filtração em gel) e no horizontal a segunda dimensão (fase Reversa - RPC) de SpV e SpSM. Na primeira dimensão SpV foi fracionado em 12 picos proteicos principais (V1-V12), eluídos entre 88-405mL (figura 13A), e SpSM em 10 grupos proteicos principais (M1-M10), eluídos em entre 162-455mL (figura 13B), esta menor faixa de volume de eluição sugere uma menor variedade de massas moleculares para SpSM (figura 13). A segunda dimensão (RPC) possibilitou uma melhor resolução dos componentes das frações obtidas na primeira dimensão (figuras 12 e 14). De forma diferente á primeira dimensão, SpV apresentou eluição numa faixa mais estreita da solução de eluição (40-60% de ACN) quando comparado a eluição apresentada por SpSM (20-60% de ACN), demonstrando um conteúdo maior de espécies moleculares hidrofóbicas na SpSM (figura 14).

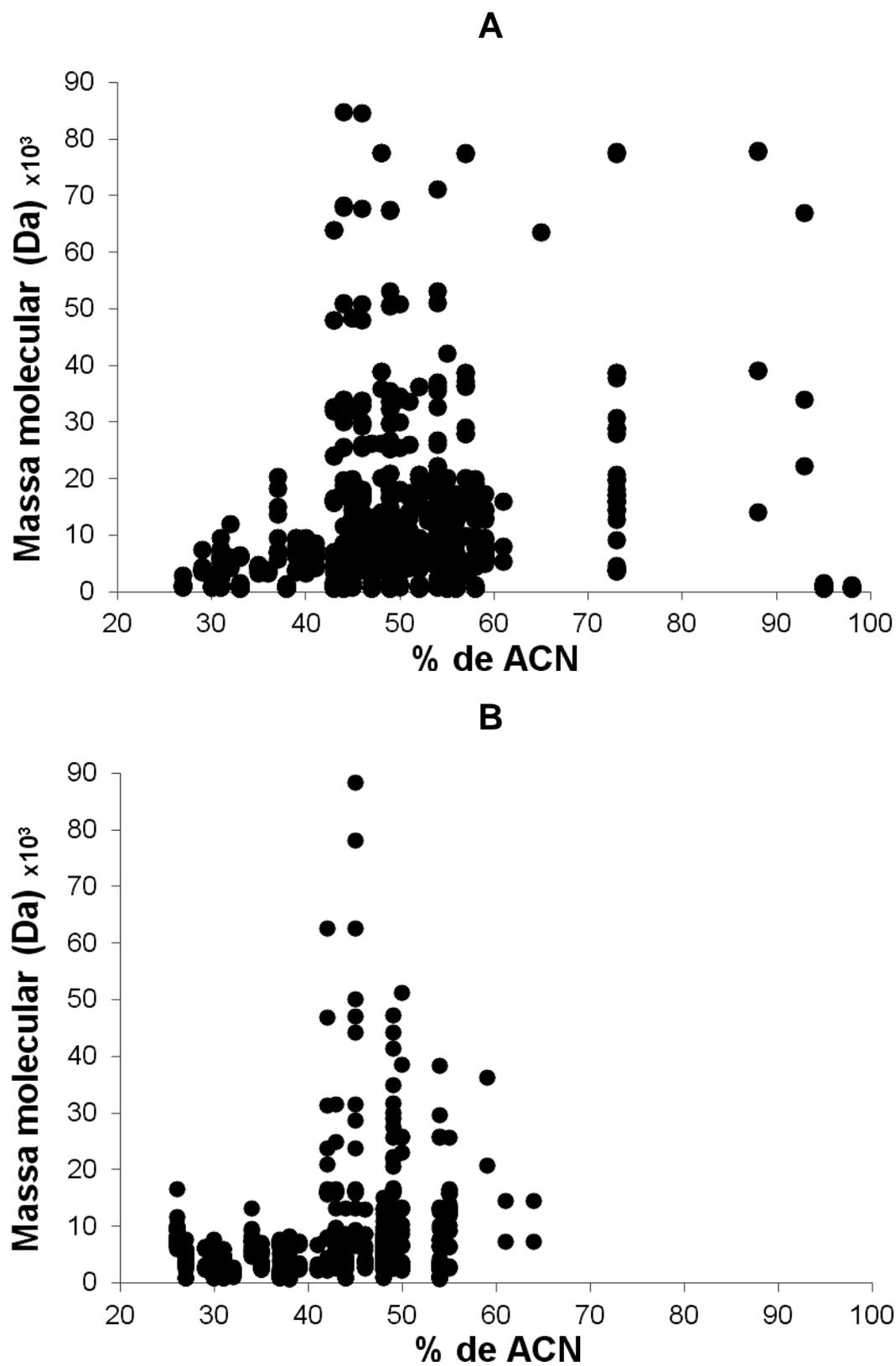
Algumas considerações importantes sobre SpV e SpSM podem ser feitas pela análise 2D-LC. Diferenças quantitativo-qualitativas em relação ao conteúdo proteico das amostras podem ser observadas: (i) a primeira fração eluída na 1<sup>o</sup> dimensão



**Figura 12:** CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL DE SpV E DE SpSM. Perfis cromatográficos bidimensionais de (A) SpV e de (B) SpSM. Cromatografia de filtração em gel (vertical) realizada em coluna Sephacryl S200 HR, equilibrada e eluída com tampão fosfato 10mM, pH 7,6 com 0,4M de NaCl (fluxo de 7,6mL/h, realizada a 4°C). Aliquotas ( $\approx 1,0$ mg) obtidas da filtração em gel foram submetidas a análise por RPC (horizontal), em sistema HPLC, usando coluna Waters Symmetry 300™ C4 5 $\mu$ m equilibrada com 0,1% de solução aquosa de TFA e eluídas utilizando gradiente segmentado até 100% de solução 0,1% de TFA em ACN com fluxo de 0,5mL/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorvância a 280nm para a primeira etapa e a 218nm para a segunda etapa de fracionamento.



**Figura 13:** DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO DA FILTRAÇÃO MOLECULAR. (A) SpV e (B) SpSM.



**Figura 14:** DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DA MASSA MOLECULAR E % DE ACN. (A) SpV e (B) SpSM.

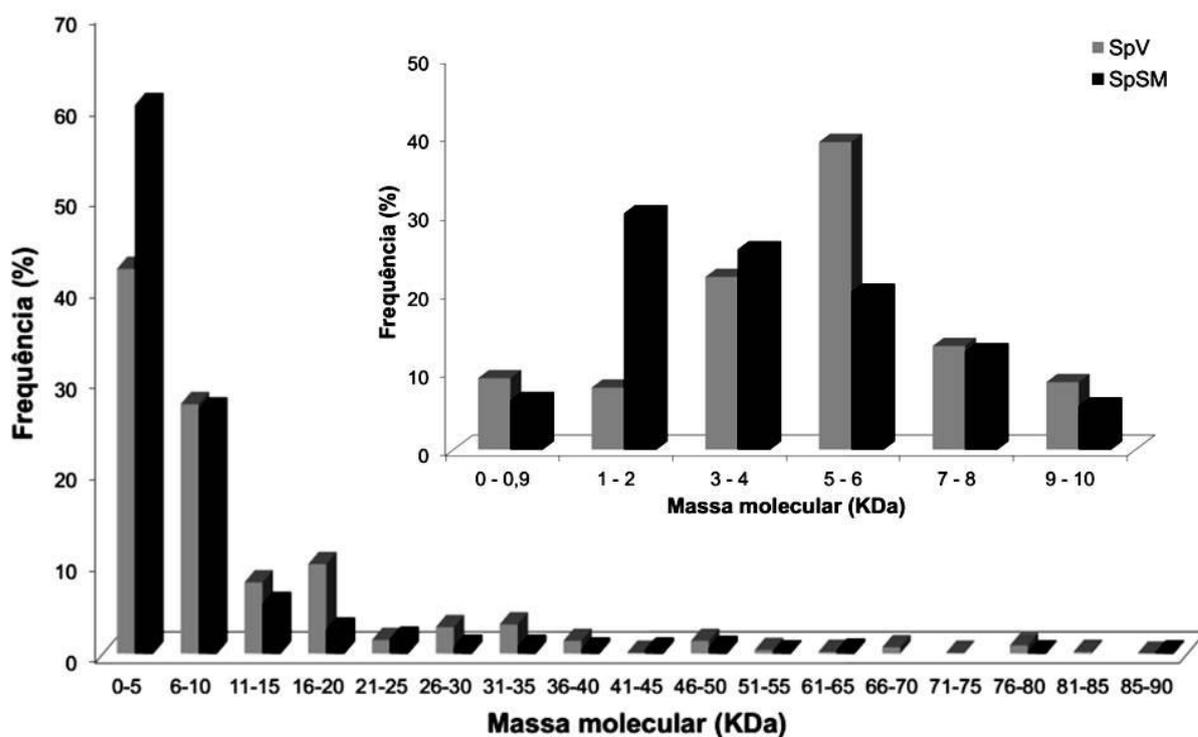
(alta massa molecular) de SpV (V1) apresenta maior conteúdo proteico que a primeira fração eluída de SpSM (M1); (ii) as frações M5, M6 e M7 são mais abundantes no muco e apresentam volume de eluição correspondentes com V5, V6 e V8 da peçonha; (iii) as frações mais retidas de SpV na cromatografia de filtração (V7 a V11), eluídas entre 306 a 405 mL apresentam componentes com interação entre 35-40% ACN, os quais não são observados nas frações com similar volume de eluição em SpSM (M7 a M10); (iv) Os perfis cromatográficos de V5 e M5, na RPC foram similares qualitativamente. Foram obtidas 3 frações protéicas (picos) eluídos com 48, 53 e 65% de ACN. Entretanto estas frações são mais abundantes no muco; (vi) algumas frações foram eluídas, fora do intervalo de fracionamento na filtração molecular, com volume de eluição maior que o volume total da coluna (>377mL). Estas podem corresponder a moléculas de baixa massa molecular que são retardadas na coluna e/ou moléculas que interagem inespecificamente com a matriz de carboidratos da resina, causando um retardo na sua eluição. Algumas destas moléculas podem apresentar um alto conteúdo de resíduos de Triptofano (Michael Richardson, comunicação pessoal).

#### 4.5.2 Análise das massas moleculares

A análise das massas moleculares das frações eluídas da segunda dimensão cromatográfica (RPC) foi realizada por MALDI-TOF. Foram identificadas (adendo), 802 massas em SpV de 512,8Da a 84.837,0 Da, e 685 em SpSM de 743,2Da a 88.414,2Da.

A figura 15 mostra a frequência percentual relativa para diferentes faixas de massas moleculares das frações analisadas em cada veneno. A maior parte das espécies moleculares apresentam massas menores que 10 kDa, (69% para SpV e 93% para SpSM). Uma redistribuição da frequência de massas dentro desta faixa molecular é mostrada na figura 15. Proteínas com massas moleculares entre 11 a 20KDa é o segundo grupo mais abundante (18% para SpV e 7% para SpSM). Proteínas com massas moleculares acima de 21KDa correspondem a 11% das amostras analisadas para a peçonha e menos de 1% para o muco. A maior massa identificada foi de 84KDa para SpV e de 88KDa para SpSM. Não foram detectadas espécies moleculares com massa entre 56 e 60 kDa e acima de 85 kDa para SpV e entre 66 e 75KDa e 81 a 85KDa para SpSM.

Do total de massa obtidas, considerando o intervalo analisado no MALDI-TOF, 0-100kDa, 18% (269 massas) são comuns às duas amostras. Trinta e seis por cento (533 massas) e 28% (416 das massas) pertencem exclusivamente a SpV e SpSM respectivamente.



**Figura 15:** DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA EM SpV E EM SpSM.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

De maneira geral o envenenamento por peixes peçonhentos envolvem manifestações locais e sistêmicas, estas últimas são resultados da difusão de toxinas para a circulação. Tem sido descrito que tanto a peçonha quanto o muco da pele de peixes contenham componentes responsáveis pelos sinais e sintomas do envenenamento, pois ambos são introduzidos na vítima pela inoculação subcutânea ou intramuscular (Church e Hodgson 2002a; Girish *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2012).

O presente trabalho foi conduzido a fim de gerar conhecimentos sobre componentes bioativos presentes nesses dois tipos de venenos encontrados no peixe-escorpião brasileiro *S. plumieri*, a peçonha produzida pelo tecido glandular dos espinhos dorsais e anais (SpV), e o muco (SpSM) encontrado na superfície da pele do peixe secretado pelas células calciformes da epiderme. Nosso objetivo foi comparar farmacológica e bioquimicamente os componentes protéicos presentes em SpV e SpSM. As atividades já descritas para a peçonha deste peixe foram avaliadas pela primeira vez no muco. Várias atividades fisio/farmacológicas, possivelmente envolvidas com a sintomatologia observada em acidentes com humanos ou em estudos experimentais com animais, induzidos por venenos de peixes e de outros animais venenosos, foram avaliadas para SpSM.

### 5.1 Caracterização farmacológica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

Considerando que a hemorragia é frequentemente observada em envenenamentos por serpentes e por alguns tipos de aranhas esta atividade foi avaliada nos dois venenos do peixe escorpião (SpV e SpSM).

Componentes diversos destas peçonhas causam hemorragia por ação direta sobre a parede dos vasos sanguíneos (Omori-Satoh *et al.*, 1995), entretanto esta atividade é principalmente associada à presença de metaloproteinases (para revisão detalhada ver Kamiguti *et al.*, 1996). Algumas proteases de peçonhas de aranhas do gênero *Loxosceles* provocam o rompimento da membrana basal e são citotóxicas para células endoteliais, levando à perda da integridade dos vasos (Silveira *et al.*, 2002). Este efeito citotóxico foi reportado para a peçonha do peixe-sapo

*Thalassophryne nattereri*, a qual exerce forte efeito citolítico em plaquetas e células endoteliais causando conseqüente aumento na permeabilidade vascular e distúrbios hemostáticos (Lopes-Ferreira *et al.*, 2002).

No presente trabalho, não foi detectada atividade hemorrágica direta após a administração de 75ug de proteínas de SpV e de SpSM. Entretanto esta atividade foi anteriormente descrita para a peçonha de *S. plumieri* por Carrijo *et al.*, (2005) empregando mesma metodologia.

Essas observações contraditórias poderiam ser explicadas pela mudança no padrão de resposta como resultado da utilização de diferentes extratos/lotos de veneno nos ensaios. Tem sido descrito na literatura que podem ocorrer oscilações na produção, composição e potencial tóxico de venenos para uma mesma espécie de peixe (Garnier *et al.*, 1995). Além disso, a presença de proteases em SpV e/ou SpSM poderiam estar envolvidas na hidrólise de proteínas bioativas com conseqüente perda de suas atividades.

Propriedades citolíticas, incluindo a hemolítica, também são comuns em peçonhas animais. Sugere-se que proteínas e peptídeos citolíticos desempenhem um papel importante na realização de ações de ataque e defesa em uma série de organismos pela lise celular através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Sivan, 2009). A atividade hemolítica *in vitro* de uma determinada amostra biológica, pode ser caracterizada como hemólise direta sobre a membrana das hemácias ou hemólise indireta, a qual é mediada pelos lisofosfatídeos liberados por ação de fosfolipases A em fosfolipídeos exógenos a membrana (Carlson *et al.*, 1971).

Como já descrito anteriormente por Carrijo *et al.* (2005), a peçonha bruta de *S. plumieri* (SpV) apresenta intensa atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho. No presente trabalho foi demonstrado que as doses de 1 e 10µg/mL, nas condições do ensaio, foram suficientes para causar ≈30 e 100 % de hemólise respectivamente. Entretanto, ao testarmos uma dose de 100µg/mL para SpSM, esta não foi capaz de induzir hemólise. A ausência de atividade hemolítica para as amostras de SpSM sobre eritrócitos sugere que a molécula responsável por esta atividade seja exclusiva da peçonha de *S. plumieri*.

Em peçonhas de serpentes o efeito hemolítico é mediado por atividade de fosfolipases PLA<sub>2</sub>. Neste trabalho, utilizando meio de cultura enriquecido com gema do ovo, demonstrou-se que tanto SpV quanto SpSM são destituídos de atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, confirmando que a atividade hemolítica da peçonha de *S. plumieri*

ocorre de forma direta sobre os eritrócitos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual relata ausência destas estearases em peçonhas de peixes, (revisado por Church e Hodgson, 2002a).

A atividade hemolítica de peçonhas de peixes está relacionada com a ação de potentes toxinas proteicas de alta massa molecular (Garnier *et al.*, 1995; Chhatwal e Dreyer, 1992; Andrich *et al.*, 2010; Poh *et al.*, 1991; Colasante *et al.*, 1996), denominadas citolisinas. As citolisinas, Sp-CTX, SNTX e neoVTX, com potente atividade hemolítica foram purificadas a partir das peçonhas de *S. Plumieri* e dos peixes pedra *S. horrida* e *S. verrucosa* respectivamente (Andrich *et al.*, 2010, Gomes *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 1997 e Ueda *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que a hemólise induzida por estas toxinas é devido a formação de poros na membrana (Chen *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2013). Esta observação está de acordo com o nosso dado, que demonstra que a peçonha de *S. plumieri* não apresenta atividade fosfolipásica.

A capacidade das toxinas de formarem poros na membrana celular, além de estar relacionada com a atividade hemolítica, também está associada com outros efeitos farmacológicos induzidos por essas citolisinas. Por exemplo, a melitina, um peptídeo isolado do veneno de abelha, induz vasodilatação dependente do endotélio. Esse peptídeo forma poros na membrana celular através dos quais ocorre o influxo de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez, culmina na liberação de óxido nítrico e resulta no vasorrelaxamento dependente do endotélio (Rapoport *et al.*, 1989).

Apesar da ausência de proteínas hemolíticas sobre eritrócitos de coelho em SpSM, a ação citolítica deste extrato sobre outros tipos celulares ou membranas biológicas não pode ser descartada, pois estudos preliminares demonstraram a capacidade de SpSM em inibir o crescimento de alguns tipos de bactérias em cultura (dados não mostrados). Além disso, a ação citolítica de secreções mucosas cutâneas de peixes tem sido associada a peptídeos antimicrobianos - AMP's produzidos pelas células epiteliais (Rakers *et al.*, 2013).

O sequenciamento “de novo” de pequenos peptídeos detectados por análise proteômica poderia ser empregado para pesquisar a presença de AMP's no extrato do muco de *S. plumieri*.

Entretanto, recentemente Ghafari e colaboradores (2013), relataram pela primeira vez, a presença de atividade fosfolipásica C (PLC) no veneno bruto de um peixe, “scat” pintado (*Scatophagus argus*). Além disso, Barbaro e colaboradores

(2007), utilizando altas doses do conteúdo protéico extraído de tecidos tegumentários que recobrem os ferrões das arraiais *Potamotrygon falkneri* e *Dasyatis guttata*, detectaram atividade PLA<sub>2</sub>, mesmo que pouco expressiva nestes extratos.

Considerando que o sistema cardiovascular, tem importante papel na manutenção da homeostase, este constitui alvo relevante para toxinas de venenos animais. A atividade cardiovascular parece ser o efeito dominante das peçonhas de peixes e historicamente tem sido objeto da maioria das pesquisas (Church e Hodgson, 2002a). A hipotensão tem sido relatada como um dos sintomas clínicos da maioria dos envenenamentos envolvendo seres humanos (Sivan, 2009).

Os resultados deste trabalho mostraram que SpV (dose de 300µg/kg) foi capaz de induzir em ratos anestesiados, um aumento da pressão arterial (PA) acompanhada de bradicardia, sendo estes efeitos imediatos e transientes. O padrão de resposta observado no presente trabalho para a PA está de acordo com o relatado por Gomes *et al.* (2010). Estes autores observaram que doses de 14-108µg/Kg, induziam um efeito hipertensor em ratos. Entretanto, em dose semelhante à utilizada neste trabalho estes mesmos autores observaram uma resposta característica bifásica, consistindo de aumento seguido por uma queda brusca da PAM, acompanhada de bradicardia e posterior óbito do animal. No entanto, o efeito hipotensor não foi observado em nossos experimentos. Essas diferentes observações, como já descrito, podem ser devido às diferenças na composição do veneno, o qual foi extraído em diferentes lotes. Entretanto, a bradicardia observada pode ser resultante de algum mecanismo de compensação, como barorreflexo, em resposta ao aumento da PAM.

Os efeitos das peçonhas písceas sobre o coração parecem estar relacionados a diferentes mecanismos, como a atividade sobre receptores adrenérgicos e muscarínicos (Church e Hodgson, 2002a) tanto pela ação de mediadores químicos contidos na peçonha (Hopkins *et al.*, 1996) quanto pela liberação de autacóides endógenos dos tecidos cardíacos por componentes proteicos da peçonha (Carlson *et al.*, 1971; Hopkins e Hodgson, 1998b; Church e Hodgson, 2002a).

Tem sido sugerido que as toxinas hemolíticas de venenos de peixe são toxinas multifuncionais e as responsáveis pelos principais efeitos causados por suas peçonhas. Vários autores têm demonstrado que a atividade citolítica das toxinas hemolíticas, poderia ser responsável pelas respostas cardiovasculares induzidas

pelas peçonhas de peixes, já que toxinas “perturbadoras” de membrana poderiam afetar o comportamento normal das células endoteliais e da função cardíaca, desencadeando influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e uma subsequente ativação da cascata de síntese de óxido nítrico (NO), levando ao vasorrelaxamento e à hipotensão (Low *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997; Church e Hodgson, 2002a).

Estudos recentes demonstraram que a toxina hemolítica da peçonha de *S. plumieri*, Sp-CTx, induz potentes efeitos cardíacos e celulares. “*In vivo*”, a toxina reproduziu os efeitos causados por SpV: aumento seguido de redução da pressão arterial sistólica e diastólica, e também reduziu a frequência cardíaca em ratos anestesiados, porém com ação quatro vezes mais potente (Gomes, 2013). A ação vasodilatadora de Sp-CTx, está relacionada com a produção de NO endotelial (Andrich *et al.*, 2010).

Esta “multifuncionalidade” das toxinas citolíticas de peçonhas de peixes provavelmente está relacionada com sua propriedade de “perturbar” (ou mesmo romper, dependendo do tipo de célula) as membranas biológicas (Kreger, 1991).

Contrariamente ao potente efeito cardiovascular observado para a peçonha bruta SpV, o muco da pele de *S. plumieri* (SpSM - 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) não foi capaz de induzir alteração significativa nos parâmetros cardiovasculares analisados no presente estudo.

Este resultado está de acordo com o estudo conduzido por Junqueira *et al.*, (2007), que não observaram efeito do muco da pele de *Cathorops spixii* sobre diâmetro da parede arteriolar da rede microcirculatória.

Além deste efeito sistêmico característico das peçonhas de peixes, o desenvolvimento de dor intensa e edema local na área de lesão são sinais comuns e pronunciados em pacientes que sofrem acidentes com peixes peçonhentos de diferentes filós (Haddad Jr. *et al.*, 2003).

Assim como relatado nos acidentes envolvendo seres humanos (Haddad Jr. *et al.*, 2003), neste trabalho, usando o teste da pata de camundongo, foi observado que SpV (60 $\mu\text{g}$ ) induziu resposta edematogênica com aumento de quase 100% da espessura da pata injetada, assim como intensa nocicepção local.

Esse resultado apresenta-se em concordância com os obtidos por Menezes e colaboradores (2012), os quais relataram que a atividade inflamatória da peçonha de *S. plumieri*, é caracterizada por edema local intenso dose-dependente, e comportamento característico de nocicepção. Foi demonstrado que ocorre a

liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) e quimiocinas (MCP-1) o que acarreta em um infiltrado de células inflamatórias (neutrófilos e células mononucleares), e que o sistema caliceína cinina desempenha um papel fundamental no edema evocado pelo veneno de *S. plumieri* (Menezes *et al.*, 2012).

Os efeitos inflamatórios desencadeados pela peçonha do peixe-escorpião foram associados com a atividade da fração hemolítica de SpV, sugerindo que a toxina multifuncional, Sp-CTx, pode também ser responsável pelo desencadeamento da resposta inflamatória (Menezes *et al.*, 2012). De fato, a atividade formadora de poros em membranas biológicas exibida por toxinas hemolíticas e/ou citolíticas parece ser uma característica comum entre muitos animais cujos venenos são conhecidos por produzirem dor, tais como os venenos de outros animais marinhos (p. ex. medusas e anêmonas do mar), a melitina do veneno de abelha (Pawlak *et al.*, 1991) e o veneno do ornitorrinco (Kourie, 1999).

Entretanto, no presente trabalho, padrões de respostas inflamatórias com aumento da espessura da pata e nocicepção, não foram observados quando amostras (60ug) do muco da pele de *S. plumieri* (SpSM) foram injetadas na pata do camundongo, demonstrando que o muco não contribui para a resposta inflamatória provocada pela peçonha.

Diferente dos nossos resultados, Monteiro-dos-Santos e colaboradores em 2011 demonstraram que tanto o veneno quanto o muco da arraia *Potamotrygon*. Cf. *Henlei* apresentaram atividade nociceptiva e edematogênica.

No presente trabalho, os nossos resultados demonstram que o muco da pele de *S. plumieri* não apresentou padrões de resposta hemolítica, cardiovascular e inflamatória, esses resultados fortalecem a hipótese por nós levantada de que Sp-CTx, uma toxina multifuncional, seja produzida exclusivamente pela glândula secretora da peçonha.

## 5.2 Caracterização bioquímica da peçonha e do muco da pele do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri*

Conforme descrito na introdução, as enzimas são componentes comuns em venenos animais e estão envolvidas tanto com seus efeitos locais quanto sistêmicos. Estas apresentam grande interesse médico e farmacêutico sendo utilizadas como instrumentos de investigação de sistemas fisiológicos.

Os resultados dos ensaios para detecção de atividades enzimáticas na peçonha e no muco da pele de *S. plumieri* demonstraram a presença de atividade proteolítica sobre a gelatina e sobre o fibrinogênio para ambas as amostras, entretanto, a atividade hialuronidásica parece ser exclusiva da peçonha desse peixe.

A presença de atividade gelatinolítica foi anteriormente descrita por Carrijo e colaboradores (2005) para a peçonha do peixe-escorpião. A enzima de responsável por esta atividade foi purificada e denominada Sp-GP (*Scorpaena plumieri* Gelatinolytic Protease) por Carrijo *et al.* (2005). Entretanto, nossos resultados demonstraram pela primeira vez a presença a presença de enzimas proteolíticas no muco da pele do peixe-escorpião *S. plumieri*. Pode ser sugerido que a atividade gelatinolítica encontrada no muco, possa ser de Sp-GP, pois a degradação proteica no ensaio por zimografia de ambas as amostras de *S. plumieri* foi visualizada na mesma região do gel, sugerindo uma mesma massa molecular.

Também foi observado neste trabalho atividade proteásica da peçonha e do muco de *S. plumieri* sobre as cadeias do fibrinogênio. O muco apresentou ampla especificidade, degradando todas as cadeias do fibrinogênio ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e a peçonha somente a cadeia “ $\alpha$ ”. A cinética de degradação observada foi lenta, somente ocorrendo após várias horas de incubação, o que sugere uma ação inespecífica sobre o fibrinogênio, podendo esta hidrólise ser produzida pela mesma enzima responsável pela degradação da gelatina. A degradação das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , observada para as amostras de SpSM, poderia ser explicada pela maior proporção desta enzima em SpSM em comparação ao conteúdo de SpV.

Enzimas que afetam a coagulação sanguínea, “proteases”, têm sido extensivamente caracterizadas em venenos de serpentes (para revisão ver Markland, 1998; Serrano e Fox, 2005), as quais contribuíram e ainda tem contribuído muito para a investigação de mecanismos envolvidos na coagulação sanguínea. Entretanto, até a presente data existem poucos relatos na literatura a respeito destas enzimas em peçonhas/venenos de peixes. A presença de atividade proteolítica sobre a gelatina também foi descrita no veneno da arraia (*Potamotrygon falkneri*) e sobre o fibrinogênio nos venenos das arraias *Dasyatis sephen* e *Aetobatis narinari* e da água-viva *Aurelia aunita* (Haddad *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2011 e Lee *et al.* 2011).

A presença de proteases também têm sido relatada no muco da pele do salmão do atlântico (*Salmo salar*) (Firth *et al.*, 2000) e do peixe tambacu (Salles *et*

*al.*, 2007). Fast e colaboradores (2002) têm sugerido que estas enzimas no muco são secretadas a partir de células epidérmicas e/ou transportados a partir do soro para células e tecidos alvo sendo difundidas para a camada mucosa. Considerando nossos resultados e também o exposto acima sugere-se que Sp-GP não é uma proteína exclusiva da peçonha. Um dado que corrobora com esta hipótese é a identidade de  $\approx 30\%$  que Sp-GP exibe com proteínas da família da hemopexina, glicoproteínas de soro relacionadas principalmente com transporte/metabolismo do grupo heme (Andrich, 2005 e Delanghe e Langlois, 2001).

Entretanto, pouco é conhecido sobre a função/presença de protease no muco da pele de peixes. De acordo com Aranishi e colaboradores 1998, estas apresentam função protetora e podem atuar diretamente sobre o agente patogênico promovendo sua lise ou indiretamente impedindo a invasão do patógeno pela modificação da consistência do muco com a finalidade de aumentar o seu desprendimento da camada superficial do epitélio, e dessa forma, removendo também os agentes patogênicos que se encontram nessa secreção (Aranishi *et al.*, 1998).

Além disso, como já discutido, proteases também atuam como “fatores de dispersão”, podendo degradar constituintes da matriz extracelular e dos tecidos conectivos, acelerando a absorção e difusão de outros componentes do veneno.

Além das proteases, as hialuronidasas também são enzimas consideradas “fatores de dispersão”. Estas se encontram amplamente distribuídas em uma variedade de venenos animais, tais como em serpentes (Kemparaju e Girish, 2006), abelhas (Owen, 1983), répteis (Tu e Hendon, 1983) e escorpiões (Ramanaiah *et al.*, 1990).

No presente trabalho, intensa atividade hialuronidásica foi detectada em amostras de SpV contendo 5, 10 e 20 $\mu$ g de proteínas. Entretanto, esta atividade não foi detectada em amostras do muco (SpSM), (figura 11). Isso é sugestivo de que o componente ativo sobre o ácido hialurônico seja produzido exclusivamente pelas glândulas secretoras de veneno deste peixe.

Apesar de atividade hialuronidásica ter sido descrita em várias peçonhas de peixes, somente três hialuronidasas foram purificadas e caracterizadas a partir destas peçonhas: de *P. motoro* (Magalhães *et al.*, 2008), de *S. horrida* (Poh *et al.*, 1992; Sugahara *et al.*, 1992) e a SpH (*Scorpaena plumieri* Hialuronidase) de *S. plumieri* (Cassoli, 2008). Esta última apresenta massa molecular de 76,92kDa, e seu efeito dispersante foi confirmado pela sua capacidade de promover o aumento da

área hemorrágica na pele dorsal de camundongos, quando injetada simultaneamente com a toxina hemorrágica Leucurolisina- $\beta$  da serpente *Bothrops leucurus* (Cassoli, 2008).

Levando-se em consideração que a hialuronidase isolada do peixe-pedra *S. horrida* foi obtida das glândulas produtoras de veneno tanto por extração/purificação (Poh *et al.*, 1992) como por clonagem/biologia molecular (Ng *et al.*, 2005), essas observações reiteram a hipótese por nós levantada de que essa enzima seja exclusiva da peçonha de *S. plumieri*, não se relacionando com componentes do muco.

A aglutinação de hemácias induzida por extratos de origem vegetal ou animal, como os venenos, tem sido associada à atividade de moléculas proteicas com propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas (Kilpatrick, 2002; Sharon e Lis, 2004).

Neste trabalho também foi demonstrado que o muco da pele de *S. plumieri*, apresenta atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho na concentração mínima hemaglutinante de 2,5mg/mL. Este ensaio não foi realizado com a peçonha devido à intensa hemólise que esta causa nos eritrócitos, impedindo a visualização do processo de aglutinação no ensaio.

Entretanto, a atividade hemaglutinante pôde ser identificada em SpV após separação do componente hemolítico por filtração molecular (Andrich, 2009). Este mesmo autor isolou 6 isoformas de uma lectina tipo C (Sp-Lec - *Scorpaena plumieri* Lectin). Apesar de sua caracterização bioquímica estar descrita, pouco se sabe sobre sua função e o possível papel no envenenamento causado por *S. plumieri*. Lectinas tipo C (dependentes de  $Ca^{+2}$ ) tem sido descritas em peçonhas de serpentes (Chen e Tsai, 1995; Polgár *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 2005), e também na peçonha peixe *Thalassophryne nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 2011).

Outra lectina detectada na peçonha/muco de *S. plumieri*, ainda que sua atividade hemaglutinante não tenha sido testada, foi caracterizada como tipo B, com capacidade de interferir fortemente com a interação entre a integrina  $\alpha 1\beta 1$  e o colágeno tipo IV. Esta lectina denominada Plumieribetin, é expressa tanto nas glândulas de veneno e/ou muco da pele, sugerindo seu caráter defensivo (Evangelista *et al.*, 2009).

Devido o importante papel das integrinas em numerosas reações celulares, tais como o espalhamento, migração, sobrevivência, proliferação e a diferenciação

das células e a ativação de genes (Hynes, 2002; Arnaout *et al.*, 2005), lectinas de peçonhas animais, tais como plumeribetina e a rodocetina (Evangelista *et al.*, 2009; Eble *et al.*, 2002) que desfazem a ligação de integrinas com proteínas da matriz extracelular tem sido foco de vários estudos, com o objetivo de desenvolvimento de fármacos para várias situações fisiopatológicas.

Além disso, os achados reforçam a noção de que as lectinas de muco da pele têm evoluído com uma marcada diversidade molecular em peixes (Tsutsui *et al.*, 2009). Portanto, novos estudos devem ser empregados para a busca de lectinas no muco da pele de *S. plumieri*, visando o conhecimento de suas informações estruturais e a busca de sua ação funcional contra as bactérias e também contra parasitas eucariontes para uma melhor compreensão de seu papel nessa secreção.

Na tabela I encontra-se um resumo das atividades observadas para SpSM comparativamente com as já descritas para SpV.

**Tabela 1:** COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO E DO MUCO DA PELE DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri*.

Atividade	Extrato		Molécula(s) Envolvida(s)	Possível Origem	Sintomas no Envenenamento	Função no Muco	Referências Relacionadas*
	Veneno (SpV)	Muco (SpSM)					
Gelatinolítica	+	+	Sp-GP	Células da epiderme (?). Células produtoras de muco.	Distúrbios da MEC, lentidão na cicatrização tecidual; Fatores de dispersão.	Proteólise de patógenos invasores	Carrijo <i>et al.</i> , 2005
Fibrinogenolítica	+( $\alpha$ )	+( $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ )					Presente trabalho
Hialuronidásica	+	-	SpH	Glândulas secretoras da peçonha.		-	Cassoli, 2008
Fosfolipásica A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	Presente trabalho
Lectinas Hemaglutinante Inibitória de integrinas	+	+	Sp-Lec Plumieribetin (?)	Células produtoras de muco.	Distúrbios da MEC, lentidão na cicatrização tecidual;	Aglutinação de patógenos	Andrich, 2009; Evangelista <i>et al.</i> , 2009
Hemorrágica	+ <sup>#</sup>	-	?	-	Aumento da permeabilidade vascular, dor e edema.	-	Carrijo <i>et al.</i> , 2005
Inflamatória	+	-				-	Menezes <i>et al.</i> , 2012
Hemolítica	+	-	Sp-CTx	Glândulas secretoras da peçonha.	Efeitos sistêmicos; Taquicardia/arritmia.	-	Carrijo <i>et al.</i> , 2005; Andrich <i>et al.</i> , 2010
Cardiovascular	+	-				-	Gomes <i>et al.</i> , 2010; Gomes, 2013

\*As referências citadas são relacionadas às atividades de SpV; Todas as atividades referentes a SpSM foram descritas no presente trabalho;

<sup>#</sup> Resultado relatado por Carrijo (2005).

### 5.3 Análise proteômica parcial dos venenos de *S. plumieri*

No presente estudo, a abordagem 2D-LC-MS foi empregada para obter e comparar o proteoma parcial do muco e da peçonha de *S. plumieri*. Essa estratégia incluiu: (i) separação das proteínas utilizando cromatografia de filtração em gel convencional; (ii) cromatografia de fase reversa das frações da gel filtração utilizando HPLC; (iii) análise das frações da fase reversa por espectrometria de massa MALDI-TOF (figuras 12 e 15). Um total de 1487 espécies moleculares (Adendo) foi encontrado como sendo exclusivo e comum para os venenos de *S. plumieri*.

A análise proteômica revelou massas moleculares com valores semelhantes às de toxinas já purificadas a partir da peçonha de *S. Plumieri*, mostradas na tabela II. Essas proteínas foram detectadas nas mesmas frações da cromatografia de gel filtração (figura 12) que foram utilizadas para sua posterior purificação: Sp-CTx em V2 (Andrich *et al.*, 2010); Sp-H em V3 (Cassoli, 2008); Plumieribetin, lectina tipo B, em V6 (Evangelista *et al.*, 2009); Sp-Lec, lectinas tipo c, em V7 e V8 (Andrich, 2009).

As massas correspondentes a Sp-CTx e Sp-H, foram detectadas somente em SpV. Estes dados em conjunto com os obtidos nas análises farmacológicas e bioquímicas (tabela I) reforçam a hipótese de que Sp-CTx e Sp-H são produzidas exclusivamente nas glândulas de peçonha do peixe-escorpião, desempenhando um papel fundamental na fisiopatologia do envenenamento.

Esses dados estão de acordo com a literatura, pois a sequência de uma hialuronidase isolada de *S. horrida* (Poh *et al.*, 1992) e de duas citolisinas Stonustoxin e Verrucotoxin isoladas de *S. horrida* e *S. verrucosa* respectivamente, foram deduzidas através da clonagem e sequenciamento do cDNA codificante obtidas exclusivamente das glândulas produtoras de veneno (Ghadessy *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1997).

Entretanto, não podemos inferir a origem das lectinas, pois massas moleculares correspondentes às de Plumieribetina e Sp-Lec foram detectadas tanto em SpV quanto em SpSM. Este resultado da análise de massas esta de acordo com Evangelista e colaboradores, (2009), que obtiveram a “Plumieribetin” pura, tanto da SpV-V6 como de SpSM-M6. Uma maior absorção dos componentes da fração M6 comparado com a de V6, sugere uma maior quantidade de “Plumieribetin” em SpSM que em SpV.

**Tabela 2:** COMPARAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES ENCONTRADAS PARA SpV E PARA SpSM COM ÀS DE TOXINAS PURIFICADAS DO VENENO DE *S. plumieri*.

Toxina	Massa Molecular (KDa)	Massa encontrada para (KDa):		Referência	
		SpV <sup>a</sup>	SpSM <sup>a</sup>		
Sp-H	76,9	77,5	Ne <sup>b</sup>	Cassoli, 2008	
Plumieribetin	13,2	13,1	13,1	Evangelista <i>et al.</i> , 2009	
Sp-CTx	65,2	66,9	Ne <sup>b</sup>	Andrich <i>et al.</i> , 2010	
Sp-Lec	I	15,8	15,9	Andrich, 2009	
	II				
	III	16,9	16,8		16,7 <sup>c</sup>
	IV				
	V				
	VI	16,8	16,8		16,7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Quando mais de uma massa, essas foram representadas pela média.

<sup>b</sup> Ne, não encontrado.

<sup>c</sup> Valores encontrados em frações com volume de eluição diferente do originalmente descrito (ver texto).

Massas correspondentes a Sp-Lec (tabela II), foram encontradas distribuídas nas frações (V7 a V11) eluídas da RPC com retenção entre 25-55% de ACN para as amostras de SpV. Essas massas assemelham-se às apresentadas para as diferentes isoformas de Sp-Lec (tabela II), com os dados anteriormente obtidos por nosso grupo de pesquisa (Andrich, 2009). Entretanto, componentes com características semelhantes não foram detectados em frações com volume de eluição similar obtidas a partir da cromatografia de exclusão molecular de SpSM (M7 a M10), sendo sugestivo que Sp-Lec seja uma molécula exclusiva do veneno de *S. plumieri*. Apesar desta ausência de Sp-Lec em SpSM observada nas RPCs (figura 12, eixo X), este dado necessita de confirmação já que análises por MALDI-TOF-MS não foram realizadas nas frações de fase reversa obtidas a partir de M7-M10.

Dados da literatura sobre peixes peçonhentos também suportam estas evidências, já que transcritos encontrados na biblioteca de DNA complementar das glândulas de peçonha do peixe sapo *Thalassophryne nattereri* apresentam sequências similares às de lectinas do tipo C (Magalhães *et al.*, 2006). Além disso,

uma proteína desta mesma classe (Nattectin), cuja massa molecular e estrutura primária (15.087Da e 29% de identidade) é semelhante a Sp-Lec, foi purificada a partir desse tipo de secreção (Lopes-Ferreira *et al.*, 2011).

Embora pronunciada atividade proteolítica para substratos de gelatina foi observada para ambos os venenos, no presente trabalho as massas relativas a Sp-GP, a qual foi purificada por Carrijo *et al.* (2005), não foram incluídas na tabela II, pois a massa molecular desta protease foi estimada somente por SDS-PAGE.

Apesar de algumas frações de baixa massa molecular de SpSM e SpV, absorverem luz a 280nm terem sido detectadas na cromatografia de fase reversa estas não foram detectadas nestas amostras utilizando-se método colorimétrico para detecção de proteínas (dados não mostrados).

Componentes de natureza não protéica já foram identificados em peçonhas de peixes-pedra e incluem moléculas como a norepinefrina, triptofano e dopamina (Garnier *et al.*, 1996). Além disso, esses peixes também secretam no muco da pele toxinas de baixa massa molecular com função de “afugentar predadores” (Klaassen e Watkins, 1999), as chamadas “ichthyocrintoxins”. Entretanto, o objetivo proposto neste trabalho foi a análise de componentes proteicos de ambos os extratos (peçonha e muco da pele) de *S. plumieri*. Portanto, os componentes de natureza não proteica não foram submetidos à análise por MS, podendo ser alvo de estudos futuros.

Este trabalho contribuiu para caracterizar pela primeira vez farmacológica e bioquimicamente o muco da pele do peixe-escorpião *S. plumieri*. Ficou demonstrado que essa secreção assim como a peçonha apresenta uma mistura diversificada de componentes ativos farmacologicamente, os quais apresentam um potencial de aplicações biotecnológicas. Com os dados obtidos sugere-se que SpSM não apresenta componentes capazes de desencadear importantes reações no envenenamento. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para o conhecimento da relação das moléculas presentes no muco e na peçonha de *S. plumieri* com suas ações fisiofarmacológicas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho, contribuiu para a caracterização farmacológica e bioquímica, do muco da pele e da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*, e foi demonstrado que:

1. Os venenos (SpV e SpSM) apresentaram pronunciada atividade proteolítica sobre os substratos de fibrinogênio e gelatina;
2. SpSM apresentou atividade aglutinante para eritrócitos de coelho, e foi sugerido que esta atividade está relacionada com lectinas anteriormente purificadas: Plumieribetin (Evangelista *et al.*, 2009) e Sp-Lec (Andrich, 2009);
3. As atividades edematogênica e nociceptiva conforme descritas previamente por Menezes *et al.* (2012) e cardiovascular (Gomes *et al.*, 2010) foram exclusivas para as amostras de SpV;
4. Duas proteínas previamente isoladas da peçonha de *S. plumieri*, Sp-H (Cassoli, 2008) e Sp-CTx (Andrich *et al.*, 2010), não foram encontradas no muco da pele do peixe-escorpião, reforçando a hipótese de exclusividade de produção destas pelas glândulas de peçonha;
5. Foram encontradas 802 massas moleculares para amostras de SpV, variando de 510Da a 84KDa;
6. Foram encontradas 685 espécies moleculares para amostras do muco com massa molecular variando de 740Da a 88KDa;
7. Ambas as amostras apresentam predominância de massas <10KDa (69% para SpV e 93% para SpSM );
8. As atividades descritas para SpV e SpSM são semelhantes as de outros peixes previamente estudados.

Considerando a grande diversidade de massas identificadas, e que somente 5 proteínas foram purificadas e caracterizadas nestas amostras (Sp-GP, Sp-CTx, SpH, Plumieribetin e Sp-Lec), estes venenos podem ser considerados uma fonte potencial de moléculas de interesse farmacológico e biotecnológico.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 7 REFERÊNCIAS

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

ALEXANDER, J.B. INGRAM, G.A. Noncellular non-specific defense mechanisms of fish. **Annu. Rev. Fish Dis.**, 2:249–279. 1992

ALMEIDA, F.M., PIMENTA, A.M.C., FIGUEIREDO, S.G., SANTORO, M.M., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., DINIZ, C.R., LIMA, M.E. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, 40:1041-1045. 2002

ALSEVER, J.B., AINSLIE, R.B. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. **New York State J Med.**, 41:126. 1941

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. **Vet Immunol Immunopathol.**, 126(3–4):171–198. 2008

ANTONOV, V.K. Chemistry of proteolysis. **Springer-Verlag**. 1993

ANDRICH, F. Propriedades biológicas da peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) e purificação de uma protease gelatinolítica. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais, **Belo Horizonte**, 2005

ANDRICH, F. Purificação e caracterização de proteínas bioativas (citolisina e lectina) da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (Bloch, 1789). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, **Belo Horizonte**, 2009

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

ARANISHI, F., MANO, N., HIROSE, H. Fluorescence localization of epidermal cathepsins L and B in the Japanese eel. **Fish Physiology and Biochemistry**, 19:205-209. 1998

ARNAOUT, M.A., MAHALINGAM, B., XIONG, J.P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, 21:381-410. 2005

AUDDY, B., ALAM, M.I., GOMES, A. Pharmacological actions of the venom of the Indian catfish (*Plotosus canius* Hamilton). **Indian J. Med. Res.**, 99:47–51. 1994

AUERBACH, P.S., MCKINNEY, H.E., REES, R.S., HEGGERS, J.P. Analysis of vesicle fluid following the sting of the lionfish *Pterois volitans*. **Toxicon**, 25:1350-1353. 1987

AUSTIN, L., GILLIS, R.G., YOUATT, G. Stonefish venom: Some Biological and chemical observations. **Aust. J. Ex. Biol. Med. Sci.** 43:79-90. 1965

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, 275:63-71. 1989

BARBARO, K. C., KNYSAK, L., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, 45(4):489-99. 2005

BARBARO, C.K., LIRA, S.M., MALTA, B.M., SOARES, L.S., NETO, G.D., CARDOSO, C.L.J., SANTORO, L.M., HADDAD, J.V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, 50:676–687. 2007

BARRETT, A.J., TOLLE, D.P., RAWLINGS, A.N.D. Managing peptidases in the genomic era. **Biol Chem.**, 384(6):873-882. 2003

BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D., WOESSNER, J.F. Handbook of proteolytic enzymes. **Elsevier**, London. 2004

BIRKEMO G.A., LÜDERS T., ANDERSEN O., NES I.F., NISSEN-MEYER J. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Biochim Biophys Acta**, 1646:207–215. 2003

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venom. **Pharmacol. Ther.**, 62:325-372. 1994

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: reprolysins. **Methods Enzymol.**, 248:345-368. 1995

BOND, C.E. Biology of fishes. *Oregon State University*. Saunders College Publishing. 514 pp, 1979.

BRAGADEESWARAN, S., THANGARAJ, S. Hemolytic and antibacterial studies on

- skin mucus of eel fish, *Anguilla linnaeus* 1758. **Asian J Biol Sci.**, 4(3):272-276. 2011
- BRAIN S.D., WILLIAMS T.J. Inflammatory edema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, 86(4):855-60. 1985
- CALVETE, J.J., SANZ, L., ÂNGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. Venomn, venomics, antivenomics. **FEBS Letters.**, 583:1736-1743. 2009
- CARLSON, R.W., SCHAEFFER, R.C. Jr., LA GRANCE, R.G., ROBERTS, C.M., RUSSELL, F.E. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**, 9:379-391. 1971
- CARLSON, R.W., SCHAEFFER, R.C. Jr., WHIGHAM, H., WEIL, M.H., RUSSELL, F.E. Some pharmacological properties of the venom of the Scorpionfish *Scorpaena guttata*. II. **Toxicon**, 11:167–180. 1973
- CARRIJO, L.C., ANDRICH, F., FERREIRA-DE-LIVEIRA, R., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G. Some chemical and pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. **XXXII Reunião da SBBq. Caxambu-MG**. 2003
- 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**, 45:843-850. 2005
- CARVALHO-FILHO, A. Peixes: Costa Brasileira. São Paulo: **Melro**, 92-94. 1999
- CASSOLI, J.S. Purificação e caracterização bioquímica parcial de uma hialuronidase presente da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, **Belo Horizonte**. 2008
- CASTRO, M.M., TANUS-SANTOS, J.E., GERLACH, R.F. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacol. Res.**, 64(6):567-72. 2011
- CEVALLOS, M.A., NAVARRO-DUQUE, C., VARELA-JULIA, M., ALAGON, A.C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon**, 30(8):925-30. 1992
- CHEN, Y.L., TSAI, I.H. Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein IB antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 210:472-477, 1995.

CHEN, D., KINI, R.M., YUEN, R., KHOO, H.E. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. **Biochem. J.**, 325:685-691. 1997

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

CHHATWAL, I., DREYER, F. Isolation and characterization of dracotoxin from the venom of the greater weever fish *Trachinus draco*. **Toxicon**, 30:87-93. 1992b

CHOROMANSKI, J.M., MURRAY, T.F., WEBER, L.J. Responses of the isolated buffalo sculpin heart to stabilized venom of the lionfish (*Pterois volitans*). **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, 27:229-232. 1984

CHURCH, I.E., HODGSON, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, 40:1083-1093. 2002a

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

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

CLARK, E., GEORGE, A. Toxic soles, *Pardachirus marmoratus* from the Red Sea and *P. pavoninus* from Japan, with notes on other species. **Environmental Biology of Fishes**, 4:103-123, 1979.

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

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

COLE, A.M., DAROUICHE, R.O., LEGARDA, D., CONNELL, N., DIAMOND, G. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. **Antimicrob. Agents Chemother**, 44:2039-2045. 2000

CONCEIÇÃO, K., KONNO, K., MELO, R.L., MARQUES, E.E., HIRUMA-LIMA, C.A., LIMA, C., RICHARDSON, M., PIMENTA, D.C., LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: a

novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*. **Peptides**, 27:3039-3046. 2006

CONLON, J.M., IWAMURO, S., KING, J.D. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1163:75–82. 2009

DELANGHE, J.R., LANGLOIS, M.R. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. **Clinica Chimica Acta**, 312:13-23. 2001

EASY, R.H., ROSS, N.W. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). **Comp. Biochem. Physiol.**, D4(3):159–167. 2009

EBLE, J.A., NILAND, S., DENNES, A., SCHMIDT-HEDERICH, A., BRUCKNER, P., BRUNNER, G. Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other alpha2beta1 integrin-mediated cell functions. **Matrix. Biol.**, 21(7):547-58. 2002

ELLIS, A.E. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease process. **Dev. Biol. Stand.**, 49:337–352. 1981

ELSTON, D.M. Aquatic antagonists: lionfish (*Pterois volitans*). **Cutis**, 77(4):215-216. 2006

ESCHMEYER, W.N. Catalog of fishes. Special Publication, **California Academy of Sciences**, San Francisco, 3 vols., p. 2905. 1998

EVANGELISTA, K.S., ANDRICH, F., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G., EBLE, J.A., Plumieribetin, a fish lectin, homologous to 107 mannose-binding B-type lectins inhibits the collagen-binding alpha1beta1 integrin. **The Journal of Biological Chemistry**, 284:34747-34759. 2009

Extremamente Curioso. Disponível em:  
<http://extremamentecurioso.blogspot.com.br/2012/11/a-dor-mais-forte-do-mundo.html>. Acesso: Fevereiro de 2013.

FAHIM, F.A., MADY, E.A., AHMED, S.M., ZAKI, M.A. 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. 1996

FAIZ, M.A., FALKOUS, G., HARRIS, J.B., MANTLE, D. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, 113B:199-204. 1996

FAST, M.D., SIMS, D.E., BURKA, J.F., MUSTAFA, A., ROSS, N.W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho, and Atlantic salmon, **Comp. Biochem. Physiol.**, 132:645–657. 2002

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C., GRANER, E., MANGILI, O.C., BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxocoles intermedia*) venom. **Toxicon**, 36:1039-1051. 1998

FELICORI, L.F., SOUZA, C.T., VELARDE, D.T., MAGALHAES, A., ALMEIDA, A.P., FIGUEIREDO, S., RICHARDSON, M., DINIZ, C.R., SANCHEZ, E.F. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. **Protein Expression and Purification**, 30:32-42. 2003

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

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

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

FIRTH, K.J., JOHNSON, S.C., ROSS, N.W. Characterization of proteases in the skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) infected with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in whole-body louse homogenate. **J. Parasitol**, 86(6):1199-1205. 2000

GAO, R., ZHANG, Y., MENG, Q.X., LEE, W., LI, D.S., XIONG, Y.L., WANG, W. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from chinese green tree viper (*Trimeressurus stejnegeri*) venom. **Toxicon**, 36:457-467. 1998

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

GARNIER, P., GROSCLAUDE, J.M., GOUDEY-PERRIERE, F., GERVAT, V., GAYRAL, P., JACQUOT, C., PERRIERE, C. Presence of norepinephrine and other biogenic amines in stonefish venom. **J. Chro. B: Biomed. Appl.**, 685:364-369, 1996

GARNIER, P., DUCANCEL, F., OGAWA, T., BOULAIN, J.C., GOUDEYPERRIÈRE, F., PERRIÈRE, C., MÉNEZ, A. Complete amino-acid sequence of the beta-subunit of VTX from venom of the stonefish (*Synanceia verrucosa*) as identified from cDNA cloning experiments. **Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol.**, 1337:1-5, 1997

GHADESSY, F.J., CHEN, D., KINI, R.M., CHUNG, M.C., JEYASEELAN, K., KHOO, H.E., YUEN, R. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. **J. Biol. Chem.**, 271(41):25575-81. 1996

GHAFAARI, S.M., JAMILI, S., BAGHERI, K.P., ARDAKANI, E.M., FATEMI, M.R., SHAHBAZZADEH, F., SHAHBAZZADEH, D. The first report on some toxic effects of green scat, *Scatophagus argus* an Iranian Persian Gulf venomous fish. **Toxicon**, 66:82-87. 2013

GIRISH, K.S., MOHANAKUMARI, H.P., NAGARAJU, S., VISHWANATH, B.S., KEMPARAJU, K. Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: neutralization by *Mimosa pudica* root extract. **Fitoterapia**, 75(3-4):378-80. 2004

GOLDBERG, A.S., WASYLYK, J., RENNA, S., REISMAN, H., NAIR, M.S.R. Isolation and structural elucidation of an ichthyocrocinotoxin from the smooth trunkfish (*Lactophrys triqueter* Linnaeus). **Toxicon**, 20:1069-1074. 1982

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

GOMES, H.L., CARNIELLI, J.B., ANDRICH, F., EVANGELISTA, K.S., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., VASSALLO, D.V., FIGUEIREDO, S.G. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. **Toxicon**, 57(7-8):992-999. 2011

GOMES, H.L., ANDRICH, F., FORTES-DIAS, C.L., PERALES, J., TEIXEIRA-FERREIRA, A., VASSALLO, D.V., CRUZ J.S., FIGUEIREDO, S.G. Molecular and biochemical characterization of a cytolyisin from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: Evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. **Toxicon**, 74:92-100. 2013

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

HABERMANN, E., HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation

of phospholipases. **Analyt. Biochem.**, 50:163-173. 1972

HABERMANN, E., AHNERT-HILGER, G., CHHATWAL, G.S., BERESS, L. Delayed haemolytic action of Palytoxin. **Biochim Biophys Acta.**, 649:481-486. 1981

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

HADDAD Jr, V., MARTINS, I.A., MAKYAMA, H.M. Injuries caused by scor-pionfishes (*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. 2003

HADDAD, V. JR, NETO, D.G., de PAULA NETO, J.B., de LUNA MARQUES, F.P., BARBARO, K.C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomations in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, 43:287–294. 2004

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

HALSTEAD B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. Ed. Princeton, **NJ: The Darwin Press, Inc.**, 2nd. 1988

HARA, T.J., MACDONALD, S. Olfactory responses to skin mucous substances in rainbow trout *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.**, A54:41-44. 1976

HARRIS, J.E., HUNT, S. The fine structure of the epidermis of two species of salmonid fish, the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the brown trout (*Salmo trutta* L.): II. mucous cells. **Cell Tissue Res.**, 163(4):535–543. 1975

HASHIMOTO, Y., OSHIMA Y. Separation of grammistins A, B and C from a soapfish *Pogonoperca punctata*. **Toxicon**, 10:279-284. 1972

HEUNSSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Eletrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrilamide Gels containing Sodium Dodecyl Sulfate and copolymerized substrates. **Anal. Biochem.**, 102:196-202. 1980

HJELMELAND, K., CHRISTIE, M., RAA, J. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. **Journal of Fish Biology**, 23:13–22. 1983

HOPKINS, B.J., HODGSON, W.C., SUTHERLAND, S.K. Pharmacological studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. **Toxicon**, 32:1197-1210. 1994

HOPKINS, B.J., HODGSON, H.C., SUTHERLAND, S.K. Evidence for adrenergic and tachykinin activity in venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). **Toxicon**, 34:541-554. 1996

HOPKINS, B.J., HODGSON, W.C. Enzyme and biochemical studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) and soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venoms. **Toxicon**, 36:791-793. 1998a

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

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

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell.**, 110(6):673-87. 2002

INGRAM, G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review. **J. Fish Biol.**, 16:23–60. 1980

JAGADEESHA, D.K., SHASHIDHARA MURTHY, R., GIRISH, K.S., KEMPARAJU, K. A non-toxic anticoagulant metalloprotease: purification and characterization from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, 40(6):667-75. 2002

JOO, H.S., PARK, G.C., CHO, W.R., TAK, E., PAIK, S.R., CHANG, C.S. Purification and characterization of a prothrombin-activating protease from *Nephila clavata*. **Toxicon**, 40(3):289-96. 2002

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

KAISER, E. Enzymatic activity of spider venoms. Venoms. Buckley, E.E., Porges, N. (Ed.). American Association for the Advancement of science. **Washington, DC**, 1956

KAISER, E., RAAB, W. Collagenolytic activity of snake and spider venoms. **Toxicon**, 4(4):251-5. 1967

KAMIGUTI, A.S., HAY, C.R.M., THEAKSTON, R.D.G., ZUZEL, M. Insights into the mechanisms of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, 34(6):627-642. 1996

KAMIYA, H., SHIMIZU, Y. Marine biopolymers with cell specificity. II. Purification and characterization of agglutinins from mucous of windowpane flounder *Lophopsetta*

*maculata*. **Biochem. Biophys. Acta**, 622:171-178. 1980

KEEGAN, H.L., MacFARLANE, W.V. Venomous and poisonous animals and noxious plants of the Pacific region. **Pergamon Press**, Oxford. 1963

KEMPARAJU, K., GIRISH, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, 24:7–12. 2006

KHOO, H.E., YUEN, R., POH, C.H., TAN, C.H. Biological activities of *Synanceja horrida* (Stonefish) venom. **Nat. Toxins**, 1:54–60. 1992

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

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**, 1572(2-3):187-97. 2002

KIRIAKE, A., SHIOMI, K. Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). **Toxicon**, 58(6-7):494-501. 2011

KLAASSEN, C.D., WATKINS, J.B. Casarett & Doull's Essentials of Toxicology. **McGraw-Hill Medical Publishing**, 459 pp, 1999

KLESIOUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. Flavobacterium columnare chemotaxis to channel catfish mucus. **FEMS Microbiol. Lett.**, 288:216–220. 2008

KONDO, H., KONDO, S., IKEZAWA, H., MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, 13:43-52. 1960

KOURIE, J.I. A component of platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) venom forms slow-kinetic cation channels. **J. Membr. Biol.**, 172:37-45. 1999

KREGER, A.S. Detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). **Toxicon**, 29:733-743. 1991

KREGER, A.S., MOLGÓ, J., COMELLA, J.X., HANSSON, B., THESLEFF, S. Effects of stonefish (*Synanceia trachynis*) venom on murine and frog neuromuscular junctions. **Toxicon**, 31(3):307-317. 1993

KREIL, G. Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. **Protein Sci.**, 4(9):1666-9. 1995

KUMAR, K.R., VENNILA, R., KANCHANA, S., ARUMUGAM, M., BALASUBRAMANIAM T. Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. **J Thromb Thrombolysis**, 31(4):464-471. 2011

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

LEE, H., JUNG, E.S., KANG, C., YOON, W.D., KIM, J.S., KIM, E. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. **Toxicon**, 58(3):277-84. 2011

LEWIS, R.J., GARCIA, M.X. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Review**, 2:790-802. 2003

LIMA, C., CLISSA, P.B., PIRAN-SOARES, A.A. TANJONI, I., MOURA-DA-SILVA, M.M., LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model tissue injury. **Toxicon**, 42:499-507. 2003

LOPES-FERREIRA, M., BARBARO, K.C., CARDOSO, D.F., MOURA-DA-SILVA, A.M., MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, 36:405–410. 1998

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

LOPES-FERREIRA, M., MOURA-DA-SILVA, A.M., PIRAN-SOARES, A.A., ÂNGULO, Y., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., FARSKY, S.H.P. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium- mediated blood flow impairment. **Toxicon**, 40:1141-1147. 2002

LOPES-FERREIRA, M., EMIM, J.A., OLIVEIRA, V., PUZER, L., CEZARI, M.H., ARAÚJO, M., JULIANO, L., LAPA, A.J., SOUCCAR, C., MOURA-DA-SILVA, A.M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, 68:2151-2157. 2004

LOPES-FERREIRA, M., MAGALHÃES, G.S., FERNANDEZ, J.H., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L., LE, H.P., LIMA, C., VALENTE, R.H., MOURA-DA-SILVA, A.M. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie.**, 93(6):971-980. 2011

LOW, K.S.Y., GWEE, M.C.E., YUEN, R., GOPALAKRISHNAKONE, P., KHOO, H.E. Stonustoxin: a highly potent endothelium dependent vasorelaxant in the rat. **Toxicon**, 31:1471–1478. 1993

LOWRY, O.H., ROSENROUGH, N.I., FAAR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193:265-275. 1951

MADOKORO, M., UEDA, A., KIRIAKE, A., SHIOMI, K. Properties and cDNA cloning of a hyaluronidase from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. **Toxicon**. 58(4):285-92. 2011.

MAGALHÃES, G.S., LOPES-FERREIRA, M., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., SPENCER, P.J., ARAÚJO, M.S., PORTARO, F.C., MA, L., VALENTE, R.H., JULIANO, L., FOX, J.W., HO, P.L., MOURA-DA-SILVA, A.M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, 87(8):687-699. 2005

MAGALHÃES, G.S., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., LOPES-FERREIRA, M., LORENZINI, D.M., HO, P.L., MOURA-DA-SILVA, A.M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, 88(6):693-699. 2006

MAGALHÃES, K.W., LIMA, C., PIRAN-SOARES, A.A., MARQUES, E.E., HIRUMA-LIMA, C.A., LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. **Toxicon**, 47(5):575-583. 2006

MAGALHÃES, M.R., DA SILVA Jr., N.J., ULHOA, CIRANO J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. **Toxicon**, 51(6):1060-1067. 2008

MARETIC, Z. Fish venoms. In:Handbook of Natural Toxins: Marine Toxins and Venoms. **Ed. Marcel Dekker, New York.**, 445–477. 1988

MÁRIO. Disponível em: <http://mariolinsafrika.blogspot.com.br/>. Acesso: Fevereiro de 2013.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36:1749–1800. 1998

McCORMICK, K.D., MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J. Chem. Ecology**, 19(10):2411-2451. 1993

McINTOSH, M., CRUZ, L.J., HUNKAPILLER, M.W., GRAY, W.R., OLIVEIRA, B.M.

Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 454:428-435. 1982

MEBS, D. Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, toxinologists, physicians and pharmacists. *In: Medpharm Scientific Publ.*, p. 365, Stuttgart. 2002

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**, 60:4-11. 2012

MENZEL, E. E FARR, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**, 131(1):3-11. 1998

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

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J., CONCEIÇÃO, K., SEIBERT, C.S., MARQUES, E.E., SILVA, P.I. JR, SOARES, A.B., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. Henlei*. 11(9):1368-1377. 2011

MORITA, T. Structure-function relationships of C-type lectin-related proteins. **Pathophysiol Haemost Thromb.**, 34:156-159, 2005

MORRISSEY, J.H. Coagulation factor VIIa. In Handbook of proteolytic enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (eds.). **Academic Press, London, U.K.**, 161–163. 1998

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

NAKAMURA, O., MATSUOKA, H., OGAWA, T., MURAMOTO, K., KAMIYA, H., AND WATANABE, T. Opsonic effect of congerin, a mucosal galectin of the Japanese conger, *Conger myriaster* (Brevoort). **Fish. Shellfish Immunol.**, 20:433-435. 2006

NAKAR, O., OVADIA, M., KOCHVA, E. Isolation and characterization of a proteolytic factor from the venom of *Vipera palaestinae*. **Toxicon**, 24(3):293-304. 1986

NAVAL. Disponível em: <http://www.naval.wiki.br/>. Acesso: Fevereiro de 2013.

NG, H.C., RANGANATHAN, S., CHUA, K.L., KHOO, H.E. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). **Gene**, 346:71-81. 2005

NIGAM, A.K., KUMARI, U., MITTAL, S., MITTAL, A.K. Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. **Fish Physiol. Biochem.**, 38(5):1245-56. 2012

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

OMORI-SATOH, T., YAMAKAWA, Y., MEBS, D. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake-I: Purification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, 1246:61-66. 1995

OREN, Z., SHAI, Y. A class of highly potent antimicrobial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses solefish *Pardachirus marmoratus*. **Eur. J. Biochem.**, 237:303–310. 1996

OUYANG, C.; TENG, C.M. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, 420:298-308. 1976

OWEN, M.D. The venom system and venom hyaluronidase of the African honey bee (*Apis mellifera Adansonii*). **Toxicon**, 21:171-174. 1983

PALAKSHA, K.J., SHIN, G.W., KIM, Y.R., JUNG, T.S. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish Shellfish Immunol**, 24:479–488. 2008

PANDYA, B.V., RUBIN, R.N., OLEXA, S.A., BUDZYNSKI, A.Z. Unique degradation of human fibrinogen by proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Toxicon**, 21(4):515-26. 1983

PAREJA-SANTOS, A., SARAIVA, T.C., COSTA, E.P., SANTOS, M.F., ZORN, T.T., SOUZA, V.M., LOPES-FERREIRA, M., LIMA, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Pathol.**, 90(1):34-43. 2009

PAWLAK, M., STANKOWSKI, S., SCHWARZ, G. Melittin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers. **Biochim Biophys Acta.**, 1062:94-102. 1991

PHILLIPSON, M., JOHANSSON, M.E.V., HENRIKSNÄS, J. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol.**, 29(4):G806–G812. 2008

PICKERING, A.D. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* (L), and the char, *Salvelinus alpinus* (L). **J. Fish Biol.**, 6:111–118. 1974

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

POH, C.H., YUEN, R., CHUNG, M.C.D., KHOO, H.E. Purification and characterization of hyaluronidase from stonefish *Synanseja horrida* venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, 101B:159-163. 1992

POLGÁR, J., CLEMETSON, J.M., KEHREL, B.E., WIEDEMANN, M., MAGNENAT, E.M., WELLS, T.N., CLEMETSON, K.J. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **J Biol Chem.**, 272(2):13576-83. 1997

RAJAN, B., FERNANDES, J.M., CAIPANG, C.M., KIRON, V., ROMBOUT, J.H., BRINCHMANN, M.F. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. **Fish Shellfish Immunol.**, 31(2):224-231. 2011

RAKERS, S., NIKLASSON, L., STEINHAGEN, D., KRUSE, C., SCHAUBER, J., SUNDELL, K., PAUS, R. Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, 133:1140-1149. 2013

RAMANAIAH, M., PARTHASARATHY, P.R., VENKAIAH, B. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. **Biochem. Int.**, 20(2):301-10. 1990

RAMOS, A.D., CONCEIÇÃO, K., SILVA PI, JR, RICHARDSON, M., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Specialization of the sting venom and skin mucus of *Cathorops spixii* reveals functional diversification of the toxins. **Toxicon**, 59(6):651-665. 2012

RAPOPORT, R.M. Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidyl inositol hydrolysis in rat aorta. **Circ. Res.**, 58:407-410. 1989

RITCHIE, J. M. Tetrodotoxin and saxitoxin and the sodium channels of excitable tissues. **Trends in Pharmacological Sciences**, 1:275-279. 1980

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive

and smooth stimulanting factor released from plasma globulin by snake venoms by trypsin. **American Journal of Physiology**, 156(2):261-273. 1949

ROSS, N.W., FIRTH, K.J., WANG, A., BURKA, J.F., JOHNSON, S.C. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. **Diseases of Aquatic Organisms**, 41:43-51. 2000

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

RUSSELL, F.E. Venom poisoning. *Ration. Drug Ther.*, 5(8):1-7. 1971

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

SAEKI, K., OZAKI, K., KOBAYASHI, T., ITO, S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. **J. Biosci. Bioeng.**, 103:501-508. 2007

SAITO, M., KAWAI, N., MIWA, A., PAN-HOU, H., YOSHIOKA, M. Spider toxin (JSTX) blocks glutamate synapse in hip-pocampal pyramidal neurons. **Brain Res.**, 346:397-399. 1985

SALLES, C.M.C, GAGLIANO, P., LEITAO, S.A.T., SALLES, J.B., GUEDES, H.L.M., CASSANO, V.P.F., GIOVANNI DE-SIMONE, S. Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a Neotropical hybridfish. **Fish Physiol. Biochem.**, 33:173-179. 2007

SAMEL, M., SUBBI, J., SIIGUR, J., SIIGUR, E. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera labetina* snake venom. **Toxicon**, 40:51-54. 2002

SANCHEZ, E.F.; SANTOS, C.I.; MAGALHAES, A.; DINIZ, C.R.; FIGUEIREDO, S.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Isolation of a proteinase with plasminogen activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 378(1):131-141, 2000

SAUNDERS, P.R., TAYLOR, P.B. Venom of the lionfish *Pterois volitans*. **Am. J. Physiol.**, 197:437-440. 1959

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

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel eletrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100KDa. **Anal. Biochem.**, 166:368-379. 1987

SERRANO, S.M.T., FOX, J.W. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, 45:969–985. 2005

SHARON, N., LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, 177:949-59. 1972

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, 18: 221-6. 1993

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, 14(11):53R-62R. 2004

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

SHIOMI, K., HOSAKA, M., KIKUCHI, T. Properties of a lethal factor in stonefish *Synanceia verrucosa* venom. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 59:1099, 1993

SIIGUR, E., MÄHAR, A., SIIGUR, J. Beta-fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. **Toxicon**, 29(1):107-18. 1991

SILVEIRA, R.B., DOS SANTOS FILHO, J.F., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W., NADER, H.B., DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from Brown spiders. **Toxicon**, 40:815-822. 2002

SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, 49(6):758-68. 2007

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

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

SMITH, K.J., SKELTON, H.G., TURIANSKY, G., WAGNER, K.F. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's

sarcoma. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR). **J. Am. Acad. Dermatol.**, 36(2 Pt 1):238:42. 1997

SMITH, W.L., WHEELER, W.C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. **Journal of Heredity**, 9:206-221. 2006

SOPRANI, J. Avaliação do efeito antitumoral de um polipeptídeo isolado da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* e avaliação do seu potencial uso no diagnóstico de tumores. Dissertação de Mestrado. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), **Belo Horizonte**, 2008

SOSA-ROSALES, J.I, PIRAN-SOARES, A.A, FARSKY, S.H, TAKEHARA, H.A, LIMA, C.,LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**, 45(2):155-161. 2005

SU, Y. Isolation and identification of pelteobagrín, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 158B:149–154. 2011

SUGAHARA, K., YAMADA, S., SUGIURA, M., TAKEDA, K., YUEN, R., KHOO, H.E., POH, C.H. Identification of the reaction products of the purified hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Biochem J.**, 283:99-104. 1992

SUTHERLAND, S.K., TIBBALLS, J. Australian Animals Toxins: the creatures, their toxins and care of the poisoned patient. **Oxford University Press**, Melbourne, 2.ed., 2001

SUZUKI, Y., TASUMI, S., TSUTSUI, S., OKAMOTO, M., SUETAKE, H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 136B:723–730. 2003

TACHIBANA, K., SAKAITANI, M. & NAKANISHI, K. Pavoninins: shark-repelling ichthyotoxin from the defence secretion of the Pacific sole. **Science**, 226:703–705. 1984

TAN, N.H., PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, pro-coagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, 103C:299-302. 1992

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

TERAMOTO, T., KUWADA, M., NIIDOME, T., SAWADA, K., NISHIZAWA,

Y., KATAYAMA, K. A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks, P-type calcium channels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 196:134-140. 1993

THORNTON, D.J., ROUSSEAU, K., MCGUCKIN, M.A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. **Annu Rev Physiol.**, 70:459–486. 2008

TSUTSUI S., YAMAGUCHI M., HIRASAWA A., NAKAMURA O., WATANABE T. Common skate (*Raja kenoei*) secretes pentraxin into the cutaneous secretion: The first skin mucus lectin in cartilaginous fish. **J Biochem.**, 146(2):295-306. 2009

TSUTSUI, S., KOMATSU, Y., SUGIURA, T., ARAKI, K., NAKAMURA, O. A unique epidermal mucus lectin identified from catfish (*Silurus asotus*): first evidence of intelectin in fish skin slime. **J Biochem.**, 150(5):501-514. 2011

TU, A.T., HENDON, R.R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. **Comp. Biochem. Physiol.**, 76B(2):377-83. 1983

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

WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish-a review of current knowledge. **Fish Shellfish Immunol.**, 23:1127–1151. 2007

YANO, T. The non-specific immune system: Humoral defense. In *The fish immune system: Organism, pathogen, and environment*. **Academic Press.**, 105–157. 1996

YOUNG, A.R., PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, 39(2-3):391-400. 2001

ZAGANELLI, G.L., ZAGANELLI, M.G., MAGALHÃES, A., DINIZ, C.R., DE LIMA, M.E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, 34:807-819. 1996

ZHAO X, FINDLY RC, DICKERSONHW. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleostfish. **Dev Comp Immunol.**, 32:500–508. 2008

***ADENDO***

---

## ADENDO I

## LISTA DAS MASSAS MOLECULARES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE SpV POR 2D-LC.

Massas Moleculares (Da)													
512,8	855,8	1083,9	2874,8	3493,2	3991,3	4370,4	4727,8	5092,0	5311,2	5478,8	5798,6	6069,5	6305,1
522,7	856,5	1141,6	2923,4	3517,8	4015,7	4377,5	4730,7	5095,1	5313,4	5488,1	5828,3	6070,3	6317,4
523,6	857,3	1166,5	2937,8	3524,9	4024,9	4378,2	4748,6	5106,8	5320,2	5497,0	5842,5	6071,7	6339,2
550,9	861,8	1195,4	2949,1	3536,1	4026,3	4379,9	4765,1	5119,6	5323,8	5499,1	5850,6	6076,5	6340,7
551,5	871,8	1269,6	2951,9	3538,9	4037,5	4381,6	4791,4	5131,2	5324,4	5507,4	5861,3	6077,1	6352,0
568,6	873,5	1273,6	2954,9	3548,6	4040,0	4391,2	4826,7	5150,8	5331,6	5512,6	5873,2	6079,9	6410,2
599,8	877,2	1274,6	2962,9	3582,7	4050,4	4411,2	4829,2	5179,2	5339,8	5515,6	5889,8	6080,4	6412,7
600,7	881,6	1280,8	3008,7	3586,1	4094,4	4420,1	4833,5	5184,8	5345,4	5518,8	5903,6	6083,5	6413,5
628,5	883,3	1294,2	3016,9	3620,9	4102,9	4424,8	4864,0	5185,7	5348,8	5520,5	5904,9	6087,1	6429,4
644,8	901,5	1295,3	3067,2	3672,9	4103,4	4437,8	4868,0	5189,9	5353,5	5526,6	5906,5	6089,0	6455,4
645,0	917,5	1352,9	3112,5	3676,2	4104,8	4446,9	4913,4	5199,4	5356,9	5537,2	5908,1	6112,7	6456,6
650,8	919,5	1353,0	3196,1	3690,1	4119,5	4454,7	4934,0	5208,2	5374,8	5539,2	5914,2	6117,5	6469,3
659,8	933,5	1475,6	3219,9	3693,1	4150,8	4468,3	4955,1	5217,3	5376,7	5574,7	5928,5	6121,9	6480,0
660,1	935,4	1477,7	3245,5	3696,7	4153,8	4505,5	5001,5	5221,3	5377,3	5577,0	5942,5	6136,6	6483,6
665,8	939,4	1485,6	3246,9	3698,2	4163,8	4524,3	5002,8	5224,7	5379,0	5588,4	5957,7	6138,8	6487,7
666,9	957,4	1677,5	3248,5	3728,3	4169,9	4531,4	5004,7	5226,4	5383,2	5615,4	5970,8	6139,7	6488,9
667,3	963,3	1760,9	3266,8	3740,7	4203,1	4533,1	5006,0	5233,4	5384,1	5618,5	5971,3	6143,3	6489,4
741,3	973,4	1773,1	3269,5	3765,1	4204,1	4556,1	5019,8	5252,6	5385,0	5633,6	5973,2	6153,3	6493,4
745,3	979,4	1774,2	3271,8	3791,9	4205,1	4572,2	5034,9	5256,2	5387,0	5656,6	6000,9	6173,2	6495,1
749,3	985,3	1776,2	3272,8	3807,9	4207,3	4580,1	5037,7	5257,5	5390,2	5659,0	6001,2	6178,8	6501,8
755,3	995,7	2313,9	3312,0	3811,1	4215,7	4593,3	5041,1	5271,8	5408,6	5663,8	6002,1	6179,0	6515,7
761,3	1052,3	2330,1	3359,0	3883,3	4235,6	4600,0	5042,2	5275,4	5412,0	5664,7	6003,6	6200,4	6519,5
769,2	1053,8	2331,1	3404,3	3888,7	4237,0	4601,9	5043,6	5282,8	5439,7	5668,2	6013,9	6236,7	6520,7
791,3	1057,2	2422,4	3428,6	3890,8	4242,4	4623,9	5053,3	5283,5	5443,6	5669,7	6016,1	6237,4	6539,7
797,3	1060,9	2423,1	3432,2	3895,6	4261,1	4656,0	5059,9	5284,4	5444,1	5675,0	6034,6	6245,7	6544,9
807,3	1061,7	2429,1	3458,3	3943,7	4264,3	4676,3	5084,8	5291,8	5450,9	5732,6	6039,8	6252,8	6590,7
829,5	1066,8	2693,7	3467,6	3944,2	4275,1	4691,9	5088,3	5296,3	5469,8	5790,1	6052,5	6256,7	6592,7
845,2	1067,7	2842,9	3468,5	3950,5	4312,9	4719,9	5089,0	5297,0	5470,3	5792,3	6054,9	6300,0	6596,2
847,2	1068,8	2856,7	3489,6	3960,7	4366,1	4723,2	5091,8	5300,8	5473,3	5794,0	6055,6	6302,8	6597,7

**Massas Moleculares (Da) - Continuação**

6646,1	7070,4	7733,6	8626,6	9429,2	12300,4	14053,5	16214,2	17294,5	19994,5	26728,5	33639,5	50797,2
6656,8	7130,8	7804,1	8659,3	9456,7	12305,5	14160,7	16223,6	17296,3	20007,8	26781,2	33731,6	50805,6
6687,6	7132,9	7805,7	8755,6	9504,8	12590,8	14168,3	16225,0	17448,5	20017,3	27798,6	33852,3	50969,0
6690,6	7140,4	7808,9	8769,8	9525,9	12598,0	14169,9	16231,1	17460,1	20044,5	27829,6	33894,4	51019,4
6725,8	7149,3	7843,2	8772,1	9577,3	12631,9	14173,4	16235,1	17464,3	20046,3	28777,2	33905,8	53122,3
6799,7	7151,1	7880,1	8773,5	9583,0	12635,0	14196,2	16242,2	17467,5	20049,8	28810,9	33932,1	53145,2
6801,4	7183,8	7893,0	8777,6	9590,0	12651,6	14423,2	16256,0	17469,8	20278,1	28957,3	33999,8	63516,4
6802,5	7205,0	7918,8	8988,2	9592,4	12667,5	14497,5	16458,9	17832,5	20601,9	29187,6	34492,3	63861,8
6803,0	7303,9	7978,7	9060,2	9595,4	12670,4	14577,2	16484,0	17886,2	20671,4	29616,9	35418,7	66942,4
6804,8	7311,9	8028,3	9070,0	9596,1	12758,2	14975,0	16497,5	18000,1	20709,7	29806,7	35500,3	67366,2
6824,9	7317,9	8033,9	9085,7	9807,6	12899,5	14984,5	16551,3	18001,0	20867,0	29826,3	35788,1	67454,6
6828,4	7318,4	8135,6	9086,9	9949,6	12904,8	15003,1	16565,6	18008,3	20909,1	29828,0	36157,2	67659,0
6855,7	7319,5	8136,4	9092,2	10034,9	12961,5	15021,0	16585,6	18013,4	22143,6	29905,1	36176,1	67909,0
6856,5	7374,8	8163,8	9115,8	10077,9	12981,3	15073,4	16750,8	18021,7	22168,5	29953,3	36183,1	68237,0
6896,6	7375,1	8211,1	9162,3	10206,6	13001,1	15613,0	16754,4	18037,5	22219,3	30066,0	36361,3	71147,3
6924,0	7384,6	8249,7	9163,5	10207,2	13014,5	15752,9	16756,8	18051,7	23950,5	30724,5	37081,0	77384,9
6927,8	7418,1	8266,3	9164,4	10241,4	13024,4	15776,9	16763,2	18065,0	24110,0	31901,0	37251,8	77426,3
6928,8	7431,3	8309,8	9166,5	10243,4	13031,0	15779,2	16778,5	18080,8	25243,0	32021,2	37692,0	77559,1
6940,4	7448,3	8317,0	9187,7	10245,6	13033,9	15903,5	16783,7	18182,0	25269,6	32108,3	38605,9	77616,1
6943,0	7460,3	8329,0	9193,3	10318,2	13080,9	15910,2	16785,3	18301,4	25432,3	32109,5	38700,9	77655,8
6965,7	7474,8	8333,2	9230,7	10322,3	13082,4	15911,0	16790,1	18324,5	25434,3	32281,8	38798,5	77787,1
6969,7	7475,9	8401,3	9232,8	10489,0	13084,3	15913,4	16792,9	18327,8	25454,1	32321,9	39128,8	77935,8
6970,2	7510,2	8405,8	9233,4	10913,9	13085,8	15929,2	16907,3	18331,2	25599,5	32335,8	42056,1	84599,0
6973,2	7511,0	8411,2	9234,6	10915,9	13086,9	15936,8	16966,8	18854,1	25943,9	32344,7	47952,7	84837,0
6976,2	7593,3	8475,4	9235,2	10936,3	13958,1	15937,3	16974,1	19137,8	26043,8	32622,8	47963,9	
6978,7	7622,8	8477,7	9258,5	11506,8	13981,3	15988,5	16986,5	19668,1	26060,3	32647,5	48333,1	
6992,0	7625,5	8478,3	9274,7	11553,5	14003,6	16006,6	17001,1	19736,9	26066,4	32694,0	48445,5	
7015,7	7638,7	8479,1	9300,0	11910,0	14004,4	16035,5	17002,4	19756,6	26072,8	32761,2	48451,7	
7016,5	7654,1	8480,0	9317,0	12091,7	14009,5	16144,9	17268,2	19928,3	26078,4	32822,4	50458,5	
7019,9	7668,9	8481,4	9370,6	12254,5	14017,6	16148,7	17283,4	19981,4	26163,5	33556,8	50582,5	
7053,9	7710,9	8482,2	9425,6	12285,7	14037,7	16152,2	17292,7	19989,3	26269,8	33637,2	50765,1	

## ADENDO II

## LISTA DAS MASSAS MOLECULARES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE SpSM POR 2D-LC.

Massas Moleculares (Da)													
743,1	893,4	1182,5	1656,7	2132,4	2407,6	2608,9	2821,8	3077,5	3330,6	3697,6	4033,0	4558,4	5184,2
749,4	903,2	1196,9	1663,5	2140,0	2411,5	2612,6	2825,5	3104,6	3378,9	3701,6	4046,8	4562,5	5255,6
752,7	909,2	1204,3	1687,7	2146,4	2412,8	2615,1	2840,9	3116,2	3382,9	3702,4	4051,0	4568,9	5371,2
753,3	917,7	1214,5	1693,5	2152,7	2424,0	2622,7	2873,5	3136,0	3385,9	3711,6	4092,1	4569,9	5384,8
754,4	919,7	1230,0	1704,4	2154,5	2425,2	2636,8	2876,3	3138,8	3390,9	3714,5	4099,6	4579,1	5394,0
755,5	923,6	1252,0	1722,4	2157,0	2441,7	2658,4	2877,1	3145,1	3440,0	3742,1	4104,5	4596,9	5400,9
759,2	925,9	1277,0	1738,4	2178,7	2446,2	2663,5	2880,6	3153,2	3441,2	3743,4	4106,4	4625,1	5401,5
760,3	935,6	1279,5	1742,8	2184,8	2451,0	2686,6	2881,0	3158,6	3443,2	3746,2	4108,6	4631,8	5406,3
765,2	945,5	1293,4	1747,8	2187,5	2455,9	2691,8	2883,3	3174,2	3446,1	3747,7	4145,2	4636,2	5492,2
771,5	955,6	1313,3	1784,8	2190,1	2468,3	2705,5	2888,8	3181,5	3449,1	3751,9	4205,9	4644,2	5503,3
775,2	957,6	1332,5	1801,7	2203,5	2472,1	2706,1	2902,3	3195,7	3457,1	3771,5	4207,4	4655,0	5506,2
776,3	967,5	1339,2	1808,4	2204,9	2473,0	2707,0	2925,8	3196,2	3492,6	3813,1	4261,5	4656,3	5569,9
781,2	973,6	1363,2	1809,5	2211,0	2475,9	2708,1	2926,6	3197,5	3511,6	3816,8	4266,7	4668,1	5585,5
792,2	983,8	1364,3	1825,0	2251,7	2477,5	2709,9	2933,4	3199,6	3557,4	3818,9	4268,7	4682,1	5587,8
797,2	989,5	1372,7	1831,5	2281,4	2483,8	2710,2	2935,2	3200,9	3558,8	3819,4	4271,0	4698,5	5589,7
798,2	1011,6	1373,5	1853,6	2296,1	2487,8	2711,0	2945,5	3202,7	3562,0	3847,2	4396,0	4951,2	5763,5
802,4	1036,6	1393,6	1871,9	2300,8	2512,5	2713,4	2953,6	3206,0	3563,8	3864,2	4403,4	5028,5	5771,3
803,2	1043,8	1400,2	1874,9	2301,4	2525,8	2714,6	2954,2	3233,5	3565,7	3879,1	4426,2	5049,7	5841,8
807,5	1066,5	1402,3	1895,7	2304,7	2531,4	2716,2	2961,7	3238,3	3582,4	3887,7	4484,7	5090,0	5842,7
813,5	1067,6	1411,4	1912,4	2308,3	2537,4	2719,1	3009,0	3253,5	3586,9	3891,7	4524,6	5136,3	5856,6
830,3	1110,5	1449,4	1965,4	2312,3	2540,4	2730,8	3015,5	3255,6	3596,7	3933,5	4530,4	5168,2	5857,4
851,3	1124,5	1475,7	2008,7	2316,3	2548,8	2745,9	3018,6	3264,1	3600,2	3943,6	4553,1	5172,4	5862,5
855,4	1127,6	1508,5	2009,6	2317,2	2554,6	2750,8	3037,2	3308,9	3602,9	3947,1	4558,4	5184,2	5881,7
861,4	1143,6	1539,4	2013,9	2320,9	2576,5	2753,7	3046,9	3313,9	3623,0	3949,0	4562,6	5255,6	5894,3
862,1	1158,7	1570,6	2035,4	2331,2	2579,0	2755,2	3049,8	3316,3	3627,4	3951,6	4568,9	5371,2	5933,2
871,4	1165,7	1618,7	2040,9	2340,3	2590,6	2807,6	3052,8	3318,6	3632,1	3976,4	4569,9	5384,8	5935,6
873,6	1175,0	1624,3	2054,0	2364,1	2602,9	2811,5	3060,6	3325,7	3633,2	3999,3	4579,1	5394,0	5967,7
877,4	1180,9	1639,4	2060,5	2390,4	2603,5	2819,7	3066,5	3328,7	3634,2	4017,4	4596,9	5400,9	6014,9
883,3	1181,0	1647,3	2130,6	2399,8	2606,9	2820,8	3067,3	3329,9	3688,7	4019,9	4625,1	5401,5	6019,0

---

**Massas Moleculares (Da) - Continuação**

6027,3	6532,9	6834,3	7396,4	8086,8	9215,5	12580,9	15894,5	28748,0
6033,4	6534,1	6853,5	7406,2	8092,1	9257,6	12680,4	16067,1	29014,7
6036,6	6536,9	6865,4	7436,6	8096,5	9258,8	12687,3	16079,7	29663,2
6047,8	6538,4	6879,1	7450,4	8103,8	9328,1	12791,7	16180,5	30088,0
6049,0	6539,9	6883,6	7452,2	8115,4	9331,4	12894,1	16195,4	31394,3
6050,3	6541,1	6905,7	7459,8	8175,1	9337,1	12962,1	16227,7	31613,7
6053,3	6543,6	6909,5	7471,2	8220,5	9345,2	13036,7	16232,4	31620,4
6054,0	6544,9	6910,7	7515,3	8283,5	9347,2	13042,8	16302,9	31708,0
6055,1	6545,6	6913,4	7520,9	8290,2	9419,9	13043,2	16341,7	34946,3
6067,0	6546,6	6926,7	7527,7	8403,3	9443,6	13058,7	16523,7	36196,9
6155,1	6548,6	6930,4	7567,5	8480,0	9500,9	13072,8	16526,9	38445,6
6156,9	6549,8	6970,1	7568,1	8485,0	9519,5	13081,3	16533,2	38608,4
6163,6	6556,2	6988,9	7573,6	8486,5	9580,3	13083,5	16551,5	41363,4
6166,1	6563,1	7006,9	7576,2	8569,2	9600,9	13090,5	16582,5	44276,2
6196,0	6580,7	7087,6	7601,8	8570,0	9606,3	13097,1	16587,3	44297,2
6220,9	6593,7	7131,6	7644,9	8571,7	9630,2	13102,9	16744,0	46826,7
6291,3	6607,7	7132,6	7649,2	8572,6	9748,8	13280,6	20563,7	47076,2
6292,8	6612,3	7133,1	7655,7	8574,0	9808,6	13287,0	20720,0	47215,3
6293,3	6642,9	7136,7	7667,6	8579,4	9902,7	13303,0	20878,6	50161,1
6340,0	6652,2	7178,2	7723,9	8581,1	9949,2	13312,6	21896,2	51325,2
6344,6	6654,5	7192,6	7725,5	8582,6	10058,2	13969,1	22333,4	62557,6
6345,3	6661,0	7200,4	7728,4	8585,1	10145,0	14423,8	22992,7	62615,8
6347,8	6669,6	7218,3	7744,3	8761,1	10159,1	14432,1	23698,8	78164,5
6351,5	6676,4	7219,3	7793,5	8791,5	10356,8	15128,0	23777,7	88414,2
6444,6	6681,1	7257,0	7823,6	9033,5	10367,8	15589,6	24994,4	
6477,6	6691,5	7261,7	7926,4	9123,8	10887,2	15697,0	25629,4	
6478,2	6720,6	7263,0	7934,0	9196,2	11711,3	15863,8	25630,7	
6483,8	6734,3	7326,9	7996,4	9198,0	11877,0	15864,6	25721,4	
6488,2	6737,7	7328,0	8031,2	9200,3	12136,5	15877,1	25777,7	
6494,4	6745,7	7382,1	8032,8	9202,1	12240,8	15882,5	25832,8	
6522,9	6807,5	7392,4	8036,9	9213,1	12327,5	15891,5	27494,3	