

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

PEDRO FELIPE MALACARNE

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA Sp-CTx -
TOXINA MULTIFUNCIONAL DA PEÇONHA DO PEIXE ESCORPIÃO**
Scorpaena plumieri

VITÓRIA
2017

PEDRO FELIPE MALACARNE

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA Sp-CTx -
TOXINA MULTIFUNCIONAL DA PEÇONHA DO PEIXE ESCORPIÃO**
Scorpaena plumieri

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientadora: Profa. Dra. Suely Gomes de Figueiredo

VITÓRIA
2017

PEDRO FELIPE MALACARNE

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA Sp-CTx -
TOXINA MULTIFUNCIONAL DA PEÇONHA DO PEIXE ESCORPIÃO**
Scorpaena plumieri

Aprovado em 30/03/2017 por:

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Suely Gomes de Figueiredo
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Juliana Bambrilla Carnielli Trindade
Universidade Federal do Espírito Santo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal do Espírito Santo, com o 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).

Agradecimentos

A Deus, por todas as conquistas em minha vida e por iluminar meu caminho.

Aos meus pais e minha irmã, por todo o amor, compreensão e incentivo, além de sempre estarem ao meu lado.

À Prof. Dra. Suely, uma querida professora e orientadora, que sempre esteve disponível para ensinar e contribui para minha formação. Agradeço por todo o carinho, desde que me recebeu em seu laboratório.

À Prof. Dra. Rita que me aceitou como aluno e auxiliou em todos os momentos.

Aos amigos do LQP: Cleciane, Clarissa, Gustavo, Thiago, Helena, Fabiana, Allan e Gabriela, obrigado por toda a ajuda nos experimentos e pela amizade.

À Danielle, pela grande parceria de trabalho durante este estudo.

Aos amigos que já fizeram parte do laboratório, que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

Ao Mário, essencial ao LQP, coletou os peixes escorpião para a realização deste e vários outros trabalhos do nosso laboratório. Muito obrigado!

Aos professores, servidores e colegas do programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia.

Aos professores e servidores do Departamento de Ciências Fisiológicas, por toda ajuda sempre que necessária.

E, por fim, à Universidade Federal do Espírito Santo, onde fui aluno desde a graduação, muito obrigado!

Resumo

Citolisinas são produzidas por diversos organismos e apresentam atividade tóxica a células individuais, causando dissolução através de lise. Citolisinas de peçonhas de peixes são proteínas multifuncionais que apresentam efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos e inflamatórios, sendo descritas como “fatores proteicos letais”. Uma citolisina hemolítica lábil, formadora de poro, denominada Sp-CTx – *Scorpaena plumieri* - Cytolytic Toxin (glicoproteína, 2 subunidades de 65 kDa), foi recentemente purificada da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. O objetivo deste trabalho foi estabelecer condições ótimas de manutenção da atividade hemolítica de Sp-CTx e dar continuidade à sua caracterização bioquímica e farmacológica. A estabilidade da Sp-CTx em diferentes condições (pH, temperatura e presença de co-solutos) e o efeito de diferentes cátions e lipídios de membrana sobre a atividade hemolítica foram avaliadas em eritrócitos de coelho. Foi demonstrado que a atividade hemolítica da Sp-CTx é mantida quando armazenada em 500 mM de NaCl, 1 M de sulfato de amônio, 60 mM de trealose e 10% de glicerol em pH 7,4 a 4 °C e em glicerol 10% a -80 e -196 °C. Também foi visto que a atividade hemolítica da Sp-CTx é dependente de cálcio e é completamente inibida por EDTA. O colesterol e o fosfatidilglicerol reduziram a hemólise induzida pela toxina, o que sugere que a toxina forma poro do tipo barril e é dependente da interação eletrostática com lipídios de membrana. Os motivos de carboidratos da Sp-CTx foram avaliados por western blot usando o kit “DIG Glycan Differentiation” sugerindo a presença dos motivos: galactose (1-4) N-acetilglucosamina e ácido siálico (2-3) galactose em complexos de N- e/ou O-glicanos. A resposta inflamatória induzida pela Sp-CTx foi avaliada usando como modelo o teste da pata de camundongo. Sp-CTx induziu nocicepção e resposta edematogênica local dose-dependente. O edema induzido foi significativamente reduzido pela administração prévia de HOE-140 e de aprotinina. Estes dados evidenciam o envolvimento do sistema calicreína-cinina na resposta inflamatória induzida por Sp-CTx.

Palavras-chave: Peixe Escorpião, Citolisina, Peçonha e Estabilidade

Abstract

Cytolysins are substances elaborated by many different organisms that exhibit toxic activities on cells, causing its dissolution through cytolysis. Fish venom cytolysins are multifunctional proteins that display neurotoxic, cardiotoxic and inflammatory effects, described as "protein lethal factors". A pore-forming labile hemolytic cytolysin called Sp-CTx (*Scorpaena plumieri* - Cytolytic Toxin) (glycoprotein, 2 subunits of 65 kDa) was recently purified from the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. The aim of this work was to establish optimal storage conditions to maintain the activities of this toxin and to continue its biochemical and pharmacological characterization. For this, SpV (*Scorpaena plumieri* Venom) and Sp-CTx were stored in different conditions (pH, temperature and in the presence of co-solutes), for different periods of time. Afterwards, their hemolytic activity on rabbit erythrocytes was compared to the activity of the freshly extracted venom and purified toxin. We also evaluated the effects of different cations and membrane lipids on the hemolytic activity of Sp-CTx. It was demonstrated that storage of Sp-CTx at -4 °C in pH 7,4 with 500mM NaCl, 1M (NH₄)₂SO₄, 60mM of threalose and 10% glycerol, and at -80 and -196 °C with glycerol 10% were effective in maintaining the hemolytic activity. Furthermore, the hemolytic activity is calcium dependent and completely inhibited by EDTA. Cholesterol and phosphatidylglycerol reduced the hemolytic activity of Sp-CTx which suggests that it is a barrel-pore-forming toxin and that the pore formation is dependent of electrostatic interactions with membrane lipids. Through western blot, using the "DIG Glycan Differentiation" kit, sugar motifs of Sp-CTx were evaluated, which suggested the presence of: galactose (1-4) N-acetylglucosamine and sialic-acid (2-3) galactose in N- and/or O- glycan complexes. Using the mouse hindpaw test it was shown that Sp-CTx induced intensive nociception and dose-dependent edematogenic responses in the mice footpad Sp-CTx. The local induced edema was considerably reduced by previous administration of aprotinin and HOE-140. These data suggest the involvement of the kinin-kallikrein system in the inflammatory response induced by Sp-CTx.

Keywords: Scorpionfish, Cytolysin, Venom and Stability

Sumário

Lista de Figuras	9
Lista de Abreviaturas.....	10
1 Introdução	11
1.1 Peçonha	11
1.2 Peixes peçonhentos	14
1.3 Efeito inflamatório local de peçonhas de peixes	16
1.4 Citolisinas de Peçonhas Animais	18
1.5 A toxina citolítica do peixe escorpião: Sp-CTx	22
1.6 Estabilidade de toxinas.....	22
1.7 Justificativa	23
2 Objetivos	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3 Materiais e Métodos	25
3.1 Reagentes	25
3.2 Animais	25
3.3 Obtenção da peçonha	26
3.4 Dosagem de proteína	27
3.5 Atividade hemolítica	27
3.5.1 Obtenção das hemácias	27
3.5.2 Teste de atividade hemolítica	27
3.5.3 Teste da susceptibilidade hemolítica de eritrócitos de diferentes espécies ao SpV	28
3.6 Estabilidade de atividade hemolítica	28
3.7 Efeito do tempo de estocagem	29
3.8 Purificação da toxina Sp-CTx	29
3.8.1 Primeira etapa de purificação	29
3.8.2 Segunda etapa de purificação	29
3.8.3 Terceira etapa de purificação	30
3.9 Avaliação da homogeneidade	30
3.10 Caracterização química da Sp-CTx.....	31
3.10.1 Estabilidade da toxina	31
3.10.2 Avaliação da atividade hemolítica de Sp-CTx na presença de lipídios de membrana	31
3.10.3 Avaliação do efeito do pH e de íons metálicos na atividade hemolítica de Sp-CTx	32

3.10.4	Detecção de glicoconjugados na Sp-CTx.....	33
3.11	Caracterização farmacológica da Sp-CTx.....	34
3.11.1	Atividade inflamatória da Sp-CTx	34
3.11.2	Estudo do mecanismo de formação do Edema	35
3.12	Análise Estatística dos Dados	36
4	Resultados	37
4.1	Conteúdo protéico	37
4.2	Teste da susceptibilidade hemolítica de diferentes espécies ao SpV	37
4.3	Estudo das condições ótimas para estabilização da atividade hemolítica do SpV	38
4.4	Avaliação da estabilidade da atividade hemolítica do SpV nas condições ótimas.....	39
4.5	Purificação da Sp-CTx.....	40
4.6	Estabilidade da atividade hemolítica da Sp-CTx	43
4.7	Influência do pH e de íons metálicos na atividade hemolítica de Sp-CTx.....	44
4.8	Efeitos de fosfolipídios de membrana na atividade hemolítica da Sp-CTx	45
4.9	Análise do perfil de glicosilação de Sp-CTx	47
4.10	Ensaio da atividade edematogênica:.....	48
4.11	Ensaio da atividade nociceptiva:	49
4.12	Estudo da via de formação do edema.....	50
5	Discussão.....	52
6	Considerações Finais e Conclusão.....	65
7	Referências bibliográficas	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Venenos de peixe na literatura	13
Figura 2 - Representantes dos principais gêneros de peixes peçonhentos da subordem Scorpaenoidei	16
Figura 3 - Extração da peçonha do peixe-escorpião.....	26
Figura 4 - Atividade hemolítica da peçonha de <i>Scorpaena plumieri</i> sobre eritrócitos de várias espécies.	37
Figura 5 - Atividade hemolítica residual do SpV armazenado por 7 dias.....	39
Figura 6 - Atividade hemolítica residual do SpV armazenado a - 80 e -196 °C	40
Figura 7 - Perfil eletroforético SDS-Page das frações obtidas na primeira etapa de purificação	41
Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração hemolítica CF-I.....	42
Figura 9 - Perfil cromatográfico da fração hemolítica CF-II.....	42
Figura 10 - Curva da atividade hemolítica da Sp-CTx	43
Figura 11 - Atividade hemolítica residual da Sp-CTx	44
Figura 12 - Influência do pH e de íons metálicos na atividade hemolítica da Sp-CTx	45
Figura 13 - Avaliação da atividade hemolítica da Sp-CTx na presença de lipídios de membrana	46
Figura 14 - Análise do perfil de glicosilação da Sp-CTx.....	47
Figura 15 - Atividade edematogênica da Sp-CTx	48
Figura 16 - Atividade nociceptiva da Sp-CTx	49
Figura 17 - Estudo da via de formação do edema induzido por Sp-CTx	51

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
BSA	Soro albumina bovina
BK	Bradicinina
CF-1	Fração citolítica 1
CF-2	Fração citolítica 2
DTT	Ditiotreitol
EC	Concentração Efetiva
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da media
DSA	Aglutinina de amendoim
GC	Grupo controle
GNA	Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
HOE	HOE-140
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
KKS	Sistema caliceína-cinina
MAA	Aglutinina de <i>Maackia</i>
MCP-1	Proteína tipo 1 quimiotática de monócitos
MM	Massa molecular
neoVTX	Neoverrucotoxina
PBS	Tampão fosfato de sódio com salina
PNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SNA	Aglutinina de <i>Datura</i>
SNTX	Stonustoxina
Sp-CTx	Toxina citolítica purificada peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
SpV	Solução da peçonha do peixe <i>Scorpaena plumieri</i>
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletlenodiamina
TLY	Trachynilysina
TNF	Fator de necrose tumoral

1 Introdução

1.1 Peçonha

O veneno é um traço importante encontrado ao longo da árvore evolutiva dos animais. Os animais venenosos estão distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos, e, dentre estes, encontram-se aqueles classificados como peçonhentos. Animais peçonhentos apresentam um aparelho inoculador especializado (como exemplos: colmilhos, arpões, nematocistos, pinças e espinhos) e uma glândula produtora do veneno, que recebem a denominação de peçonha. Entretanto, os termos peçonha e veneno são, muitas vezes, usados como sinônimos.

Peçonhas são misturas complexas de moléculas bioativas que incluem principalmente proteínas, peptídeos e mediadores químicos como as aminas biogênicas. Estes componentes evoluíram no sentido predatório e de defesa e apresentam capacidade de atordoar, paralisar ou matar outros organismos (Ziegman e Alewood, 2015).

Inicialmente, a investigação sobre venenos animais buscava compreender seus efeitos nocivos em humanos, com o objetivo de desenvolver tratamentos específicos em casos de acidentes. Atualmente, a bioprospecção destes venenos vai além do ponto de vista terapêutico, podendo servir como instrumento na investigação de mecanismos moleculares de sistemas fisiológicos e para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos com bases biotecnológicas (Shivaji, 2007).

O potencial de moléculas tóxicas naturais para o uso medicinal foi primeiramente descrito na década de 40 com a utilização da tubocurarina, um alcalóide extraído da planta *Chondodendron tomentosum*, como relaxante muscular em cirurgias (Dutcher, 1946). O exemplo mais clássico do potencial de componentes de venenos é o ilustrado pelo desenvolvimento do inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), o captopril, a partir de pistas fornecidas por peptídeos potenciadores de bradicinina isolados a partir do veneno da cobra *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva, 1949). Desde então,

grandes avanços na caracterização química e farmacológica de peçonhas de animais terrestres como serpentes, escorpiões e aranhas foram alcançados, gerando o desenvolvimento de fármacos com funções que variam desde a anticoagulação até a antiangiogênese (Smith e Wheeler, 2006). Dentre os anticoagulantes desenvolvidos a partir de toxinas animais encontra-se o Eptifibatide (nome comercial Integrilin), que é um heptapeptídeo cíclico derivado de uma proteína encontrada no veneno da cascavel *Sistrurus miliarius barbouri*. Este medicamento, que pertence à classe dos miméticos de arginina-glicina-aspartato (RGD), liga-se reversivelmente a plaquetas e bloqueia seletivamente o receptor de glicoproteína IIb / IIIa encontrado nesses componentes sanguíneos (Utkin, 2015).

O estudo de venenos animais também tem contribuído para a compreensão de alguns mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia dos sistemas cardiovascular, neurológico, hemostático e aos relacionados à dor. Como exemplos podemos citar: tetrodotoxina, um potente bloqueador de canais de sódio (Na^+) dependentes de voltagem, que foi isolada do peixe da família *Tetraodontidae* (baiacu) e desempenha um papel importante no estudo destes canais (Ritchie, 1980); δ -conotoxin, uma neurotoxina extraída da peçonha de moluscos do gênero *Conus*, que, devido ao seu efeito inibidor de canais de Na^+ , também é utilizada no estudo da cinética destes canais (Leipold et al., 2005); ω -agatoxina isolada da peçonha da aranha *Agelenopsis aperta*, que foi importante na identificação de subtipos de canais de cálcio (Ca^{2+}) (Adams et al., 1990); *leucurolysin-a*, uma protease com atividade fibrinolítica obtida da peçonha da serpente Jararaca-de-cauda-branca, *Bothrops leucurus* (Gremski et al., 2007), a qual pode servir como instrumento de estudo do sistema hemostático humano.

É importante destacar a existência de várias outras toxinas com atividades interessantes no campo biotecnológico, como a Tx4(6-1) e a Tx4(5-5), toxinas com ação inseticida purificadas da aranha brasileira *Phoneutria nigriventer*, que podem levar ao desenvolvimento de praguicidas altamente específicos (Figueiredo et al., 1995; 2001). Desta mesma aranha, um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais identificou duas

toxinas (Tx2-5 e Tx2-6) que induzem ereção peniana por meio de liberação de óxido nítrico (Yonminea et al., 2004 e Nunes et al., 2010).

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 (fig. 1). Isso pode ser justificado: (i) pela dificuldade de captura dos espécimes (Khoo, 2002); (ii) pela dificuldade da extração da peçonha (Church e Hodgson, 2002); (iii) e também pela natureza lábil das biomoléculas presentes nestas peçonhas (Schaeffer et al., 1971; Carrijo et al., 2005). Portanto, os peixes peçonhentos, principalmente os brasileiros, permanecem como fonte praticamente inexplorada de produtos naturais.

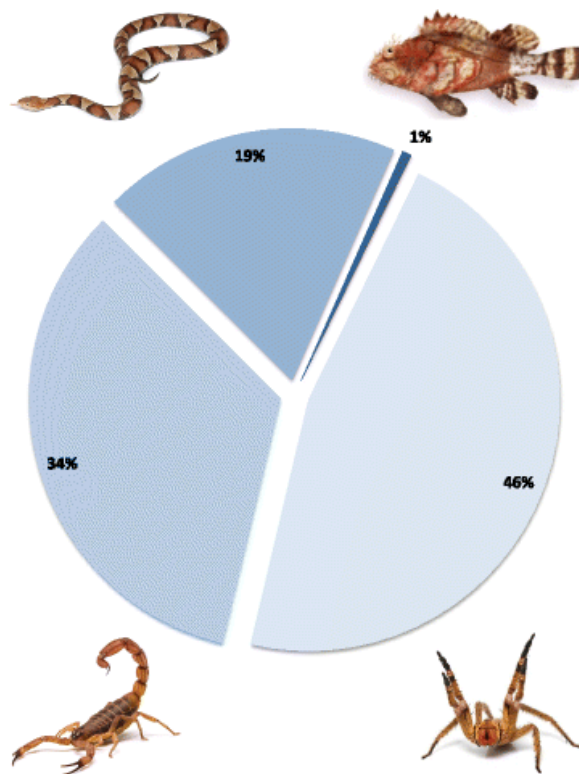


FIGURA 1– VENENOS DE PEIXE NA LITERATURA. Comparação entre o número de entradas (em %) encontradas na base de dados UniProtKB, obtido através da pesquisa de sequências de proteínas de aranhas, escorpiões, cobras e peixes (Campos et al., 2016).

1.2 Peixes peçonhentos

Os peixes constituem quase metade do número de vertebrados da terra, sendo classificados em 62 ordens, as quais abrigam 515 famílias com um total de aproximadamente 28 mil espécies (Nelson, 2006). Os peixes que apresentam importância toxicológica podem ser venenosos ou peçonhentos. O baiacu (*Colomesus psittacus*), a garoupa (*Epinephelus marginatus*), e a barracuda (*Sphyraena barracuda*) (Grund, 2009), envolvidos em envenenamentos humanos, são considerados venenosos. Já os peixes da família *Scorpaenidae*, a qual inclui o peixe leão encontrado nos oceanos indo-pacífico (*Pterois volitans*) e o peixe escorpião do oceano atlântico (*Scorpaena plumieri*), são considerados peçonhentos.

Embora acidentes envolvendo animais aquáticos peçonhentos ocorram em menor número que os de animais terrestres, estes também constituem um problema de saúde pública. Acidentes com a peçonha desses animais podem levar a injúrias severas que podem ser provisoriamente incapacitantes, mantendo a vítima afastada do trabalho por dias ou até semanas (Haddad Jr., 2003). Assim como a peçonha de animais terrestres, peçonhas de peixes possuem uma grande diversidade de atividades farmacológicas (Figueiredo et al., 2009).

Os peixes peçonhentos mais perigosos do mundo pertencem à subordem Scorpaenoidei, que inclui três gêneros principais (fig. 2): *Pterois* (peixe-leão), *Synanceja* (peixe-pedra) e *Scorpaena* (peixe-escorpião). Estes são classificados com base na morfologia do seu aparato venenoso, que consiste em glândulas contidas dentro de espinhos (dorsais, pélvicos e anais) envolvidos por membranas tegumentares. O envenenamento em humanos ocorre quando a força de contato com o espinho perfura a pele da vítima, exercendo pressão o suficiente sobre as glândulas para a liberação do veneno armazenado e sua passagem pelo espinho até o tecido subcutâneo da vítima (Kreger, 1991).

O Brasil apresenta uma ampla faixa costeira de aproximadamente 8.500 km e a maior rede de água doce do mundo. Com isso, possuímos uma fauna

variada de animais aquáticos, dentre os quais, muitos são potencialmente perigosos. Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos possuem representantes nos rios e mares do Brasil (Haddad Jr., 2003). Dentre os peixes marinhos peçonhentos encontrados no Brasil, destaca-se o peixe-escorpião (fig. 2C) *Scorpaena plumieri*, considerado o mais venenoso da costa atlântica do continente americano. Este peixe, popularmente conhecido como moréia-atí ou mangangá, é responsável por muitos acidentes ocorridos com pescadores, mergulhadores e turistas praianos (Haddad et al., 2003).

Os peixes desta espécie têm o hábito de permanecer imóveis e parcialmente escondidos por longos períodos de tempo e são comumente encontrados perto de rochas, recifes de coral ou algas marinhas, com os quais costumam se camuflar de maneira muito eficaz (Russel e Brodie, 2012; Schaeffer *et al.*, 1971, Khoo et al., 2002), o que predispõe a ocorrência de acidentes (Haddad Jr., 2000).

O envenenamento pela peçonha do peixe-escorpião induz efeitos tóxicos locais e sistêmicos. Os principais aspectos clínicos do envenenamento são: dor excruciante, febre, sudorese, eritema, edema, náusea, vômito, agitação, taquicardia e hipotensão arterial (Haddad Jr., 2000; Haddad Jr. et al., 2003).

A caracterização química e farmacológica da peçonha de *S. plumieri* têm sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa desde o início da última década. Os resultados obtidos demonstraram a natureza proteica desta peçonha e descreveram algumas de suas atividades biológicas, que incluem: letalidade, atividades enzimáticas (hialuronidásica e proteolítica), atividade cardiovascular e citolítica e resposta inflamatória local (Carrizo et al., 2005; Andrich et al., 2010; Gomes et al., 2010, 2011; Menezes et al., 2012).

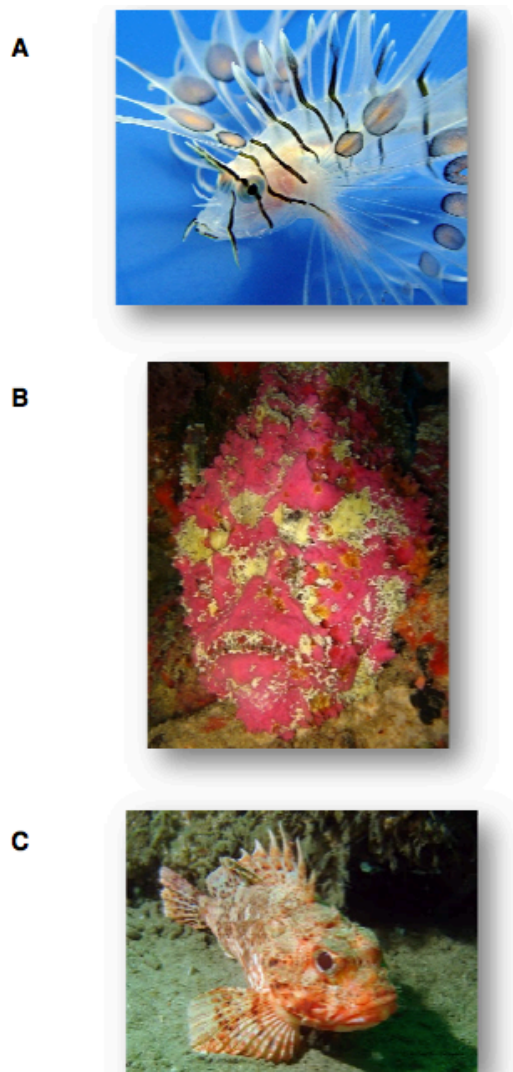


FIGURA 2– REPRESENTANTES DOS PRINCIPAIS GÊNEROS DE PEIXES PEÇONHENTOS DA SUBORDEME SCORPAENOIDEI. (A) *Pterois* (peixes-leão). (B) *Synanceja* (peixes-pedra). (C) *Scorpaena* (peixes-escorpião). Fonte: Andrich (2009).

1.3 Efeito inflamatório local de peçonhas de peixes

Uma resposta inflamatória local, caracterizada clinicamente por dor intensa e edema, frequentemente é observada em envenenamentos com peçonhas de peixes (Sivan, 2009). Em um estudo de Kizer et al. (1985) sobre envenenamentos humanos pelo peixe-leão *P. volitans*, dor intensa no local da injúria foi a principal queixa e 60% dos pacientes apresentaram edema local.

Em um estudo epidemiológico usando indivíduos acidentados com arraias de água doce do gênero *Potamotrygon* de rios brasileiros, Haddad Jr e colaboradores (2004) demonstraram uma inflamação local extremamente severa. Todos os indivíduos relataram dor excruciante e apresentaram formação de edema e eritema. Aproximadamente 90% dos indivíduos apresentaram úlceras e necrose tecidual e o tempo médio de cicatrização da ferida foi de 3 meses.

Em estudos experimentais usando o teste da pata do camundongo, Lima e colaboradores (2003) caracterizaram a resposta inflamatória local aguda induzida pela peçonha do peixe *T. nattereri*. Foi demonstrado que a peçonha induz edema intenso com liberação local de citocinas: Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Além disso uma migração de leucócitos do leito vascular para o líquido peritoneal foi observada quando a peçonha foi injetada na cavidade peritoneal de camundongos.

Também empregando o ensaio da pata de camundongos, nosso grupo demonstrou que a peçonha bruta de *S. plumieri* induz edema intenso e nocicepção local, de forma dose dependente. Estes efeitos foram acompanhados por liberação de citocinas pró inflamatórias (TNF e IL-6 e da quimiocina MCP-1), as quais foram relacionadas com infiltrado celular (neutrófilos e células mononucleadas) observado nos cortes histológicos do tecido injuriado. Além disso, foi sugerido que esta resposta envolve o sistema caliceína-cinina, considerando que o tratamento prévio com a aprotinina (inibidor de serino protease) ou com o icatibanto (HOE-140 - antagonista de receptores B₂ de bradicinina) reduziu significativamente o edema (Menezes et al., 2012).

A resposta inflamatória da peçonha do peixe pedra *Synanceja horrida*, é atribuída à toxina citolítica SNTX (Stonustoxin) purificada dessa peçonha (Poh et al., 1991), que também apresenta atividade hemolítica e cardiovascular (Low et al., 1993). Foi observado que 0,15 μ g de SNTX, é suficiente para induzir o edema, cujo máximo registrado 60 minutos após a

injeção da toxina, demonstrando o potente efeito inflamatório local desta molécula (Poh et al., 1991).

1.4 Citolisinas de Peçonhas Animais

Proteínas citolíticas, também chamadas de citolisinas, são elaboradas por diversos organismos incluindo bactérias, plantas e animais (Ueda et al., 2006). As citolisinas de peçonhas animais apresentam um papel de proteção contra predadores, podendo também estar envolvidas no ataque e degeneração de presas (Chen et al., 1997).

Estas citolisinas (toxinas) possuem atividade tóxica a células individuais, causando sua dissolução através de lise da membrana celular. Dependendo da intensidade da lise, esta pode acarretar em morte celular. Quando a lise é intensa a célula perde a capacidade de regulação homeostática de repor o equilíbrio iônico perdido (Chen et al., 1997).

O estudo sistemático de diversas citolisinas que compõem peçonhas animais pode levar à compreensão dos mecanismos moleculares envolvendo suas atividades fisio-fármaco-patológicas. A tabela 1 mostra exemplos de citolisinas purificadas de vários organismos e suas respectivas funções biológicas. Em relação ao modo de ação, as citolisinas podem ser divididas em dois grupos principais: as que possuem ação enzimática e as não-enzimáticas.

Muitas das toxinas citolíticas isoladas de venenos apresentam atividade enzimática: fosfolipásica A2, fosfolipásica C e esfingomielinásica (Harvey, 1990; Bernheimer e Rudy, 1986). A lise celular enzimática pode ser direta, situação em que enzimas do próprio veneno atuam diretamente sobre fosfolipídios de membrana, ou de forma indireta, tornando as células mais susceptíveis a danos por hidrólise da membrana. Exemplos de fosfolipases com atividade hemolítica, sobre eritrócitos de coelho, foram isoladas das peçonhas das serpentes australianas *Austrelaps superbis* (Bernheimer et al., 1986) e *Pseudechis colletti* (Bernheimer et al., 1987).

Proteínas citolíticas desprovidas de ação enzimática também têm sido isoladas de fontes animais como répteis, anfíbios, insetos, mamíferos e peixes (Harvey, 1990; Bernheimer, Rudy, 1986; Garnier et al., 1995). Ao contrário das citolisinas com ação enzimática, as não-enzimáticas rompem a célula por formação de poros transmembranares (Menestrina et al., 1994). Estes poros permitem a passagem de pequenos osmóticos através da membrana, mas excluem a passagem de moléculas grandes, como proteínas. Como o interior da célula é hiperosmótico, há um influxo de água, o que resulta em um inchaço celular e subsequente lise (Chen et al., 1997). Acredita-se que a formação de poros multiméricos é o modo de ação de muitos peptídeos e proteínas citolíticas (Schwarz et al.; 1992).

Tem sido proposto que as toxinas formadoras de poros se ligam a lipídeos e proteínas da membrana da célula alvo, podendo formar estruturas do tipo: (i) "barril", que compreende a formação de canais na membrana plasmática pelos peptídeos; neste modelo a região hidrofóbica de α -hélices dos peptídeos entra em contato com a cauda dos fosfolipídios da membrana, enquanto a região hidrofílica das α -hélices forma o canal. (ii) "Poro toroidal", modelo no qual a α -hélice é inserida na membrana e induz a formação de um poro, onde as cabeças hidrofílicas carregadas dos fosfolipídios da membrana ficam voltadas para o interior do poro, em contato com regiões hidrofílicas da α -hélice (Dos Santos, 2009).

Um outro mecanismo não-enzimático, envolvendo as propriedades anfipáticas tensoativas, foi descrito por Menestrina e colaboradores (1994) e Alouf (2000). Neste modelo, as toxinas funcionam como detergentes ou através da desorganização da membrana, atuando como um agente dispersante pela solubilização de seus constituintes lipídicos e/ou proteicos.

Entretanto, o mecanismo de ação de citolisinas não-enzimáticas não está completamente elucidado. Autores como Chhatwal e Dreyer (1992) sugeriram que, além da ligação dos lipídeos na membrana, a presença de receptores específicos pode desempenhar um papel no modo pelo qual essas toxinas exercem seu efeito. Além disso, estudos recentes mostraram que proteínas

formadoras de poros podem sofrer um processo de fusão com domínios de outras proteínas como cristalinas e lectinas, e que estes domínios podem atuar na facilitação da ligação dessas citolisinas às membranas celulares (Xiang et al., 2014).

Citolisinas de peixes são consideradas toxinas multifuncionais, por possuir, além da atividade citolítica, outras diversas atividades biológicas (Garnier et al., 1995, Figueiredo et al., 2009). Efeitos já descritos para estas toxinas incluem: letalidade, aumento da permeabilidade vascular, ação inflamatória, atividades cardiotoxica e neurotóxica (Poh et al., 1991; Kreger, 1991; Gomes et al., 2012).

As citolisinas são as moléculas mais estudadas de peçonhas de peixes. Recentemente, uma citolisina multifuncional com atividade hemolítica e cardiotoxica, denominada Sp-CTx (***Scorpaena plumieri* Cytolytic Toxin**), foi isolada a partir da peçonha de *S. plumieri* e parcialmente caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa (Andrich et al., 2010; Gomes et al. 2012).

TABELA I. TOXINAS CITOLÍTICAS

Espécie	Toxina	Estrutura	Atividade	Referência
<i>Scorpaena plumieri</i> (peixe-escorpião)	<i>Scorpaena plumieri</i> - <i>Cytolytic Toxin</i> (Sp-CTx)	121 kDa, 2 subunidades de 71 kDa	Hemolítica e cardiovascular Inflamatória	Andrich et al., 2010; Gomes et al., 2011; Presente trabalho.
<i>Synanceja verrucosa</i> (peixe-pedra)	<i>Verrucotoxin</i> (VTX) <i>Neoverrucotoxin</i> (neoVTX)	322 kDa 166 kDa	Hemolítica e cardiovascular Hemolítica e letal	Garnier et al., 1995.
<i>Synanceja horrida</i> (peixe-pedra)	<i>Stonustoxin</i>	148 kDa, 2 subunidades α (71 kDa) e β (79 kDa)	Hemolítica, cardiovascular, nociceptiva e edematogênica	Khoo et al., 1992; Low et al., 1994; Poh et al., 1991.
<i>Actinia equina</i> L. (anêmona do mar)	<i>Equinatoxin II</i> (EqT II)	19,8 kDa	Hemolítica, cardiovascular e agregação plaquetária	Batista e Sentjurc, 1995.
<i>Cupiennius salei</i> (aranha)	<i>Cupiennin 1a</i>	3,8 kDa	Hemolítica, atividade citolítica sobre bactérias, protozoários e insetos	Pukala et al., 2007.
<i>Bacillus thuringiensis</i> (bactéria gram-positiva)	Cyt1Aa1	27 kDa	Hemolítica e inseticida	Butko, 2003.
<i>Pseudechis colletti</i> (serpente)	Fosfolipase B	60 kDa	Hemolítica e letal	Bernheimer et al., 1987.

1.5 A toxina citolítica do peixe escorpião: Sp-CTx

O isolamento da Sp-CTx, toxina citolítica da peçonha de *S. plumieri*, descrita por Andrich e colaboradores (2010) e Gomes e colaboradores (2013), envolveu processos cromatográficos e precipitação salina. Esta toxina é uma glicoproteína de natureza lábil e dimérica, sendo constituída por duas subunidades de 71 kDa (Andrich et al., 2010).

A atividade hemolítica da Sp-CTx foi atenuada ou inibida pela presença de osmoprotetores (polímeros de polietilenoglicol), resultado esse que sugere que a Sp-CTx é uma toxina formadora de poro (Gomes et al., 2013). A proteção contra a lise foi proporcional aos raios hidrodinâmicos dos osmoprotetores utilizados. Dessa forma, o tamanho do poro formado pela Sp-CTx eritrócitos de coelho foi estimado como sendo $\leq 3,2$ nm, que é similar à de outras toxinas como da SNTX e da hemolisina da *Escherichia coli* (Chen et al., 1997; Renkin, 1954).

Além da capacidade de romper hemácias, a Sp-CTx também apresenta atividade cardiotoxica. Esta toxina induz um efeito bifásico em anéis aórticos de ratos, caracterizado por uma fase inicial e transiente de relaxamento, seguida por uma fase posterior de contração sustentada (Andrich et al., 2010). A toxina ainda mostrou efeito inotrópico positivo tanto em corações isolados como em músculos papilares isolados, o qual foi atenuado pelo agente depletor de catecolaminas tiramina (100 μ M) e pelo bloqueador beta-adrenérgico propranolol (10 μ M). Sobre miócitos ventriculares isolados, a Sp-CTx (1 nM) aumentou a corrente de cálcio tipo L. Estes resultados demonstram que a toxina induz desordens sobre o sistema cardiovascular as quais, por sua vez, estão associadas com os receptores adrenérgicos e aumento do influxo de cálcio sarcolemal (Gomes et al, 2016).

1.6 Estabilidade de toxinas

Como já bem descrito na literatura toxinas de natureza proteica de peçonhas de peixes são lábeis (para uma revisão ver Figueiredo et al., 2009). A baixa

estabilidade destas toxinas dificulta sua estocagem e representa um grande obstáculo para o estudo de peçonhas de peixes, retardando a produção de dados sobre as mesmas (Church & Hodgson 2002).

Estudos realizados com o veneno de peixes dos gêneros *Pterois*, *Synanceja* e *Scorpaena* mostraram que muitas das propriedades biológicas, principalmente o efeito letal, eram rapidamente perdidas quando estes extratos eram acondicionados à temperatura ambiente ou submetidos a aquecimento, ciclos de congelamento e descongelamento, liofilização e outras mudanças físicas (Church & Hodgson 2002; Andrich et al., 2009).

A estabilidade de uma proteína é essencial para o desempenho de suas atividades biológicas, sendo, portanto, de extrema importância no que diz respeito às suas aplicações como produtos farmacêuticos e biocatalisadores. A capacidade de manter seu estado nativo depende de fatores intrínsecos - natureza molecular da proteína - o que inclui tamanho molecular, hidrofobicidade e número de pontes de dissulfeto (Bastolla e Demetrius, 2005). Fatores extrínsecos, como pH, temperatura e concentração e presença de co-solutos, também são importantes na estabilidade proteica.

1.7 Justificativa

Este trabalho teve como principal objetivo estabelecer condições capazes de manter a atividade hemolítica da peçonha do *S. plumieri* e da toxina responsável por esta atividade – a Sp-CTX. A manutenção da estabilidade é essencial para obtenção de avanços na caracterização química e de fisiofarmacológica desta peçonha. Esta caracterização é importante para o desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento do envenenamento causado por este peixe.

2 Objetivos

Estabelecer condições ótimas para estabilizar a atividade citolítica da peçonha de *S. plumieri* e realizar a caracterização química e farmacológica da Sp-CTx.

2.1 Objetivos específicos

Obter a Sp-CTx, em forma homogênea e em quantidade suficiente para realização desse trabalho, de acordo com metodologia de purificação já descrita na literatura;

Estabilizar a atividade hemolítica da Sp-CTx

Caracterizar a Sp-CTx quanto:

- ao mecanismo da formação de poros;
- à influência do pH e íons metálicos na atividade hemolítica;
- ao perfil de glicosilação;
- ao seu potencial inflamatório.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica, procedentes da Merck, Sigma, Vetec, GE Healthcare e Bio-Rad. Os utilizados nas cromatografias foram de grau HPLC procedentes da J. T. Baker e Merck. Os concentradores protéicos Centricon YM-10 foram adquiridos da Milipore (Massachusetts, EUA). As soluções utilizadas para a cromatografia foram preparadas com água purificada em sistema mili-Q.

3.2 Animais

Para o presente estudo foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente três meses de idade (250-300g) e camundongos suíço de dois meses de idade (~40 g) cedidos pelo Biotério de Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo ou do Biotério de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, em uma sala iluminada 12h por dia, sendo que o acesso à ração e água foi livre.

Os peixes-escorpião da espécie *S. plumieri* foram capturados no litoral do Espírito Santo por mergulhadores licenciados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) e mantidos em aquário com água marinha e suprimento adequado de oxigênio, até sua identificação e extração da peçonha. Os espécimes foram identificados pela observação de manchas brancas sobre fundo preto na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie.

Os experimentos foram conduzidos de forma a respeitar as normas de proteção aos animais, de acordo com o recomendado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o número 006/2009 para ratos e 93/2015 para camundongos.

O sangue dos coelhos foi cedido pelo Núcleo de Doenças Infecciosas situado no mesmo instituto (NDI/UFES).

3.3 Obtenção da peçonha bruta

Foram utilizados, em média, quatro a cinco peixes por extração. A extração da peçonha foi realizada de acordo com o método *Batch* segundo metodologia descrita por Schaeffer e colaboradores (1971). Os espinhos dorsais e anais foram removidos dos peixes, previamente anestesiados por resfriamento (-20 °C) e dissecados de forma que o tegumento que os revestem fossem separados dos ossos. O tegumento foi triturado e seu conteúdo foi solubilizado em PBS (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 15 mM). A peçonha bruta (SpV) foi obtida após a remoção do material insolúvel por centrifugação por 30 minutos a 14.000 g (fig. 3). Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo. O SpV foi imediatamente empregado para realização dos ensaios.

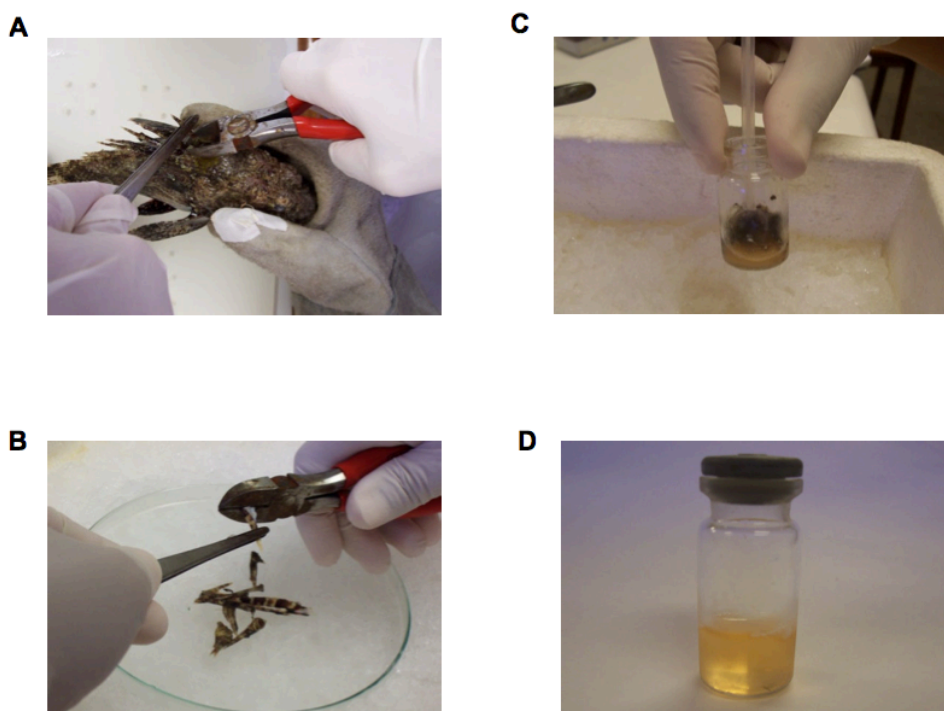


Figura 3 - EXTRAÇÃO DA PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *S. plumieri*. (A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe. (B) Remoção e seccionamento

do revestimento do espinho. (C) Homogeneização dos tegumentos fatiados em PBS. (D) Peçonha bruta (SpV) após a remoção das partículas insolúveis por centrifugação.

3.4 Dosagem de proteína

O conteúdo proteico da peçonha bruta e das amostras obtidas nas etapas do processo de fracionamento foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando soro albumina bovino como padrão.

Devido à pequena quantidade de material proteico obtido no final da purificação da Sp-CTx, a concentração proteica dessa amostra foi estimada pela absorção a 280 nm com base no seguinte critério: 1mg/mL da toxina apresenta absorvância de 0.40 (Gomes et al., 2013).

3.5 Atividade hemolítica

3.5.1 Obtenção das hemácias

O sangue dos animais (coelhos, ratos, camundongos e humano) foi coletado e imediatamente misturado com solução anticoagulante de Alsever (glicose 2,05%, NaCl 0,42%, citrato tri-sódico 0,8%, ácido cítrico 0,055% em água destilada) na proporção 1:1. Para obtenção das hemácias, uma alíquota de sangue com o anticoagulante foi diluída (1:10 v/v) em solução salina (NaCl 0,15 M) e centrifugada a 3000 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram resuspendidas em salina e novamente centrifugadas (3000 g por 3 min). Este procedimento foi repetido por três vezes ou até obtenção de um sobrenadante incolor. As células lavadas foram resuspendidas em tampão fosfato com salina (PBS) pH 7,4 de maneira a obter uma suspensão 2% v/v.

3.5.2 Teste de atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada conforme metodologia descrita por Habermann e colaboradores (1981). Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de eritrócito (obtida de acordo com o item 3.5.1) foi incubada com amostras

do SpV e da toxina purificada para um volume final de 1000 μL em tampão PBS pH 7,4, durante 30 min a 37°C. Em seguida as misturas foram centrifugadas a 14000 g (1 min; 25°C) e a hemoglobina liberada foi detectada pela densidade óptica a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise em relação à hemólise total (100%), obtida por incubação dos eritrócitos em água.

3.5.3 Teste da susceptibilidade hemolítica de eritrócitos de diferentes espécies ao SpV

Este ensaio foi realizado conforme o item 3.5.2, com alíquotas de 100 μL de suspensão de eritrócito de coelhos, ratos, camundongos e humano.

3.6 Estabilidade de atividade hemolítica

Para determinar condições para manutenção da atividade hemolítica, amostras do SpV (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - obtida experimentalmente) foram armazenadas em diferentes condições de temperatura, pH, concentração salina e agentes estabilizantes durante sete dias e liofilizada.

Temperaturas: 4°C, -20°C, -80°C, -196°C;

Valores de pH: 5,7; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0 (tampão fosfato 50 mM) (4 °C);

Concentrações salinas: 0, 50, 100, 150, 200, 300, 500 e 1000 mM de Cloreto de sódio (NaCl) (4 °C);

Agentes estabilizantes: sulfato de amônio $\{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\}$ 1M, Ditioneitol (DTT) 10 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM e glicerol 10% (v/v) (4 °C);

Liofilizado.

Após este período (7 dias), a atividade hemolítica destas amostras foi analisada de acordo com o item 3.5.2 em eritrócitos de coelho e comparadas à atividade da peçonha recém extraída considerada 100%. A atividade foi

expressa como porcentagem da atividade hemolítica residual. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 Efeito do tempo de estocagem

A atividade hemolítica foi avaliada durante 7, 14, 28, 60, 90 e 120 dias a -80 e -196 °C, quando a Sp-CTx foi mantida nas condições consideradas ótimas (pH e diferentes co-solutos), obtidas conforme o item anterior.

3.8 Purificação da toxina Sp-CTx

O processo de purificação de Sp-CTx foi realizado de acordo com o descrito por Gomes e colaboradores (2013). As frações obtidas durante o processo foram avaliadas pela atividade hemolítica.

3.8.1 Primeira etapa de purificação

Após a extração, o SpV foi fracionado por precipitação salina realizada em duas etapas. Inicialmente, adicionou-se 15% (p/v) de sulfato de amônio à SpV, sob agitação lenta por 5 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 30.000 x g por 30 minutos, a 4 °C. O material precipitado foi separado do seu sobrenadante, dissolvido em 2mL de PBS e denominado P15 (precipitado com 15% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Em seguida, adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao sobrenadante para uma concentração final de 35% p/v. Após centrifugação a 30.000 x g por 30 minutos e a 4 °C o material precipitado foi dissolvido em 2 mL de PBS e denominado P35 (precipitado com 35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Todo o processo foi realizado a 4 °C. A atividade hemolítica foi avaliada nas frações P15, P35 e no sobrenadante (SN) obtido após remoção do precipitado com 35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.8.2 Segunda etapa de purificação

A fração com atividade hemolítica (P35) teve sua concentração ajustada para condição do tampão de equilíbrio (A) da cromatografia e foi filtrada em membrana de 0,22 μm . A amostra foi aplicada em coluna de interação hidrofóbica – Butil HP (1,6 x 2,5cm) – em sistema de Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência (HPLC- Shimadzu LC20AT), equilibrado com o tampão (A): fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 com 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e eluída com tampão (B): fosfato de sódio 100 mM pH 7,4. O gradiente para a eluição das proteínas foi: 0-15 min: 0% do eluente, 15-20 min: 60% do eluente, 20-50 min: 80% do eluente, 50-55 min: 100% do eluente. O fluxo foi de 0,5 mL/min e as proteínas foram detectadas pela absorção a 218 nm.

3.8.3 Terceira etapa de purificação

A fração com atividade hemolítica obtida na etapa anterior teve sua concentração de cloreto de sódio ajustada para 0,10 M e seu volume reduzido utilizando-se sistema Amicon Ultra (cut off 10kDa) a 4 °C de acordo com o especificado pelo fabricante. Este material foi aplicado em uma coluna de troca aniônica – Synchronpack SAX 300 (250 x 4.6mm, Eprogen, USA) – em sistema HPLC, previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,10 M e eluída com tampão fosfato 20 M, pH 7,4, contendo NaCl 1,0 M. O seguinte gradiente foi usado para eluição das proteínas: 0-10 min: 0% do eluente, 10-15 min: 30% do eluente, 15-50 min: 60% do eluente, 50-55 min: 100% do eluente. O fluxo foi de 0,5 mL/min e as proteínas foram detectadas por absorção a 218 nm.

A fração com atividade hemolítica eluída nesta cromatografia foi correspondente à Sp-CTx (Fig. 9).

3.9 Avaliação da homogeneidade

Durante o processo de purificação, o grau de homogeneidade das frações obtidas nas várias etapas de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sistema SDS-TRICINA, específico e de alta resolução para proteínas de peso molecular de 1 a 100kDa (Schagger & Von Jagow, 1987). O gel de separação contendo 10% de poliacrilamida p/v, 13,3% de glicerol p/v, 0,033% de PSA p/v, 0,033% de temed v/v e 0,1% de SDS p/v, em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,45. Sobre o gel de separação foi preparado o gel de concentração contendo 4% de poliacrilamida, e os mesmos reagentes do gel de separação exceto o glicerol. A eletroforese foi

conduzida sob tensão de 100V à temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,9 (ânodo) e Tris-HCl 0,1 M contendo 0,1 M de tricina e 0,1% de SDS p/v pH 8,25 (cátodo). As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 12% de glicerol p/v, 0,01% de azul brilhante G p/v, e incubadas 30 min a 40 °C. Após a corrida, o gel permaneceu por 30 minutos em solução fixadora metanol: ácido acético: água (50:10:40). Em seguida, foi corado por 1 hora em solução 0,025% de azul brilhante G em ácido acético e água (1:9) e posteriormente descorado em solução de ácido acético 10%.

O padrão de massa molecular utilizado foi uma mistura de proteínas (MERCK & Co) contendo miosina (200 kDa), β -galactosidase (116kDa), fosforilase b (97kDa), soroalbumina bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina da soja (21kDa), lisozima (14kDa) e aprotinina (6,5kDa).

3.10 Caracterização química da Sp-CTx

3.10.1 Estabilidade da toxina

A estabilidade da toxina foi avaliada pela manutenção da atividade hemolítica conforme item 3.5.2, após 7, 14, 30, 45 e 60 dias de incubação em diversas condições de armazenamento (item 3.6), além das condições consideradas "ótimas" para estocagem do veneno bruto.

3.10.2 Avaliação da atividade hemolítica de Sp-CTx na presença de lipídios de membrana

O envolvimento dos lipídios de membrana na formação de poro pela Sp-CTx foi avaliado por ensaios hemolíticos na presença de fosfolipídios de membrana de acordo com o método descrito por Chen e colaboradores (1997) e Ueda e colaboradores (2006), com algumas modificações. Inicialmente, os lipídios foram solubilizados em 4% de clorofórmio em tampão HEPES (0,02 M contendo 0,15 M NaCl, pH 7,2).

Previamente, uma amostra da toxina, contendo uma quantidade de proteína suficiente para produzir 80% de hemólise (EC_{80}), foi pré incubada com diferentes concentrações dos lipídios: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e colesterol em um volume final de 1 mL em tampão HEPES, por 30 minutos a 4°C. Após esse período, a hemólise foi avaliada pela incubação da mistura com 100 µL de suspensão de eritrócito de coelho 2% v/v durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente as soluções foram centrifugadas a 14.000 x g por 4 minutos a 25°C e a hemoglobina liberada foi detectada por medida da densidade óptica do sobrenadante a 540 nm. Desse valor foi subtraída a hemoglobina liberada quando soluções de lipídios foram incubadas com suspensão de eritrócitos na ausência da Sp-CTx.

Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise em relação à hemólise total (100%), obtida por incubação dos eritrócitos em água. Os ensaios foram realizados em triplicata. As concentrações dos lipídios foram definidas experimentalmente: Fosfatidilglicerol – 6,25; 12,5 e 25 µg; Fosfatidiletanolamina – 50; 75 e 100 µg e Colesterol – 25, 50, e 75 µg.

3.10.3 Avaliação do efeito do pH e de íons metálicos na atividade hemolítica de Sp-CTx

O efeito do pH sobre a atividade hemolítica da Sp-CTx foi avaliado conforme descrito no item 3.5.2, utilizando os seguintes tampões fosfato 100 mM pH 5,7; 6,5; 7,0; 7,4 e 8,0 e tampão glicina 50mM pH 8,6; 9,0; 9,6 e 10,4, no meio de incubação.

O efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade hemolítica da Sp-CTx foi avaliado de acordo com o método descrito por Sanchez e colaboradores (2007). Amostras de Sp-CTx correspondentes a uma EC_{60} , contidas em 100 µL de PBS, foram incubadas com 100 µL de suspensão de eritrócitos de coelho 2% na presença dos íons metálicos: $MgCl_2$ (2 mM), $CaCl_2$ (2 mM), e $ZnCl_2$ (2 mM) e do quelante de metais EDTA (2 Mm), para um volume final de 1 mL em tampão HEPES a 37°C por 30 minutos.

A hemoglobina liberada foi detectada conforme o item 3.5.2 Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.10.4 Detecção de glicoconjugados na Sp-CTx

Para estudar o perfil de glicosilação da Sp-CTx utilizamos um painel de lectinas com capacidade de reconhecer diferentes resíduos de açúcar típicos para N e O glicoconjugados (DIG Glycan Differentiation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), segundo recomendação do fabricante. A Tabela 2 mostra as lectinas utilizadas neste experimento e suas respectivas estruturas alvo.

TABELA 2 - LECTINAS FORNECIDAS PELO KIT E SUAS RESPECTIVAS ESTRUTURAS-ALVO.

LECTINAS	ESTRUTURA-ALVO
PNA Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>	Galactose $\beta(1-3)$ N-acetilgalactosamina em O-glicanos
GNA Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>	Manose terminal $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-2)$ Manose em O-glicanos e N-glicanos
SNA Aglutinina de <i>Datura stramonium</i>	Ácido Siálico terminal $\alpha(2-6)$ Galactose em complexos de N-glicanos e O-glicanos
MAA Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i>	Ácido Siálico terminal $\alpha(2-3)$ Galactose em complexos de N-glicanos e O-glicanos
DSA Aglutinina de amendoim	Galactose $\beta(1-4)$ N-acetilglucosamina em híbridos e complexos de N-glicanos e O-glicanos, e N-acetilglucosamina em O-glicanos

Após eletroforese SDS-PAGE em gel gradiente 7,5-15% (Laemmli et al., 1970) as proteínas, fornecidas pelo kit (Asilofetuina, carboxypeptidase y, transferrina e fetuina), utilizadas como controle positivo (para a ligação com

as lectinas) e 0,1 µg de Sp-CTx foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL 0,45µ (GE Healthcare). A transferência foi avaliada pela coloração com solução de Ponceau S por 5 minutos. Após esse procedimento, a membrana foi submetida a: duas lavagens com água destilada; incubação em solução de bloqueio 10% por 30 minutos; duas lavagens com TBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5) de 10 minutos e uma lavagem com Tampão 1 (TBS acrescido de 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,5) por 10 minutos.

Posteriormente, a membrana foi incubada com as diferentes lectinas conjugadas à digoxigenina (GNA, SNA e DSA (10 µL cada); MAA (50 µL) e PNA (100 µL) em 10 mL do tampão 1 por uma hora. Após esse período, as membranas foram lavadas com TBS (3x) por 10 minutos e incubadas com solução de TBS contendo 10 µL do anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina (7,5 U), por uma hora, seguida de outras três lavagens em TBS por 10 minutos. A reação foi revelada com uma solução contendo 100 µL do substrato da fosfatase alcalina NBT/BCIP (4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), em 10 mL do tampão 2 (0,1 M Tris-HCl, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl, pH 9,5). Após a revelação das bandas, a membrana foi lavada com água destilada a fim de cessar a reação. Os reagentes utilizados nesse experimento foram fornecidos pelo kit.

3.11 Caracterização farmacológica da Sp-CTx

3.11.1 Atividade inflamatória da Sp-CTx

A atividade inflamatória foi avaliada pelas respostas edematogênica e nociceptiva. Os animais foram alocados em gaiolas de vidro espelhado para facilitar a visualização das respostas. Após um período de adaptação de 10 minutos, amostras de Sp-CTx (0,1; 0,5 e 1,0 µg), diluídas em PBS para um volume final de 30µL, foram injetadas na região intraplantar (i.pl.) da pata traseira direita de camundongos Swiss machos (20 gramas). O grupo controle foi injetado com 30µL de PBS. Foram utilizados 4 animais por dose testada.

O edema local foi quantificado pela diferença da espessura da pata traseira direita antes e após a injeção da amostra nos tempos de 0,5; 2; e 6 h. As medidas foram feitas com um paquímetro digital. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem do aumento da pata em relação à espessura inicial (Lima *et al.*, 2003).

A atividade nociceptiva foi avaliada de acordo com o descrito por Hunskaar e colaboradores (1985). O índice de nocicepção foi quantificado pelo tempo em que o animal permaneceu com a pata injetada em contato com a boca. Cada animal foi acompanhado por 30 min (Lima *et al.*, 2003).

3.11.2 Estudo do mecanismo de formação do Edema

Com o objetivo de avaliar o mecanismo da formação do edema, 30 minutos antes da injeção de 1 µg de Sp-CTx (conforme descrito no item 3.11.1), os camundongos foram pré-tratados com diferentes drogas anti-inflamatórias por via intraperitoneal (i.p.), diluídas em PBS para um volume final de 100 µL. O resultado foi expresso de acordo com o item 3.11.1. O experimento, realizado de acordo com Menezes e colaboradores (2012), foi organizado da seguinte forma:

Grupo controle positivo - pré-tratamento com salina (i.p.) + 1 µg de Sp-CTx (i.pl.);

Grupo controle negativo - pré-tratamento com salina (i.p.) + 30 µL de salina (i.pl.);

Grupo HOE-140 - pré-tratamento com 100 nmol/Kg de HOE-140 (antagonista dos receptores B2 de bradicinina, via i.p.) + 1 µg de Sp-CTx (i.pl.);

Grupo aprotinina - pré-tratamento com 8 mg/Kg de aprotinina (inibidor de serino proteases, via i.p.) + 1 µg de Sp-CTx (i.pl.)

3.12 Análise Estatística dos Dados

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida de um pós-teste de Tukey (*Prism Graph 6.0*). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Conteúdo protéico

Através da metodologia utilizada para extração da peçonha (*batch method*), obteve-se, em média, 20 mg de proteína por peixe.

4.2 Teste da susceptibilidade hemolítica de diferentes espécies ao SpV

Como pode ser observado na figura 4, somente os eritrócitos de coelho e ratos foram hemolisados pelo SpV. Cinco e dez microgramas de SpV produziram 84 e 87 % de hemólise em eritrócitos de coelhos, e 7% e 32% de hemólise em eritrócitos de ratos, respectivamente. O EC₅₀ para eritrócito de coelho foi 1 µg/mL e > 10 µg/mL para ratos. Entretanto, a maior dose testada não foi efetiva em hemolisar eritrócitos humanos e de camundongos. Os eritrócitos de coelho foram utilizados para o estudo da estabilidade da atividade hemolítica.

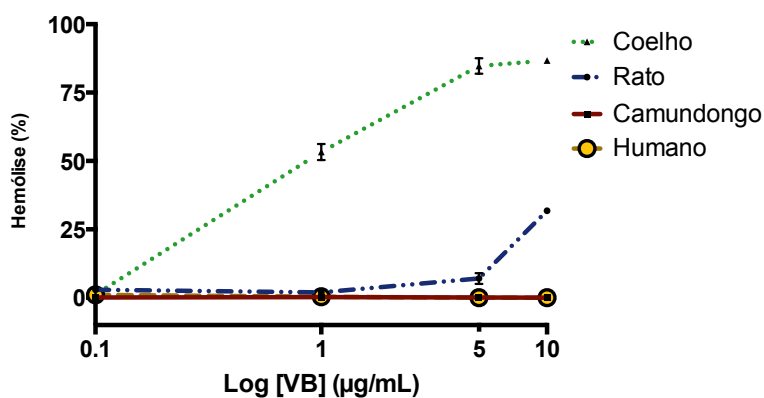


FIGURA 4 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA PEÇONHA DE *Scorpaena plumieri* SOBRE ERITRÓCITOS DE VÁRIAS ESPÉCIES. Suspensões de eritrócitos 2% (v/v) de diferentes animais (coelho, rato, camundongo e humano) foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, com concentrações crescentes de SpV: 0,1; 1,0; 5,0 e 10 µg/mL. Os resultados foram expressos em % da hemólise total. Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ponto representa a média ± SD.

4.3 Estudo das condições ótimas para estabilização da atividade hemolítica do SpV

A figura 5A mostra os resultados da atividade residual de amostras de SpV, armazenadas em diferentes temperaturas e submetida a liofilização. O armazenamento de SpV a -80 e -196 °C, mantem totalmente a atividade hemolítica. O armazenamento a 4 e -20 °C acarreta perdas de 85 e 100% da atividade hemolítica, respectivamente. A liofilização acarreta perda de 60% desta atividade.

O resultado do armazenamento de SpV em soluções tampão com diferentes valores de pH (4 °C) está mostrado na figura 5B. Como pode ser observado aproximadamente 100% da atividade foi mantida em pH 7,4 e 8,0. Entretanto, o armazenamento em pH menor que 6,5 acarreta perda total da atividade.

Dentre as diferentes concentrações salinas testadas (fig. 5C), as concentrações superiores a 300 mM foram as mais efetivas para manter a atividade hemolítica a 4 °C (300, 500 e 1000mM mantiveram 60, 80 e 80% respectivamente).

A figura 5D mostra os resultados da atividade residual de amostras de SpV, armazenadas na presença de diversos agentes a 4 °C. Dentre os avaliados, o sulfato de amônio e o glicerol foram os mais efetivos na preservação da atividade e mantiveram 70 e 30% da atividade respectivamente. A estocagem da peçonha na presença simultânea destes dois agentes, preservou totalmente a atividade. O DTT e o EDTA pouco contribuíram para a estabilidade da atividade hemolítica (Fig. 5D).

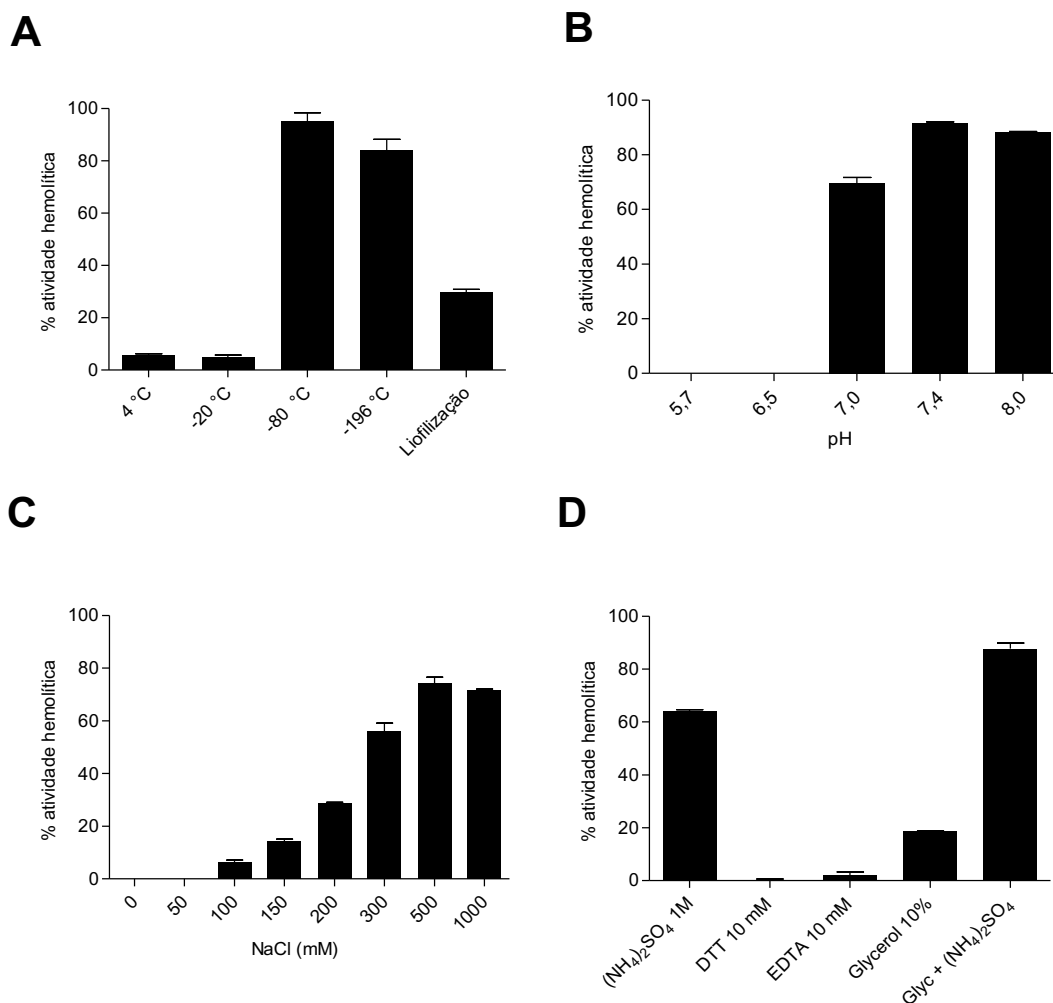


FIGURA 5 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA RESIDUAL (% HEMÓLISE) DO SpV (5 mg) ARMAZENADO POR 7 DIAS EM: (A) diferentes temperaturas e submetido à liofilização; (B) soluções tampão de diferentes pH; (C) diferentes concentrações salinas; (D) na presença de diferentes agentes. Controle: Atividade hemolítica do SpV recém extraído. Os resultados foram expressos em porcentagem da hemólise total, calculada com base na atividade do SpV recém extraído (100% de hemólise). Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada barra representa a média \pm SD.

4.4 Avaliação da estabilidade da atividade hemolítica do SpV nas condições ótimas

A figura 6 mostra o acompanhamento da atividade hemolítica de amostras de SpV armazenadas a -80 e -196 °C durante 120 dias, nas condições definidas

como estabilizantes (pH 7,4; 500 mM de NaCl; 1 M de sulfato de amônio e 10% de glicerol). Após 30 dias de estocagem a atividade hemolítica residual foi de 93% e 97%, para -80 °C e -196 °C, respectivamente, demonstrando que não há perda significativa da atividade. Posteriormente, houve uma diminuição gradativa da atividade durante o armazenamento, com perda de aproximadamente 50% e 35%, no período de 120 dias, quando armazenados a -80 e -196 °C, respectivamente.

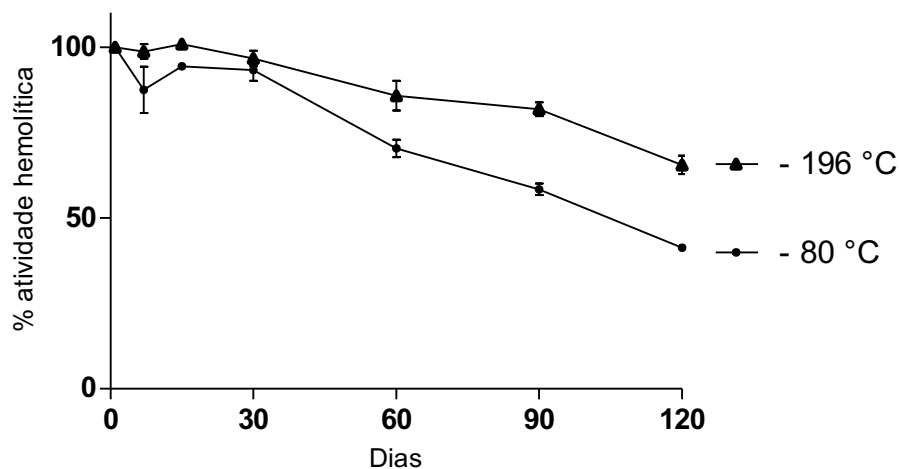


FIGURA 6 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA RESIDUAL (% HEMÓLISE) DO SpV ARMAZENADO A -80 e -196 °C NAS CONDIÇÕES: 500 mM NaCl; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10% glicerol em pH 7,4, por 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem da hemólise total, calculada com base na atividade do SpV recém extraído (100% de hemólise). Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ponto representa a média \pm SD.

4.5 Purificação da Sp-CTx

O isolamento da Sp-CTx foi alcançado com três etapas de purificação de acordo com método já preconizado na literatura. O primeiro envolveu o fracionamento do SpV por precipitação salina sequenciada com sulfato de amônio, e foram obtidas três frações (P15, P35 e SN). A atividade hemolítica estava associada principalmente ao precipitado obtido com 35% de sulfato de amônio e foi denominada CF-I (*cytolytic fraction I*). A CF-I correspondeu a 38% do material inicial. Considerando a quantidade total de proteína aplicada

pode se observar na análise do perfil proteico das frações (P15, P35 e SN) um enriquecimento da banda correspondente a toxina hemolítica (fig. 7).

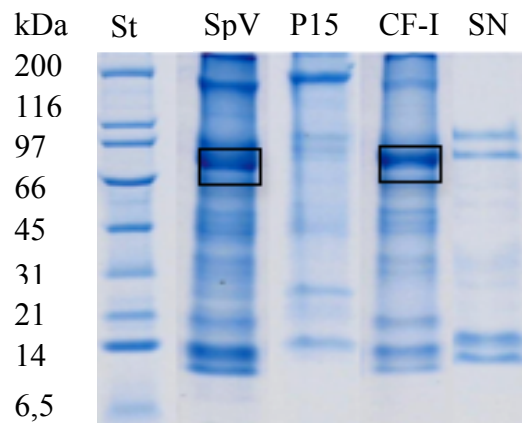


FIGURA 7– PERFIL ELETROFORÉTICO SDS-PAGE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO. Gel de Poliacrilamida 10%. Amostras: Frações eluídas da precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. St– padrão de peso molecular; 30 μg – SpV e 15 μg das amostras P15, CF-I e SN.

O CF-I foi separado em 6 frações principais por cromatografia de interação hidrofóbica (HPLC) (fig. 8); a atividade hemolítica foi detectada nas frações eluídas com 70% do eluente. Este material foi agrupado e a amostra resultante foi denominada CF-II (*cytolytic fraction II*).

O fracionamento de CF-II na cromatografia de troca aniônica resultou em três picos proteicos principais (Figura 9). A atividade hemolítica estava associada ao pico proteico eluído com 40% do eluente que corresponde à Sp-CTX. Utilizando-se este processo de purificação a quantidade da toxina obtida na etapa final correspondeu a 0,2 - 0.25 % do material utilizado na etapa inicial.

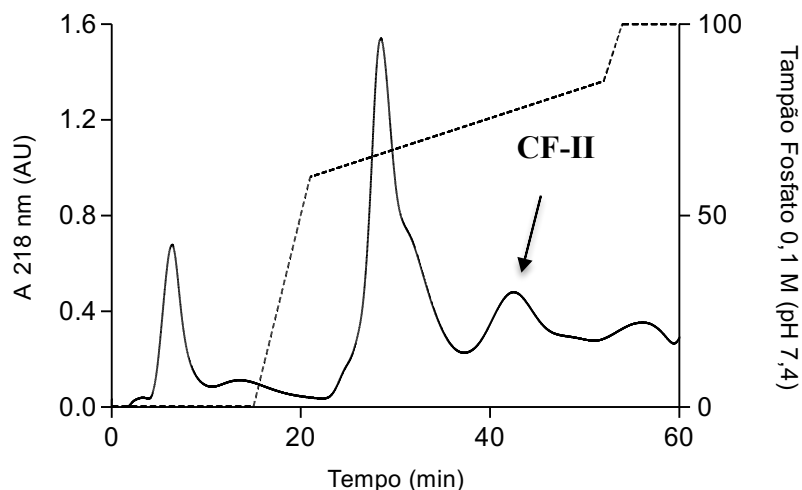


FIGURA 8 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO HEMOLÍTICA CF-I: Cromatografia de interação hidrofóbica – Coluna: Butil HP (1,6 x 2,5cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4 com 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e eluída com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4; Amostra: CF-I (4,5 mg de proteínas). Fluxo de 0,5 mL/min. A seta indica a fração hemolítica eluída nesta cromatografia.

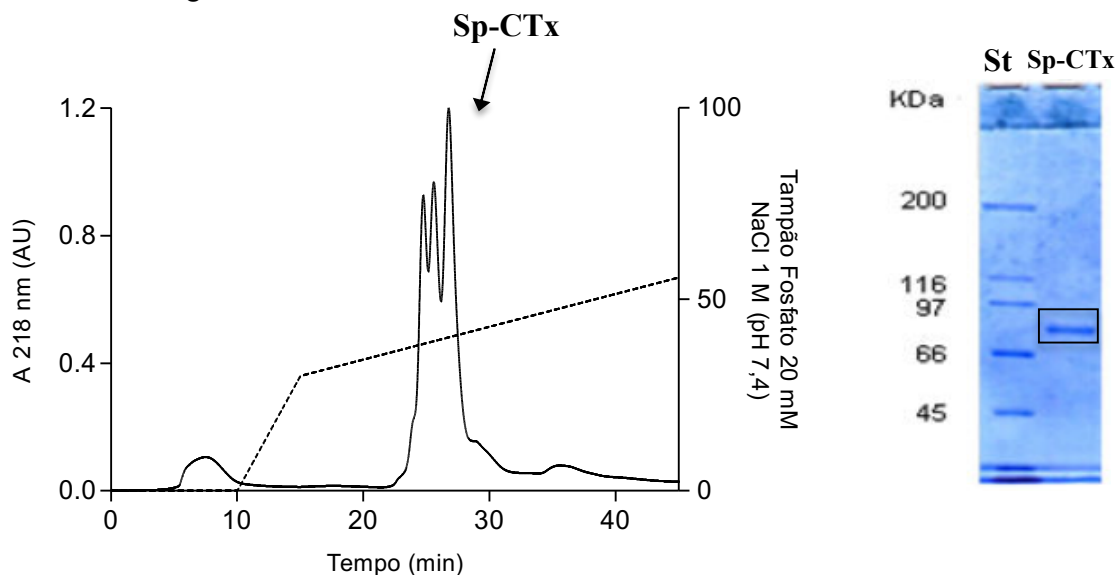


FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO HEMOLÍTICA CF-II: Cromatografia de troca aniônica: Coluna Synchropack SAX 300 (250 x 4,6 mm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 com 0,1M NaCl e eluída com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH7,5, 1 M NaCl. Amostra: CF-

II. Fluxo de 0,5 ml/min. A seta indica a fração hemolítica eluída nesta cromatografia. Inserido: Perfil em SDS-PAGE (Gel 10%) da amostra purificada demonstrando sua homogeneidade.

Partindo de aproximadamente 92 mg de proteína de SpV, 230 µg de Sp-CTx foram obtidos, corresponde 0,25% de recuperação. O EC₅₀ da toxina foi de 50 ng/mL (fig. 10), o qual foi 20 vezes menor que o do SpV (1 µg/mL) (figura 4).

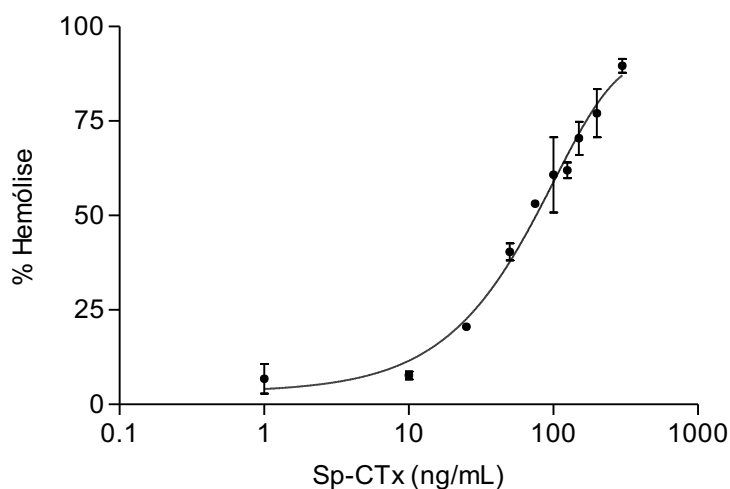


FIGURA 10– CURVA DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA Sp-CTx. Suspensões de eritrócitos 2% (v/v) de coelho foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, com concentrações crescentes de Sp-CTx: 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 e 300 ng/mL. Os resultados foram expressos em % da hemólise total. Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ponto representa a média ± SD.

4.6 Estabilidade da atividade hemolítica da Sp-CTx

A figura 11 mostra, que somente 20% da atividade hemolítica da toxina é perdida quando esta é armazenada a -80 e -196 °C na presença de glicerol 10% por 60 dias. No armazenamento a 4 °C, na presença de sulfato de amônio 1 M, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol 10% e trealose 60 mM, observa-se diminuição da atividade em 60% em 60 dias.

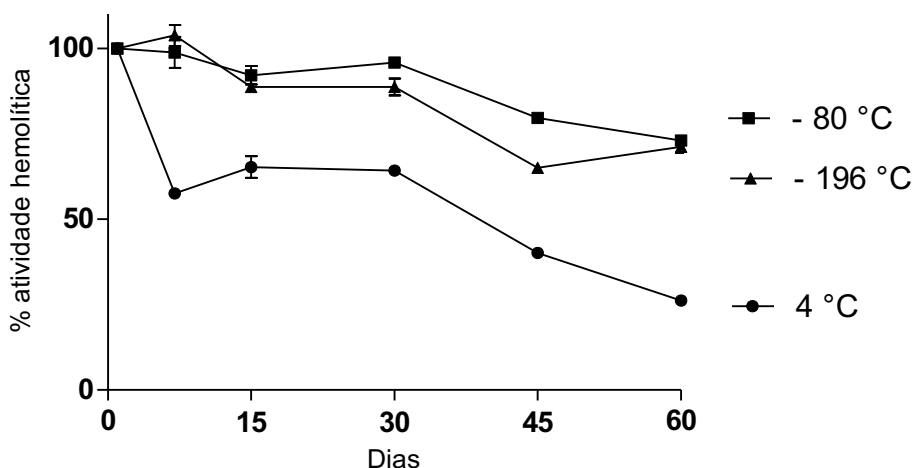


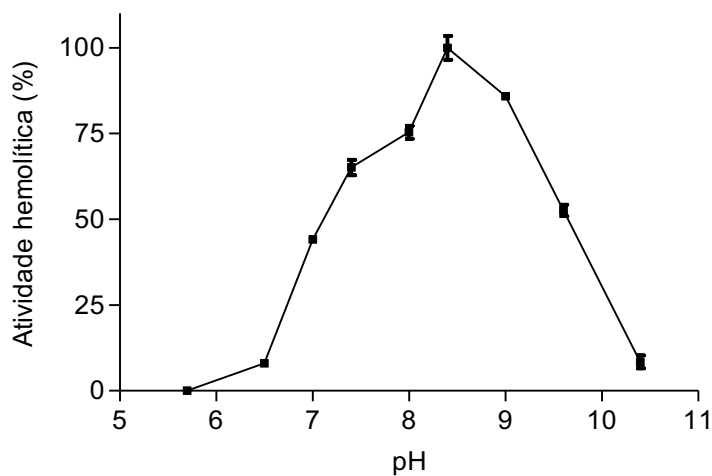
FIGURA 11 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA RESIDUAL (% HEMÓLISE) DE Sp-CTx (50 ng/mL) ARMAZENADA: em glicerol 10% a -80 e -196 °C e em condições ótimas: 500 mM NaCl; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 60 mM trealose e 10% glicerol em pH 7,4 a -4 °C por 60 dias. Os resultados foram expressos em % da hemólise total. Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ponto representa a média \pm SD.

4.7 Influência do pH e de íons metálicos na atividade hemolítica de Sp-CTx

A figura 12A mostra a curva de atividade hemolítica da Sp-CTx em função do pH. O pH ótimo desta atividade foi 8,6 (faixa de 8 a 9). No entanto observou-se uma redução na atividade de forma acentuada em pH 10,4. Também em meios mais ácidos a atividade foi menor.

A presença de íons cálcio aumenta em, aproximadamente, 11 % a atividade hemolítica da Sp-CTx, enquanto que íons magnésio não promovem alterações significativas e a presença de íons zinco e EDTA inibem completamente esta atividade.

A



B

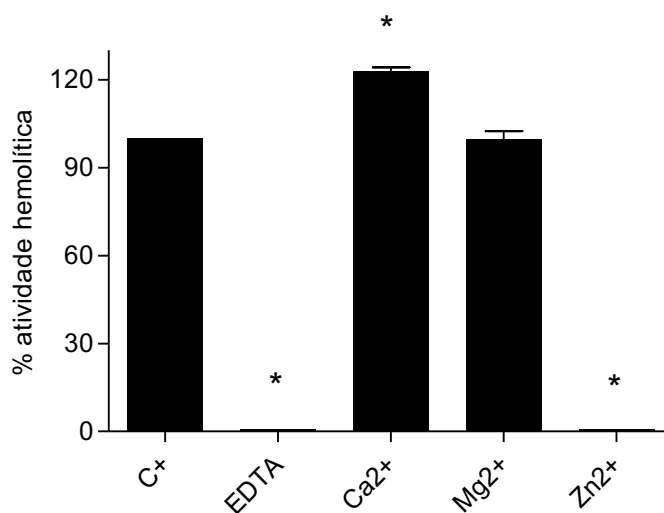


FIGURA 12 – INFLUÊNCIA DO pH e DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA Sp-CTx. A atividade hemolítica da Sp-CTx foi avaliada em diferentes valores de pH (A) e na presença de íons metálicos e EDTA (B). Os resultados foram expressos em porcentagem da hemólise total, calculada por comparação com hemácias em água (A) e por comparação com o EC60 (B), o que corresponde a 100% de hemólise. A concentração dos íons utilizados foi 2mM. (B) * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo (C+ = EC100).

4.8 Efeitos de fosfolipídios de membrana na atividade hemolítica da Sp-CTx

A figura 13 mostra os resultados da atividade hemolítica da Sp-CTx na presença de lipídios de membrana. A presença de fosfatidilglicerol e de colesterol reduzem a hemólise induzida pela Sp-CTx de forma dose dependente. Como pode-se observar, o fosfatidilglicerol apresenta o maior efeito protetor, quando comparado ao colesterol e à fosfatidiletanolamina.

Na dose de 25 μg o fosfatidilglicerol inibiu completamente a atividade hemolítica da toxina, enquanto que os lipídios colesterol e fosfatidiletanolamina, nas maiores quantidades testadas (75 e 100 μg , nesta ordem), bloquearam aproximadamente 80 e 25%, respectivamente da atividade hemolítica da Sp-CTx.

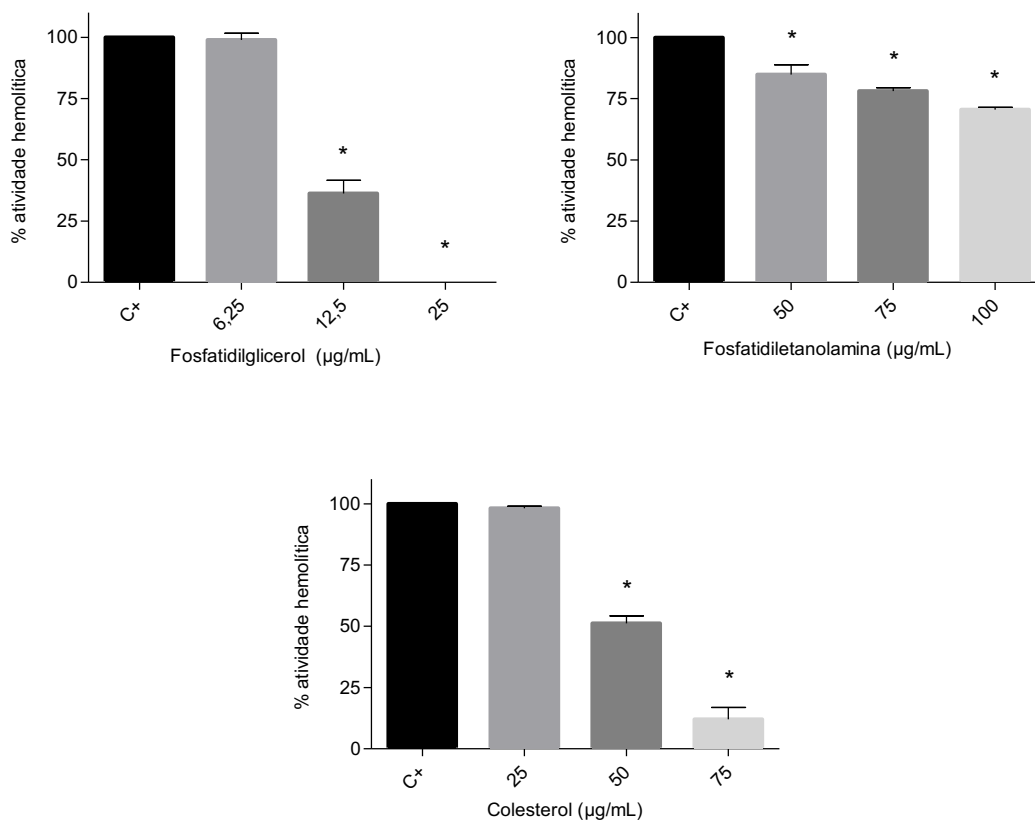


FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DA Sp-CTx NA PRESENÇA DE LIPÍDIOS DE MEMBRANA. A atividade hemolítica da Sp-CTx (EC80) foi avaliada na presença de quantidades crescentes de lipídios. (A) Fosfatidilglicerol, (B) Fosfatidiletanolamina e (C) Colesterol; * $p < 0,05$

comparado com o grupo controle (C+, em comparação com o EC80 da atividade hemolítica).

4.9 Análise do perfil de glicosilação de Sp-CTx

Diferentes subclasses de carboidratos presentes na Sp-CTx foram identificadas utilizando o Dig Glycan Differentiation kit (Roche), seguindo as instruções do fabricante (fig. 14). Como pode-se observar as lectinas MAA e DSA se ligam a Sp-CTx, o que sugere que esta toxina apresenta os seguintes motivos de carboidratos: ácido siálico terminal $\alpha(2-3)$ Galactose em complexos de N-glicanos e/ou O-glicanos e Galactose $\beta(1-4)$ N-acetilglucosamina em híbridos e/ou complexos de N-glicanos e/ou O-glicanos, e/ou N-acetilglucosamina em O-glicanos. Já as outras lectinas testadas, a GNA que reconhece fortemente proteínas com glicosilação do tipo manose-manose terminal, a PNA que se liga a carboidratos do tipo Gal-GalNAc, e a SNA que interage fracamente com proteínas com glicosilação do tipo ácido siálico não foram reconhecidas pela Sp-CTx.

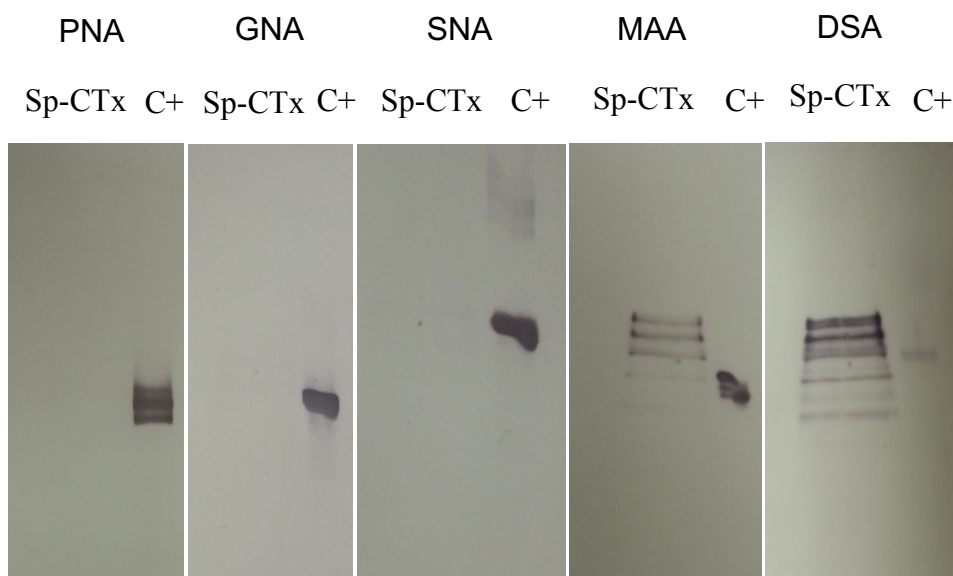


FIGURA 14 – ANÁLISE DO PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DA Sp-CTx. A Sp-CTx e as proteínas controle N/O-glicosiladas foram transferidas para membranas de nitrocelulose após a separação por SDS-PAGE em gel de poliacrilamina gradiente (7,5-15%). Essas membranas foram incubadas

separadamente com as lectinas conjugadas com digoxigenina e posteriormente com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina. A reação foi revelada com 4-nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP).

4.10 Ensaio da atividade edematogênica:

A figura 15 mostra o curso temporal da formação do edema pela Sp-CTx. Para isto foi usado o teste da pata de camundongo, com a injeção de 0,1, 0,5 e 1,0 μg de Sp-CTx por animal. A resposta edematogênica foi dose dependente. Trinta minutos após a injeção da Sp-CTx um aumento máximo de 12; 24 e 38% na espessura da pata foi observado com 0,1; 0,5 e 1,0 μg da toxina, respectivamente. O edema se manteve significativamente elevado até 2 h para as maiores doses (0,5 e 1,0 μg). Após 6 h a espessura da pata já se apresentava próximo ao normal para todas as doses.

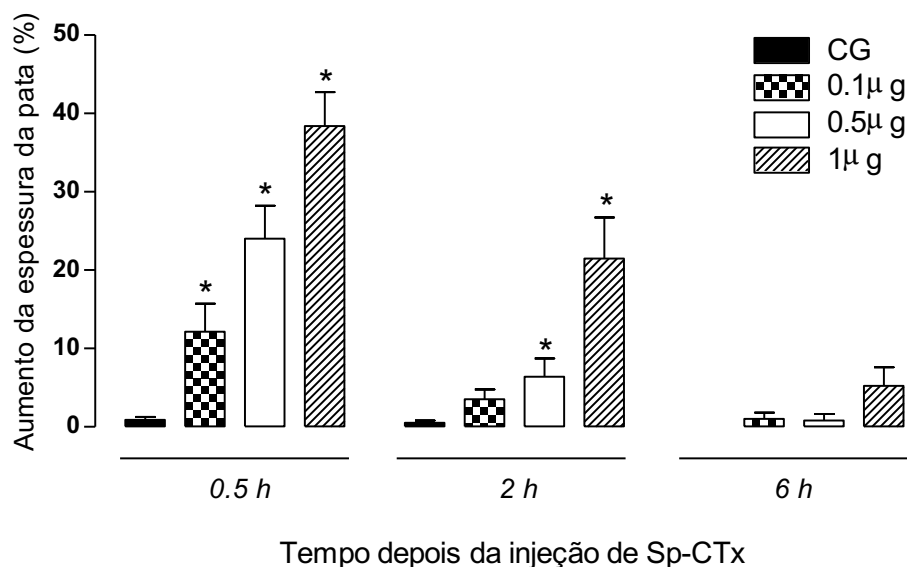


FIGURA 15– ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DA Sp-CTx: Amostras de SpV contidas em 30 μL de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata antes e após a injeção da peçonha nos tempos estipulados, sendo expresso em porcentagem de aumento da pata. A espessura da pata foi medida com auxílio de um paquímetro digital.

Camundongos injetados com PBS estéril foram considerados como grupo controle (CG). Cada ponto representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo-controle, N = 4.

4.11 Ensaio da atividade nociceptiva:

A figura 16 mostra a curva dose-resposta obtida para a atividade nociceptiva induzida pela Sp-CTx, demonstrando que além da resposta edematogênica local a peçonha do peixe-escorpião também causa intensa nocicepção local. Imediatamente após a injeção os animais exibiram comportamento característico de nocicepção (ato de lambem e/ou morder a pata injetada). As três doses testadas apresentaram atividade nociceptiva. Amostras de 0,1, 0,5 e 1,0 μg induziram nocicepção de 23, 64 e 99 segundos respectivamente.

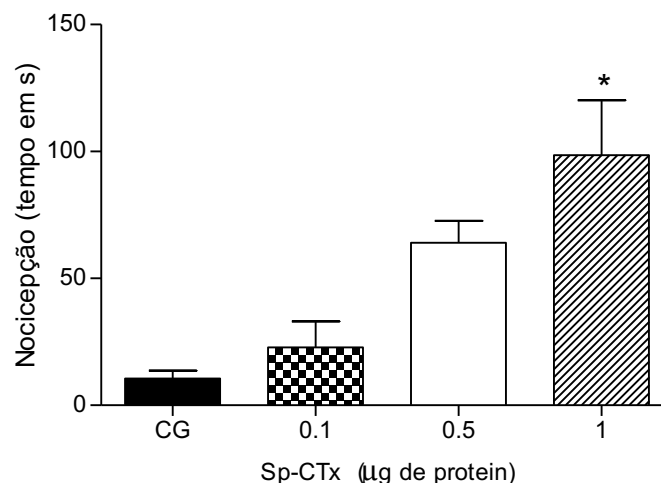


FIGURA 16: ATIVIDADE NOCICEPTIVA DA Sp-CTx: Amostras de Sp-CTx contidas em 30 μL de PBS foram injetadas (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O índice de nocicepção foi quantificado pelo tempo em que o camundongo permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante um período de 30 minutos. Camundongos injetados com PBS estéril foram considerados grupo controle (CG). Cada ponto representa a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo-controle, N = 4.

4.12 Estudo da via de formação do edema

Para investigar a via de formação do edema, os animais foram pré-tratados com diferentes drogas anti-inflamatórias. As figuras 17A e B mostram o curso temporal da resposta edematogênica induzida pela injeção de 1 µg de Sp-CTx 30 minutos após a administração dos anti-inflamatórios. Um aumento na espessura da pata (edema) de cerca de 80% foi observado no grupo controle positivo (Salina + Sp-CTx), enquanto animais do grupo Aprotinina + Sp-CTx apresentaram um edema de apenas ~40%, demonstrando que esse inibidor de serino-proteases na concentração 8mg/kg bloqueou em ~50% a formação do edema, já na primeira meia hora após a injeção de Sp-CTx. O efeito bloqueador da aprotinina foi persistente, observado até 6 horas após injeção de Sp-CTx. O pré-tratamento com icatibanto (HOE-140), um antagonista seletivo de receptor B2 de bradicinina, reduziu em aproximadamente 50% o aumento da espessura da pata do camundongo, durante todo o tempo de observação da resposta.

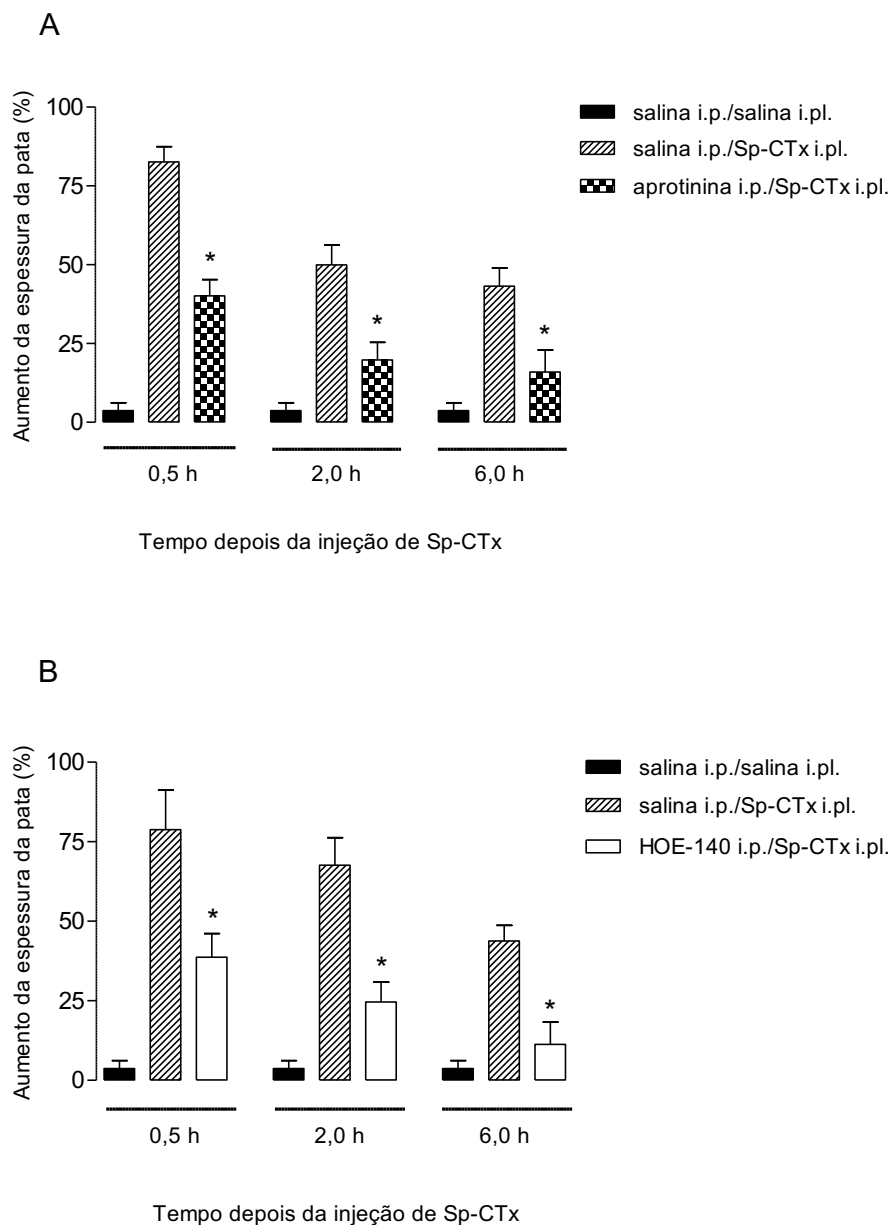


FIGURA 17: ESTUDO DA VIA DE FORMAÇÃO DO EDEMA INDUZIDO POR Sp-CTx. Diferentes grupos de camundongos foram pré-tratados via i.p. com: (A) 8 mg/Kg de aprotinina; e (B) 100 nmol/Kg de HOE-140. Após 30 minutos 1 µg de Sp-CTx em 30 µL de salina foi injetado (i.pl.) na pata traseira direita de camundongos. O edema local foi quantificado por meio da diferença entre a espessura da pata injetada antes e após a injeção da peçonha nos tempos determinados, sendo expresso em porcentagem de aumento da pata. Cada ponto representa a média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado com salina i.p./ Sp-CTx (1 µg).

5 Discussão

Como já descrito anteriormente, peçonhas de peixes, assim como as de outros animais, são coquetéis altamente complexos de componentes bioativos que incluem proteínas, peptídeos e outros mediadores químicos. O estudo desses componentes pode contribuir para várias áreas biológicas, incluindo farmacologia (descoberta de drogas), imunologia (terapias para envenenamento) e mecanismos moleculares fisiopatológicos (ligação e interação a proteínas/receptores).

Enquanto peçonhas de animais terrestres vem sendo muito estudadas, as de peixe permanecem relativamente pouco exploradas (Campos et al., 2016). Este fato se deve principalmente à sua natureza lábil – uma característica comum destas peçonhas – que leva à perda de algumas de suas atividades farmacológicas após o armazenamento (Andrich, 2009). A labilidade das peçonhas de peixe tem sido atribuída à presença de biomoléculas termolábeis (toxinas proteicas) de alta massa molecular, as quais são mais susceptíveis à desnaturação (Garnier et al., 1995; Church e Hodgeson, 2002) e/ou a presença de enzimas proteolíticas as quais podem degradar componentes farmacologicamente ativos da peçonha (Carrijo et al., 2005).

Entre outras, a atividade hemolítica é uma das características comuns entre peçonhas de peixes. Intensa atividade hemolítica tem sido descrita para peçonhas dos peixes *Synanceja verrucosa*, *Trachinus draco*, *Pterois volitans* e *S. plumieri* (Garnier et al., 1995; Chhatwal e Dreyer, 1992; Shiomi et al., 1989; Carrijo et al., 2005). Alguns autores demonstram que esta atividade é espécie-específica (Chhatwal e Dreyer, 1992; Poh et al., 1991).

Para verificar a especificidade do efeito hemolítico de SpV, esta atividade foi avaliada em eritrócitos de várias espécies. E, similar a outras peçonhas de peixe, eritrócitos de coelho são mais os mais susceptíveis à hemólise (EC_{50} 1 $\mu\text{g/mL}$) (fig. 4), seguidos pelos de ratos ($EC_{50} \gg 10 \mu\text{g/mL}$). Eritrócitos humanos e de camundongos foram insensíveis. Este dado está parcialmente de acordo com Duhig e Jones (1928) e Kreger (1991), que demonstraram que peçonhas dos peixes pedra *Synanceja horrida* e *Synanceja trachynis*

apresentam maior susceptibilidade para eritrócitos de coelho e uma pequena atividade sobre eritrócitos humanos.

Em 1992, Chhatwal e Dreyer descreveram que a ruptura dos eritrócitos é precedida por uma interação do componente hemolítico da peçonha de peixes com receptores específicos na membrana, e que a ação hemolítica espécie-específica dessas peçonhas pode ser explicada por essa interação. Além disso, devido à ausência de fosfolipases em peçonhas de peixes, a atividade hemolítica é considerada como sendo direta, através da formação de poros na membrana dos eritrócitos (Gomes et al., 2013), o que reforça a hipótese da interação.

Considerando que a estabilidade de uma proteína é um importante e útil critério para a sua caracterização, e que as citolisinas de peixes detêm as principais atividades de peçonha de peixes, a estabilidade destas proteínas frente ao armazenamento é importante e possibilita estudos futuros sobre as atividades desta toxina bem como a definição dos mecanismos de ação envolvidos nos seus efeitos.

Para que uma proteína permaneça em seu estado nativo, este estado deve apresentar uma energia livre mais baixa do que a do estado desnaturado. A desnaturação da proteína é, portanto, a consequência da quebra de interações químicas que mantêm a menor energia do estado nativo. As principais forças não covalentes que contribuem favoravelmente para a estabilidade de uma proteína são as interações de Van der Waals, ligação de hidrogênio e o efeito hidrofóbico. Outras forças, tais como interações iônicas, podem ser favoráveis ou não, dependendo do contexto (Wu, H., 1931; Kauzmann, W., 1959).

A estabilidade proteica pode ser aumentada através da utilização de aditivos como sistemas de tamponamento e co-solutos. Portanto, a otimização das condições de estabilidade pode ser atingida por um processo de triagem, onde o pH, a temperatura e a presença de co-solutos como sais ou osmólitos são variados sistematicamente (Golovanov et al., 2004).

Os co-solutos podem ser divididos em duas classes: cosmotrópicos, aqueles que favorecem o estado nativo e estabilizam as proteínas, e caotrópicos, os que favorecem o estado desnaturado (Moelbert et al., 2004). Esta terminologia pode não ser sempre válida, visto que essas propriedades podem variar de acordo com o ambiente em que estes agentes se encontram (temperatura e pH) e com a sua concentração (Zhang e Cremer, 2006).

Como já descrito, várias das atividades induzidas por peçonhas de peixes são instáveis, dentre elas a atividade hemolítica. Algumas dessas atividades são extremamente sensíveis a variações físico-químicas do meio, tais como pH, concentração de sais, temperatura, liofilização, congelamentos e descongelamentos sucessivos (Schaeffer et al., 1971).

Os resultados da avaliação da estabilidade da atividade hemolítica do SpV em eritrócitos de coelho – no que se refere à temperatura de armazenamento – demonstraram que o armazenamento do SpV a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrogênio líquido) mantém a atividade hemolítica. Entretanto, o armazenamento do SpV a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ acarretou em perda total dessa atividade.

Vinte graus negativos é a temperatura em geral usada para estocagem de soluções proteicas. Entretanto, como corroborado pelos nossos resultados, este processo pode induzir danos irreversíveis em proteínas lábeis. Varias mudanças físicas acompanham o congelamento lento que ocorre a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando em diversos tipos de estresse como: (i) formação de gelo, (ii) aumento da concentração de soluto devido à cristalização da água, (iii) cristalização eutética de solutos de tampão e (iv) modificações de pH, que são capazes de levar à desnaturação proteica (Bhatnagar et al., 2007). Ao contrário do congelamento lento, o congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ocorre de forma rápida, não levando aos estresses descritos acima e, portanto, não causando danos à estrutura proteica (Shikama e Yamazaki, 1961).

A liofilização também acarretou perda significativa (60%) da atividade hemolítica do SpV. Este processo envolve a remoção de água das amostras através de sublimação, sendo rotineiramente empregado no armazenamento de materiais por tempo prolongado. A ligação de hidrogênio entre a molécula

de água e a proteína geralmente é considerada crítica para a sua termo-estabilidade. Portanto, a remoção da camada de hidratação da proteína pela liofilização pode levar a uma perturbação estrutural. Com isso, o equilíbrio entre o estado nativo da proteína e seu estado desnaturado é desfeito e a proteína tende a se desnaturar (Patel et al., 2010).

Quando o SpV foi armazenado em soluções com diferentes valores de pH, a atividade hemolítica foi mantida em valores superiores a 7,0 enquanto os meios ácidos, pH 5,4 e 6,5, promoveram perda total dessa atividade. Alterações no pH do meio podem afetar a carga livre total de proteínas e a distribuição de cargas em sua superfície externa. Linderstrom-Lang (1924) (apud Shaw et al., 2001) descreveu um modelo no qual uma proteína é considerada uma esfera carregada cuja energia livre é proporcional à sua carga livre superficial, tornando-a repulsiva em qualquer pH exceto em seu ponto isoelétrico, no qual sua carga líquida é zero. Estas mudanças de carga podem afetar a estrutura, estabilidade e conseqüentemente a atividade de proteínas (Yang e Honig, 1993).

Também demonstramos que a presença dos sais NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução de armazenamento contribuiu para a manutenção da atividade hemolítica de SpV. Sais iônicos podem afetar a estabilidade de proteínas de várias formas sendo que os efeitos resultam em interações íon-específicas inerentes a cada proteína. Os grupos sulfato e cloreto são ânions classificados como *salting-out*, da série de Hofmeister. Estes ânions exercem seus efeitos através da alteração das propriedades de ligação do hidrogênio-água com a superfície proteica: as moléculas de água são atraídas por estes ânions, o que diminui o número de moléculas de água disponíveis para interagir com a parte carregada da proteína. Este processo culmina no aumento da tensão superficial do solvente e no fortalecimento da interação hidrofóbica das proteínas (Bolhuis et al., 2008). Tanto o aumento da tensão superficial do solvente quanto o fortalecimento da interação hidrofóbica contribuem para a estabilidade proteica (Lin e Timasheff, 1996; Bolhuis et al., 2008). Entretanto, deve-se levar em conta que pequenas alterações na concentração de sais podem acarretar em efeitos drásticos na solubilidade de

uma proteína, o que justifica o emprego de pequenos incrementos na concentração de um sal enquanto a estabilidade de uma determinada proteína está sendo investigada (Kramer et al., 2012).

Dentre os co-solventes mais utilizados para estabilização de proteínas estão os polióis, sendo o mais usado o glicerol. Neste trabalho observamos que a presença do glicerol 10 % diminui a perda da estabilidade de SpV quando armazenado a -196 °C. A capacidade do glicerol em atuar como um agente estabilizante proteico foi já relatada por autores como Ó'Fágáin (2003) e Nita et al. (2007). Um estudo realizado por Vagenende e colaboradores (2009) descreve que a redução da flexibilidade proteica, a estabilização de intermediários parcialmente desdobrados e a redução na agregação de proteínas nativas, são os possíveis mecanismos de estabilização proteica promovido pelo glicerol.

Também demonstramos que na presença de agente redutor (DTT), a atividade hemolítica do SpV foi totalmente abolida. Este resultado sugere que a molécula responsável por esta atividade apresenta cistina (duas cisteínas formando uma ponte dissulfeto), e que esta forma oxidada é importante para a atividade hemolítica.

Em resumo, os dados dos estudos de estabilidade demonstram que o armazenamento em - 80 ou - 196 °C; pH 7,4-8,0; concentração de NaCl 500 mM; 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10% de glicerol são efetivos em manter a atividade hemolítica do SpV. Foi observado que 65% da atividade hemolítica era mantida quando SpV era armazenado nestas condições durante 120 dias. Acreditamos que o estabelecimento dessas condições pode contribuir para caracterização, não só de SpV, como também da citolisina lábil Sp-CTx.

Como já descrito anteriormente, as citolisinas, são as moléculas mais estudadas de peçonhas de peixes. Além da atividade hemolítica estas são responsáveis pelos principais sintomas do envenenamento (cardiotóxicos e inflamatórios), sendo, portanto, consideradas como toxinas multifuncionais (Low et al., 1993; Poh et al., 1991; Figueiredo et al., 2009). Atividade hemolítica tem sido descrita para: SNTX (Khoo et al., 2002), neoVTX (Ueda

et al., 2006), patoxina e pvtoxina isoladas da peçonha dos peixes *Pterois antennata* e *P. volitans* (Kiriake e Shiomi, 2011). Assim como as citolisinas, a toxina citolítica Sp-CTx da peçonha de *S. plumieri*, apresenta atividade cardiovascular e hemolítica (Gomes et al., 2013, 2015 e Andrich et al., 2009).

Para avançar no estudo químico e farmacológico da peçonha do *S. plumieri* a Sp-CTx foi isolada utilizando procedimento já descrito na literatura (Gomes et al., 2013). Este processo consistiu em três etapas de fracionamento: uma precipitação salina sequenciada com sulfato de amônio e duas cromatografias de alta eficiência (interação hidrofóbica e troca aniônica). A atividade hemolítica da Sp-CTx foi 20 vezes maior ($EC_{50} = 50 \text{ ng/mL}$) que a da peçonha bruta ($EC_{50} = 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$) (fig. 9 e 3).

A homogeneidade do material obtido na última etapa (Sp-CTx) foi sugerida pela migração da amostra como uma única banda difusa com MW de aproximadamente 71 kDa em SDS-PAGE. E, de fato, em 2009 Andrich e colaboradores demonstraram que a Sp-CTx é uma glicoproteína dimérica cujos monômeros apresentam massa molecular aparente de 71 kDa.

Para verificar se as condições consideradas adequadas para armazenamento/manutenção da atividade hemolítica do SpV seriam eficazes na manutenção da atividade da Sp-CTx, amostras da toxina foram mantidas por 60 dias nas condições consideradas efetivas para o SpV. Os resultados comprovam que essas condições (NaCl 500 mM; 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10% de glicerol, pH 7,4), acrescidas de 60 mM de trealose, foram efetivas em manter a atividade hemolítica de Sp-CTx mesmo quando armazenada a 4 °C (40% de atividade mantida). Entretanto, somente o glicerol 10% foi suficiente na manutenção da atividade hemolítica da Sp-CTx quando armazenada a -80 e -196 °C durante 60 dias.

A atividade hemolítica de peçonhas de animais terrestres está geralmente associada a enzimas: fosfolipase A2, C e esfingomielinas (Bernheimer e Rudy, 1986). Com exceção da peçonha do *Scatophagus argus* (Ghafari et al., 2013), peçonhas de peixes são destituídas de fosfolipases e, portanto, sua atividade hemolítica envolve mecanismos não enzimáticos.

Em 2013, Gomes e colaboradores verificaram que a Sp-CTx é destituída de atividade fosfolipásica A2. E, usando uma abordagem baseada na premissa de que a lise celular por choque coloidosmótico pode ser prevenida pela presença de osmoprotetores, como por exemplo PEGs (polietilenoglicóis) de tamanhos apropriados, demonstraram que o efeito hemolítico da Sp-CTx é devido à formação de poros (Gomes et al., 2013). O osmoprotetor, devido ao seu tamanho, não penetra na célula, sendo capaz de contrabalancear a força osmótica gerada pelas moléculas impermeantes do meio intracelular, como a hemoglobina, prevenindo a lise celular (Menestrina et al., 1994). A capacidade formadora de poros também foi descrita para a SNTX (Chen et al., 1997), neoVTX (Ueda et al., 2006), TLY (Ouanounou et al., 2002) citotoxina do *Pseudomonas aeruginosa* (Weiner et al., 1985), α -toxina e a equinatoxin II do *Staphylococcus aureus* (Belmonte et al., 1993; Palmer et al., 1993).

Neste trabalho um estudo do mecanismo da formação de poros da Sp-CTx foi realizado através de ensaio de inibição competitiva utilizando lipídios de membrana: fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e colesterol. O fosfatidilglicerol, lipídio com carga líquida negativa (em pH fisiológico), foi capaz de inibir a hemólise, o que não ocorreu com fosfatidiletanolamina, um fosfolípido com carga líquida zero. Estes dados sugerem que resíduos de aminoácidos catiônicos da Sp-CTx desempenham um papel importante no mecanismo de formação de poros (mecanismo citolítico) através da interação eletrostática entre a toxina e lipídeos carregados negativamente na membrana dos eritrócitos. Podemos também inferir que a presença de cargas positivas na fosfatidiletanolamina previne a interação entre a Sp-CTx e este lipídio, o que foi constatado através da isenção de efeito protetor. Estes dados estão de acordo com os de Chen e colaboradores (1997) e Ueda e colaboradores (2006) que demonstraram que a hemólise induzida pelas citolisinas SNTX e neoVTX, das peçonhas dos peixes *Synanceia horrida* e *Synanceia verrucosa*, respectivamente, é inibida por lipídios de carga líquida negativa como a cardiolipina.

A presença de colesterol também inibe a atividade hemolítica de Sp-CTx, que demonstra o envolvimento deste lipídio no mecanismo da hemólise, o que está de acordo com o recentemente descrito para a SNTX, isolada da peçonha do peixe pedra (Ellisdson et al., 2015). Utilizando cristalografia de raios X, os autores propuseram uma estrutura tridimensional para a SNTX, confirmando sua natureza heterodimérica e inferiram que esta toxina é membro de uma superfamília de proteínas formadoras de poros. Uma pesquisa por similaridade estrutural revelou a presença de quatro domínios em cada membro do heterodímero, incluindo o domínio N-terminal denominado MACPF/CDC homólogo ao complexo perforina de ataque à membrana/citolisina dependente de colesterol. Através de microscopia eletrônica de transmissão, foram obtidas evidências diretas que a SNTX forma poros grandes de formato anelar em eritrócitos de coelho (Ellisdson et al., 2015).

Diante desses dados esses autores demonstraram que a formação de poros na membrana celular por estas toxinas é através do modelo “*barril*”. Nesse modelo, inicialmente há a formação de um estado denominado de pré poro onde a oligomerização é dirigida por complementaridade de cargas das superfícies das subunidades. A interação entre os domínios MACPF/CDC leva ao estiramento das hélices encontrado em outro domínio da toxina permitindo a formação de uma folha- β contínua que constitui o β -barril (Ellisdson et al., 2015).

Considerando a similaridade entre as sequências da SNTX e da Sp-CTx, (Gomes et al., 2013), de suas funções fiso-farmacológicas e também o efeito do colesterol sobre a hemólise, pode-se sugerir que a formação de poro induzida pela Sp-CTx ocorre pelo modelo de barril.

Além disso, os autores sugerem a possibilidade de que SNTX forma poros em células de uma variedade de tecidos, podendo esta propriedade estar associada com várias consequências fisiológicas do envenenamento, inclusive os relacionados a efeitos inflamatórios locais como a formação de edema (Ellisdson et al., 2015).

Considerando que a atividade de proteínas é influenciada por fatores extrínsecos, o efeito do pH e da presença de íons sobre a atividade hemolítica foi avaliada. Sabe-se que a variação do pH de uma proteína culmina em alterações no estado de ionização de resíduos de aminoácidos desta, o que reflete em sua atividade biológica. Como as cadeias laterais dos aminoácidos de proteínas podem interagir diretamente com seus ligantes, dando-lhes carga elétrica ou polarizando-os, estas mudanças podem levar a alterações da reatividade dos componentes envolvidos nestas atividades.

Como pode ser verificado na figura 12, a variação de pH teve influência direta sobre a atividade hemolítica de Sp-CTx no eritrócito de coelho. Foi apontado que em pH 8,6 a Sp-CTx apresentou atividade máxima, que foi reduzida de forma drástica em pH 10,4. Em pH ácido a Sp-CTx não induz a hemólise. A variação do pH culmina em alterações no estado de ionização de cadeias laterais de aminoácidos, que interfere tanto na estabilidade estrutural como na interação com seus ligantes.

Também demonstramos que a atividade hemolítica de Sp-CTx é: (i) potencializada na presença de íons cálcio, (ii) completamente inibida por íons zinco e EDTA; e (iii) inalterada na presença de íons magnésio. A inibição da atividade hemolítica por EDTA confirmou a importância do cálcio para a atividade dessa proteína.

De forma semelhante, as enzimas Leuc-B (Leucurolisina B – isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*), atroxlysin-I (atrolisina I - isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox*) e patagofibrase (isolada do veneno da serpente *Philodryas patogoniensis*) tiveram suas atividades proteolíticas potencializadas por cálcio, inalteradas por magnésio e inibidas por EDTA e zinco (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2010; Peichoto et al., 2007). Esses autores sugeriram que: (i) o cálcio confere estabilização estrutural e por isso potencializa a atividade dessas enzimas; (ii) o zinco se liga a sítios alostéricos das enzimas, o que resulta em uma alteração de conformação que inibe a atividade enzimática. Considerando o papel destes íons em

outras proteínas pode-se sugerir que a presença destes acarretam alteração na conformação e/ou estabilização da Sp-CTx, que refletem na sua atividade.

Como relatado por Andrich e colaboradores (2010), a Sp-CTx é uma citolisina de natureza glicoproteica. A glicosilação é uma modificação pós traducionais aonde a parte glicídica pode estar envolvida numa série de processos biológicos, tais como o reconhecimento célula-célula, adesão celular, enovelamento de proteína e resposta imunitária do hospedeiro. Portanto, a glicosilação é, sem dúvida, uma das modificações pós-traducionais mais importantes. Além desses papéis funcionais, esses resíduos apresentam papéis estruturais, influenciam na estabilidade das proteínas e fornecem informações sobre o direcionamento de proteínas recentemente sintetizadas. Para algumas proteínas de veneno de aranhas, a glicosilação é indispensável para que a proteína tenha atividade e que o veneno possa assim exercer sua função biológica (Veiga et al., 1999).

A análise de carboidratos realizada com o kit “Dig glycan differentiation”, confirmou a natureza glicoproteica da Sp-CTx descrita por Andrich (2010), e também sugeriu a presença de motivos ácido siálico terminal α (2-3) Galactose em complexos de N-glicanos e O-glicanos e Galactose β (1-4) N-acetilglucosamina em híbridos e complexos de N-glicanos e O-glicanos, e N-acetilglucosamina em O-glicanos. Entretanto, o envolvimento da parte glicídica da Sp-CTx nas suas atividades biológicas ainda precisa ser avaliado.

Uma resposta inflamatória caracterizada por dor intensa e edema é um dos efeitos locais e sistêmicos mais pronunciados do envenenamento humano por peixes. Junqueira e colaboradores (2007) e Sivan e colaboradores (2007), descreveram a resposta inflamatória da peçonha do peixe bagre (*Cathorops spixii*) e do peixe *scat* pintado (*Scatophagus argus*), respectivamente. Em 2012, Menezes e colaboradores descreveram a resposta inflamatória eliciada pela peçonha de *S. plumieri* e demonstraram o envolvimento do sistema calicreína-cinina nesta resposta, assim como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) e quimiocinas (MCP-1) e

um recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e células mononucleares).

Como discutido por Menezes (2012) e Ellisdson e colaboradores (2015), especula-se que a atividade citolítica das toxinas hemolíticas poderia ser responsável também pelas respostas inflamatórias induzidas pelas peçonhas de peixes. Alguns estudos já demonstram o envolvimento dessas citolisinas com a inflamação, como por exemplo a stonustoxin do peixe *Synanceja horrida* (Poh et al., 1991) e a trachynilysin do peixe *Synanceja trachynis* (Colasante et al., 1996). Levando em consideração a similaridade estrutural (Campos et al., 2016) e funcional já descritas entre a Sp-CTx e estas citolisinas, nos propusemos a avaliar se a Sp-CTx também induziria resposta inflamatória local.

Semelhante ao observado por Menezes e colaboradores (2012) para o SpV, quando utilizamos o teste da pata de camundongo demonstramos que a injeção de Sp-CTx (doses 0,1; 0,5 e 1,0 µg) induz edema local intenso e persistente, além de um comportamento característico de nocicepção. Estas respostas sugerem que a toxina Sp-CTx é – ao menos em parte – responsável pela dor e edema causados pelo envenenamento com *S. plumieri*.

Considerando que Menezes e colaboradores (2012) sugeriram que a gênese do edema induzido pelo SpV está relacionada com o sistema calicreína-kinina (KKS, Kallikrein-Kinin System), avaliou-se a resposta inflamatória da Sp-CTx quando o animal era previamente tratado com aprotinina, um inibidor de serino proteases de amplo espectro, e com icatibanto (HOE-140), um antagonista peptídico do receptor B2 de bradicinina. Estes anti-inflamatórios, nas condições experimentais utilizadas, foram capazes de reduzir significativamente o edema gerado pela aplicação de Sp-CTx. Estes dados sugerem que esta toxina é responsável pela resposta inflamatória do veneno bruto que envolve o KKS.

Em geral, a transmissão de dor, a manutenção do estado inflamatório, como também os processos de controle da pressão arterial envolvem o sistema

calicreína-cinina, que se dá principalmente pela produção de bradicinina e consequente ativação de receptores B1 e B2, envolvidos na fase crônica e aguda da inflamação, respectivamente (Bhoola et al., 1992).

O envolvimento desse sistema já foi relatado em estudos com a peçonha da serpente *Bothrops lanceolatus* (Guimarães et al., 2001) e do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* (Bohrer et al., 2007). Semelhante aos nossos resultados, a resposta edematogênica do veneno de *Lonomia obliqua* foi reduzida em aproximadamente 50% quando os animais foram tratados tanto com a aprotinina quanto com o HOE-140 (Bohrer et al., 2007).

Considerando nossos resultados juntamente com a literatura (Andrich et al., 2010; Menezes et al., 2012), e que a Sp-CTx é destituída de atividade calicreína-like, podemos sugerir que esta toxina pode ativar direta ou indiretamente a calicreína plasmática/tecidual, levando a um aumento da liberação de bradicinina e consequente ativação do receptor B2. Este processo acarreta vasodilatação e um aumento da permeabilidade vascular induzindo a formação de edema, o que justifica a inibição da formação do edema pela aprotinina, que inibe a calicreína plasmática, e pelo HOE-140, que bloqueia o receptor B2. Entretanto, estas drogas não bloquearam totalmente o efeito inflamatório. Estudos adicionais alterando as condições experimentais são necessários para verificar se estas substâncias podem bloquear totalmente este efeito ou se, além do envolvimento do KKS, outra via de indução de inflamação pode estar envolvida no efeito induzido pela Sp-CTx.

É importante destacar que a compreensão do quadro inflamatório observado durante o envenenamento causado pelo peixe-escorpião pode servir de base para futuras estratégias terapêuticas a fim de minimizar os efeitos inflamatórios do envenenamento.

Este trabalho gerou dados sobre a toxina citolítica – Sp-CTx – da peçonha do peixe escorpião brasileiro *Scorpaena plumieri*, que excedem as investigações prévias descritas na literatura para outras citolisinas de peixe. Acreditamos que o sucesso na busca pela manutenção da estabilidade da Sp-CTx nos

permite vislumbrar avanços no que diz respeito à caracterização farmacológica plena dessa toxina, podendo levar ao desenvolvimento de terapias imuno-farmacológicas, o que apresenta óbvia relevância socioeconômica.

6 Considerações Finais e Conclusão

Este trabalho contribuiu para a caracterização bioquímica e farmacológica da Sp-CTx.

- Estabeleceu-se condições efetivas para manutenção da atividade da Sp-CTx:
 - ✓ 500 mM de NaCl, 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 60 mM de trealose e 10% de glicerol, pH 7,4 a 4 °C
 - ✓ 10% de glicerol a -80 e -196 °C
- Sp-CTx apresenta os motivos: ácido siálico terminal $\alpha(2-3)$ Galactose em complexos de N-glicanos e/ou O-glicanos e Galactose $\beta(1-4)$ N-acetilglucosamina em híbridos e/ou complexos de N-glicanos e O-glicanos, e/ou N-acetilglucosamina em O-glicanos.
- A hemólise é bloqueada por colesterol e fosfatidilglicerol, sugerindo mecanismo envolvendo interação lipídio-toxina, e depende de íons cálcio
- Sp-CTx é responsável, ao menos em parte, pela atividade inflamatória induzida pela peçonha
- A gênese da resposta inflamatória de Sp-CTx envolve o sistema calicreína-cinina.

7 Referências bibliográficas

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.*, v. 265, p. 861-867, 1990.

ALOUF, J.E. Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol.* v. 290, p. 351-356, 2000.

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.T., CASSOLI, J.S., LAUTNER, R.Q. SANTOS, R.A.S., PIMENTA, A.M.C, DE LIMA, M.E., FIGUEIREDO, S.G. A potent vasoactive cytolysin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon*, v.56, p. 487-496, 2010.

BATISTA, U.; SENTJURC, M. EPR study of the sea anemone cytolysin, equinatoxin II, cytotoxicity on V-79 cells. *Cell. Biol. Int.* v. 19, p. 215-222, 1995.

BASTOLLA, U.; DEMETRIUS, L. Stability constraints and protein evolution: the role of chain length, composition and disulfide bonds. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 18, p. 405-415, 2005.

BELMONTE, G.; PEDERZOLLI, C.; MACEK, P.; MENESTRINA, G. Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *Journal of Membrane Biology*, v.131, p. 11-22, 1993.

BERNHEIMER, A.W.; WEINSTEIN, S.A.; LINDER, R. Isoelectric analysis of some Australian elapid snake venoms with special reference to phospholipase B and hemolysis. *Toxicon*, v. 24, 841-849, 1986.

BERNHEIMER, A.W.; RUDY, B. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 864, p. 123–141, 1986.

BERNHEIMER, A.W.; LINDER, R.; WEINSTEIN, S.A.; KIM, K.S. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. *Toxicon*, v. 25, p. 547-554, 1987.

BHATNAGAR, B.S.; BOGNER, R.H.; PIKAL, M.J. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol.*, v. 12, p. 505-23, 2007.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* v. 44, p. 1-80, 1992.

BOHRER, C.B.; RECK JUNIOR, J.; FERNANDES, D.; SORDI, R.; GUIMARÃES, J.A.; ASSREUY, J.; TERMIGNONI, C. Kallikrein-kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: involvement in edema and hypotension responses to envenomation. *Toxicon* v. 49, p. 663-9, 2007

BOLHUIS, A.; KWAN, D.; THOMAS, J.R. The Effects of Salt on Non-Halophilic Proteins. In: SIDDIQUI, K.S.; THOMAS, T. Protein Adaptation in Extremophiles (Molecular Anatomy and Physiology of Proteins), Nova Science Publishers, v. 250, 2008.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol.*, v. 69, p. 2415-2422, 2003.

CAMPOS, F.V.; MENEZES, T.N.; MALACARNE, P.F.; COSTA, F.L.; NAUMANN, G.B.; GOMES, H.L.; FIGUEIREDO, S.G. A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* v. 22, 2016.

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*, v. 45, p. 843-850, 2005.

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

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

CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, v. 40, p. 1083-1093, 2002.

COLASANTE, C.; MEUNIER, F.A.; KREGEER, 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 (*Synansea trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.*, v. 8, p. 2149-2156, 1996.

DOS SANTOS, D.M.; Síntese e caracterização do peptídeo antimicrobiano LyeTx I do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DUHIG, J.V.; JONES, G. Haemotoxin of the venom of *Synanceja horrida*. *Aust. J. E. B. med. Sci.*, v. 5, p. 173-179, 1928.

DUTCHER, J.D. Curare Alkaloids from *Chondodendron tomentosum* Ruiz and Pavon. *J Am Chem Soc*, v. 68, p. 419-424, 1946.

ELLISDON, A.M.; REBOUL, C.F.; PANJIKAR, S.; HUYNH, K.; OELLIG, C.A.; WINTER, K.L.; DUNSTONE, M.A.; HODGSON, W.C.; SEYMOUR, J.; DEARDEN, P.K.; TWETEN, R.K.; WHISSTOCK, J.C.; MCGOWAN, S. Stonefish toxin defines an ancient branch of the perforin-like superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 112, p. 15360-5, 2015.

FIGUEIREDO, S.G.; LIMA-PEREZ GARCIA, M.E.; VALENTIM, A.C.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. Purification and amino

acid sequence of the insecticidal neurotoxin TX4(6-1) from the venom of the Farmed_spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, v. 33, p. 83-93, 1995.

FIGUEIREDO, S.G.; PEREZ-GARCIA, M.E.L.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; PATTEN, D.; HALLIWELL, R.F.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones. *Toxicon*, v. 39, p. 309-317, 2001.

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.

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*, v. 33, p. 143-155, 1995.

GHAFFARI, 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*, v. 66, p. 82-87, 2013.

GOLOVANOV, A.P.; HAUTBERGUE, G.M.; WILSON, S.A.; LIAN, L.Y. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J Am Chem Soc.*, v. 126, p. 8933-8939, 2004.

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

GOMES, H. L.; MENEZES, T. N.; CARNIELLI, J.B.T.; ANDRICH F.; EVANGELISTA K.E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; VASSALLO, V.;

FIGUEIREDO, S.G. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom, *Toxicon*, in press, 2011.

GOMES, H.L.; DAVI JR. D.F.; ANDRICH, A.; DE MEDEIROS, E.F.; CRUZ, J.; GONDIM, A.N.S.; VASSALO, D.V.; FIGUEIREDO, S.G. Cardiovascular and Hemolytic Effects of Sp-CTX a Cytolysin Isolated from the Scorpionfish, *Scorpaena plumieri*. *Toxicon*, v. 60, p. 149-150, 2012.

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 cytolysin from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: Evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. *Toxicon*, v. 74, p. 92- 100, 2013.

GOMES, H.L.; MENEZES, T.N.; MALACARNE, P.F.; ROMAN-CAMPOS, D.; GONDIM, A.N.; CRUZ, J.S.; VASSALLO, D.V.; FIGUEIREDO, S.G. Cardiovascular effects of Sp-CTX, a cytolysin from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon*. v. 118, p. 141-8, 2016.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*, v. 50, p. 120-134, 2007.

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

GUIMARÃES, A.Q.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FERREIRA DE ARAÚJO, P.M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm Res*. v. 53, p. 284-91, 2004.

HABERMANN, E.; AHNERT-HILGER, G.; CHHATWAL, G.S.; BERESS, L.; Delayed haemolytic action of Palytoxin. *BiochimBiophysActa.*, v. 649. p. 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 scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, v. 42, p. 79-83, 2003.

HADDAD Jr, V.; NETO, D.G.; DE PAULA NETO, J.B.; DE LUNA MARQUES, F.P.; BÁRBARO, K.C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*. v.43, 287-294, 2004.

HARVEY, A L. Cytolytic toxins. In: Handbook of Toxinology, (SHIER, W.T. and MESS, D., Eds). New York: Marcel Dekker. p. 1-66, 1990.

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

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

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* v. 14, p. 1-63, 1959.

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

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

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

KIZER, K.W.; MCKINNEY, H.E.; AUERBACH, P.S. Scorpaenidae envenomation. A five-year poison center experience. *JAMA*. v. 8, 807-10, 1985.

KRAMER, R.M.; SHENDE, V.R.; MOTL, N.; PACE, C.N.; SCHOLTZ, J.M. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys J*. v. 102, p. 1907-15, 2012.

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

LEIPOLD, E.; HANSEL, A.; OLIVERA, B.M.; TERLAU, H.; HEINEMANN, S.H. Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett.*, v. 579, p. 3881-3884, 2005.

LIMA, C.; CLISSA, P. B.; PIRAN-SOARES, A.A.; TANJONI, I.; MOURA DA SILVA, A. M.; LOPES FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophry nenattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*, v.42, p. 499-507. 2003.

LIN, T.Y.; TIMASHEFF, S.N. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.*, v. 5, p. 372–381, 1996.

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*, v.31, p. 1471-1478, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.I.; FAAR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265–275, 1951.

MENESTRINA, G.; MOSER, C.; PELLET, S.; WELCH, R. Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology*, v. 87, p. 249- 267, 1994.

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*. v. 60, p. 4-11, 2012.

MOELBERT, S.; NORMAND, B.; DE LOS RIOS, P. Kosmotropes and chaotropes: modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophys Chem* v. 112, p. 45-57, 2004.

NELSON, J.S. *Fishes of the World*. 4^a ed. New York: Wiley, 2006.

NITA, M.; RADUCAN, A.; PUIU, M.; OANCEA, D. Stabilization of catalase in the presence of additives. *Analele Universitii din Bucureúti – Chimie*, Anul XVI (serie nou), vol. 2, p. 39 – 44, 2007.

NUNES, K.P.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.N.; DINIZ, S.O.; CARDOSO, V.N.; TOSTES, R.; DE LIMA, M.E.; WEBB, R.C.; LEITE, R. Nitric oxide-induced vasorelaxation in response to PnTx2-6 toxin from *Phoneutria nigriventer* spider in rat cavernosal tissue. *J Sex Med*, v. 7, p. 3879-3888, 2010.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p.137–149, 2003.

OUANOUNOU, G.; MALO, M.; STINNAKRE, J.; KREGER, A.S.; MOLGO, J. Trachynilysin, a neurosecretory protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, forms nonselective pores in the membrane of NG108-15 cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 42, p. 39119-39127, 2002.

PATEL, S.M.; JAMEEL, F.; PIKAL, M.J. The effect of dryer load on freeze drying process design. *J Pharm Sci.*, v. 99, p. 4363-4379, 2010.

PALMER, M.; WELLER, U.; MEÛNER, M.; BHAKDI, S. Recovery of human fibroblasts from attack by the pore-forming alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 11963-11967, 1993.

PEICHOTO, M.E.; TEIBLES, P.; MACKESSY, S.P.; LEICA, L.; ACOSTA, O.; GONÇALVES, L.R.C; TANAKA-AZEVEDO, A.M.; SANTORO, M.L. Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing α -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1770, p. 810-819, 2007.

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

PUKALA, T.L; DOYLE, J.R.; LLEWELLYN, L.E.; KUHN-NENTWIG, L.; APPONYI, M.A.; SEPAROVIC, F.; BOWIE, J.H. Cupiennin 1a, an antimicrobial peptide from the venom of the neotropical wandering spider *Cupiennius salei*, also inhibits the formation of nitric oxide by neuronal nitric oxide synthase. *FEBS J.*, v. 274, p. 1778-1784, 2007.

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

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

RUSSEL, F.E.; BRODIE A.F. Toxicology: Venomous and Poisonous Marine Animals. In: MARISCAL, R.N. Experimental Marine Biology, Elsevier, p. 269-301, 2012.

SANCHEZ, E.F.; GABRIEL, L.M.; GONTIJO, S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 468, p. 193-204, 2007.

SANCHEZ, E. F.; SCHNEIDER, F. S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M. A.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G.; EVANGELISTA, K. S.; EBLE, J. A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jérgon) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 496, p. 9-20, 2010.

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

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

SCHWARZ G., ZONG R.T.; POPESCU, T. Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta.* v. 1110, p. 97-104, 1992.

SHAW, K.L.; GRIMSLEY, G.R.; YAKOVLEV, G.I.; MAKAROV, A.A.; PACE, C.N. The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Sci.* v. 10(6), p. 1206-15, 2001.

SHIKAMA, K.; YAMAZAKI, I. Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature*, v. 190, p. 83–84, 1961.

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.*, v. 103, p. 285-289, 1989.

SHIVAJI, P.G. Therapeutic alternatives from venoms and toxins. *Indian J Pharmacol.* V. 39(6), 260-4, 2007.

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

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

SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. Venom Evolution Widespread in Fishes: A Phylogenetic Road Map for the Bioprospecting of Piscine Venoms. *Journal of Heredit.* v. 97, p. 206-217, 2006.

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.*,v. 1760, p. 1713-1722, 2006.

UTKIN, Y.N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J Biol Chem.* V. 6 (2), p. 28-33, 2015.

VAGENENDE, V.; YAP, M.G.; TROUT, B.L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry.*, v. 48, p. 11084-11096, 2009.

VEIGA, S.S.; GREMSKI W.; SANTOS, V.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*, v.37, p. 587-607, 1999.

WEINER, R.N.; SCHNEIDER, E.; HAEST, C.W.M.; DEUTICKE, B.; BENZ, R.; FRIMMER, M. Properties of the leak permeability induced by a cytotoxic protein from *Pseudomonas aeruginosa* (PACT) in rat erythrocytes and black lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 820, p. 173-182, 1985.

WU, H. Studies on denaturation of proteins XIII. A theory of denaturation. *Chin J Physiol*. v. 5, p. 321-344, 1931.

XIANG, Y.; YAN, C.; GUO, X.; ZHOU, K.; LI, S.; GAO, Q.; WANG, X.; ZHAO, F.; LIU, J.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Host-derived, pore-forming toxin-like protein and trefoil factor complex protects the host against microbial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*., v. 111, p. 6702-7, 2014.

YANG, A.S.; HONIG, B. On the pH dependence of protein stability. *J Mol Biol*., v. 231, p. 459-474, 1993.

YONAMINE C.M.; TRONCONE L.R.P.; CAMILLO, M.A.P. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon* v. 44, p. 169-172, 2004.

ZHANG, Y.; CREMER, P.S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol* v. 10, p. 658-63, 2006.

ZIEGMAN, R.; ALEWOOD, P. Bioactive Components in Fish Venoms. *Toxins* v. 7, p. 1497-1531, 2015.