

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR DA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (SBBq)

HUMBERTO DE ARAÚJO TENÓRIO

ATIVIDADE CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DO MUCO EPIDÉRMICO E PEÇONHA DO
PEIXE-ESCORPIÃO *SCORPAENA PLUMIERI*

Maceió

2018

HUMBERTO DE ARAÚJO TENÓRIO

ATIVIDADE CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DO MUCO EPIDÉRMICO E PEÇONHA DO
PEIXE-ESCORPIÃO *SCORPAENA PLUMIERI*

Tese requerida para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós
Graduação em Bioquímica e Biologia
Molecular, da Sociedade Brasileira de
Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira
Pereira (UFAL)

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria
Elena de Lima Perez Garcia (UFMG)

MACEIÓ

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB: 1664

T289a Tenório, Humberto de Araújo.

Atividade conversora de angiotensina do muco epidérmico e peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri* / Humberto de Araújo Tenório. – 2018. 70f. : il. Color.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.

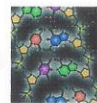
Coorientadora: Maria Elena de Lima Perez.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 74-98.

1. Enzima conversora de angiotensina. 2. Sistema renina angiotensina. 3. Muco epidérmico. 4. Peixes peçonhentos. 5. *Scorpaena plumieri*. I. Título.

CDU: 577.1



Ata de Defesa de Tese

Ao décimo oitavo dia do mês de abril de 2018, às **quatorze horas**, reuniu-se na sala 214 da ESENFAR/UFAL, a banca examinadora composta pelos docentes Hugo Juarez Vieira Pereira, Melissa Fontes Landell, Sônia Salgueiro Machado, Francis Soares Gomes e Edma Carvalho de Miranda para a **Defesa de Tese** intitulada: "**ATIVIDADE CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DO MUCO EPIDÉRMICO E PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri***" elaborada pelo Doutorando **Humberto de Araújo Tenório**, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira. Após a apresentação por 50 minutos, o doutorando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 14:00 horas, os examinadores consideraram a Tese () **APROVADA** ou () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo-se o seguinte parecer: _____

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 17:00 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, servidor, lavrei a presente ata que será assinada pela banca examinadora e pelo doutorando. **Maceió, 18 de abril de 2018.**

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
Examinador interno: Prof. Dra. Francis Soares Gomes
Examinador interno: Prof. Dr. Melissa Fontes Landell
Examinador externo: Prof. Dra. Edma Carvalho de Miranda
Examinador externo: Prof. Dra. Daniel de Brito Ricarte
Doutorando: Humberto de A. Tenório

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, responsáveis pela minha educação e por ter me dado toda a base para o que sou hoje.

Agradeço ao Professor Hugo Juarez Vieira Pereira pelo compromisso da orientação e parceria.

Agradeço a todos os amigos, colegas de laboratório, que também tem participação na elaboração desse trabalho, com destaque para Ricardo Costa, responsável pela obtenção do animal estudado.

Agradeço a todos os professores que colaboraram para a realização deste trabalho. Professora Janaína Bortoluzzi, Professor Mário Meneghetti, Professora Simoni Meneghetti, Professora Marília Goulart, Professor Euzébio Goulart, Professora Sônia Salgueiro, Professora Edma Miranda, Professor Francis Soares, Professor Luciano Meireles, Professor Josué Carinhanha, Professora Ana Catarina Rezende, e Professor Ticiano Nascimento.

Agradeço a todos, pais, professores, amigos, colegas de trabalho, pelo apoio e compreensão.

Agradeço à CAPES pelo fomento a esse trabalho, e à Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade, com a criação do programa de pós-graduação.

RESUMO

As peçonhas de animais terrestres são muito mais estudadas que as de animais marinhos, por fatores com o mais fácil acesso e a menor labilidade de seus compostos ativos. Sendo assim, apenas uma pequena parte do que se conhece sobre peçonhas é de origem marinha.

O *Scorpaena plumieri* é um peixe peçonhento, típico de águas tropicais do Oceano Atlântico, que habita corais e águas rasas em praias rochosas, conhecido da região como nordeste do Brasil como peixe-escorpião, niquim-de-pedra, mamangava ou beatriz, é um peixe que possui um aparato inoculador não muito bem definido, composto de glândulas que se estendem pela região ântero-lateral de espículos presentes nas nadadeiras dorsais, pélvicas e anais. Em sua peçonha, já foram isoladas diversas substâncias com atividade biológica, com atividades semelhantes a de outros peixes da família Scorpionidae. Essa peçonha possui atividade hemolítica, citotóxica, inflamatória, cardiovascular e proteolítica, além de inibidora da ligação de integrinas.

O corpo do peixe também é abundantemente recoberto por um muco espesso. Testando esses fluidos corporais, encontramos neles a capacidade de processar angiotensinas. A peçonha do peixe escorpião *S. plumieri* foi capaz de converter a angiotensina I (Ang I) em angiotensina II e também em angiotensina 1-7 (Ang(1-7)), e capaz de converter a angiotensina II (Ang II) em Ang(1-7). O muco epidérmico foi capaz de converter a Ang I em Ang II e Ang(1-7), mas não apresentou atividade frente à Ang II. O inibidor de enzima conversora de angiotensina captopril foi capaz de inibir a atividade conversora em ambos os fluidos biológicos, assim como também o quelante de metais EDTA. Já o inibidor de serino-proteases PMSF não foi capaz de inibir a atividade. O captopril também não foi capaz de impedir a formação de Ang (1-7) a partir de Ang I no muco epidérmico, mostrando que deve haver uma enzima que promova diretamente a conversão de Ang I em Ang (1-7), sem a necessidade de conversão prévia em Ang II.

A atividade de maior interesse, a conversora de angiotensina (ECA), foi isolada em dois passos cromatográficos sequenciais, a saber; gel filtração em S-100 e troca iônica com Mono Q. A ECA isolada se comportou de mesma maneira frente aos inibidores e ao substrato, Ang I, exceto pela capacidade de gerar Ang (1-7).

Peçonhas animais são misturas complexas de moléculas com atividade biológica, e seu estudo tanto pode ser visto como uma maneira de compreender melhor os efeitos do empeçonhamento e abrir possibilidades para melhores métodos de tratamento quanto para a descoberta de atividades que possam ter utilidade farmacológica, ou ajudem a esclarecer uma via metabólica.

Palavras chave: enzima conversora de angiotensina, ECA, sistema renina angiotensina, peçonhas, muco epidérmico, peixes peçonhentos, *Scorpaena plumieri*.

ABSTRACT

The venom of terrestrial animals is much more studied than that of marine animals, for factors such as the easiest access and the lowest lability of its active compounds. Thus, only a small part of what is known about venom is of marine origin.

The *Scorpaena plumieri* is a venomous fish, typical of tropical Waters of Atlantic Ocean, which inhabits corals and shallow waters on rocky beaches, known in the northeast region of Brazil as scorpion fish, niquim-de-pedra, mamangava or beatriz, is a fish that has an inoculating apparatus not very well defined, composed of glands that extend through the anterolateral region of spicules present in the dorsal pelvic and anal fins. In its venom, several substances with biological activity have already been isolated, with activities similar to other fish of the family Scorpionidae. This venom has hemolytic, cytotoxic, inflammatory, cardiovascular and proteolytic activity, as well as integrin binding inhibitor.

The fish's body is also abundantly covered by thick mucus. By testing these bodily fluids, we find in them the ability to process angiotensins. The venom of the *S. plumieri* scorpion fish was able to convert angiotensin I (Ang I) to angiotensin II and also to angiotensin I-7 (Ang (1-7)), and capable of converting angiotensin II (Ang II) into Ang (1-7). Epidermal mucus was able to convert Ang I into Ang II and Ang (1-7), but did not show activity against Ang II. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril was able to inhibit the conversion activity in both biological fluids, as well as the metal chelator EDTA. As for the serine protease inhibitor PMSF, it was not able to inhibit venom activity. Captopril was also not able to prevent the formation of Ang (1-7) from Ang I in the epidermal mucus, showing that there must be an enzyme that directly promotes the conversion of Ang I to Ang (1-7), without the need for prior conversion in Ang II.

The most interesting activity, the angiotensin converting enzyme (ACE), was isolated in two sequential chromatographic steps, namely; gel filtration in S-100 and ion exchange with Mono Q. Isolated ACE behaved in the same way against inhibitors and substrate, Ang I, except for the ability to generate Ang (1-7).

Animal venoms are complex mixtures of molecules with biological activity, and their study can both be seen as a way to better understand the effects of envenomation and open up possibilities for better treatment methods as well as for the discovery of activities that may have pharmacological utility, or help to understand a metabolic pathway.

Key words: angiotensin converting enzyme, ACE, renin angiotensin system, venoms, epidermic mucus, poisonous fishes, *Scorpaena plumieri*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: O <i>Scorpaena plumieri</i> | página 14 |
| Figura 2: Aspectos morfológicos do <i>S. plumieri</i> | página 15 |
| Figura 3: Mapa de distribuição gerado por computador para o <i>Scorpaena plumieri</i> | página 16 |
| Figura 4: Glomérulo e estruturas justaglomerulares..... | página 21 |
| Figura 5: Vias bioquímicas para formação de Ang (1-7)..... | página 24 |
| Figura 6: Processamento de Ang I, Ang II, Ang (1-9) e Ang (1-12) por carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos..... | página 27 |
| Figura 7: SDS-PAGE de peçonha e muco epidérmico do <i>S. plumieri</i> | página 40 |
| Figura 8: Conversão de Ang I em Ang II por peçonha de <i>S. plumieri</i> | página 42 |
| Figura 9: Conversão de Ang I em Ang II por muco epidérmico de <i>S. plumieri</i> | página 43 |
| Figura 10: Inibição Ang I em Ang II pela peçonha por captopril..... | página 43 |
| Figura 11: Inibição da conversão de Ang I em Ang II pela peçonha por EDTA.... | página 43 |
| Figura 12: Inibição da conversão de Ang I em Ang II pelo muco por captopril...página 44 | |
| Figura 13: Inibição da conversão de Ang I em Ang II pelo muco por EDTA..... | página 44 |
| Figura 14: Formação de Ang (1-7) a partir de Ang II pela peçonha..... | página 44 |
| Figura 15: Ausência de atividade do muco sobre Ang II..... | página 45 |
| Figura 16: Não inibição pelo captopril Ang II para Ang (1-7) pela peçonha..... | página 45 |
| Figura 17: Inibição pelo EDTA Ang II para Ang (1-7) pela peçonha..... | página 45 |
| Figura 18: Filtração em gel do muco..... | página 46 |
| Figura 19: Troca aniônica de alta resolução da fração 14 gel filtração..... | página 47 |
| Figura 20: Conversão de Ang I em Ang II pela fração 16 Mono Q..... | página 47 |
| Figura 21: Bloqueio por captopril Ang I em Ang II pela fração 16 Mono Q..... | página 48 |
| Figura 22: Bloqueio por EDTA Ang I em Ang II pela fração 16 Mono Q..... | página 49 |
| Figura 23: Ausência de bloqueio por PMSF Ang I em Ang II pela fração 16 Mono Q..... | página 49 |
| Figura 24: SDS-PAGE das frações cromatográficas obtidas durante a purificação da ECA do muco epidérmico do <i>Scorpaena plumieri</i> | página 50 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------|---------------------------------------|
| AP | Aminopectidase |
| ASB | Albumina sérica bovina |
| AT | Receptor de angiotensina |
| BK | Bradicinina |
| BPP | Peptídeo potenciador da bradicinina |
| COX | Ciclooxigenase |
| CP | Carboxipeptidase |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| MKHS | Solução de Krebs-Hanseleit modificada |
| NEP | Neprilisina |
| NO | Óxido nítrico |
| POP | Proil oligopeptidase |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SRA | Sistema renina-angiotensina |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina |
| TOP | Timeth oligopeptidase |

Sumário

| | |
|---|------------------|
| 1. Introdução..... | página 9 |
| 2. Revisão de literatura..... | página 14 |
| 2.1.1. O <i>Scorpaena plumieri</i> | página 14 |
| 2.2. O empeçonhamento por <i>Scorpaena plumieri</i> | página 17 |
| 2.3. Proteínas bioativas isoladas de SpV..... | página 19 |
| 2.4. O sistema renina-angiotensina..... | página 20 |
| 2.4.1. Vias bioquímicas..... | página 20 |
| 2.4.2. Sistema renina-angiotensina e câncer..... | página 27 |
| 2.4.3. Sistema renina-angiotensina, memória e cognição..... | página 29 |
| 2.4.4. Enzimas conversoras de angiotensinas em peçonhas animais..... | página 33 |
| 3. Objetivos..... | página 36 |
| 3.1. Gerais..... | página 36 |
| 3.2. Específicos..... | página 36 |
| 4. Material e métodos..... | página 37 |
| 4.1. Extração da peçonha e do muco epidérmico..... | página 37 |
| 4.2. Ensaio de Bradford para quantificação de proteínas..... | página 37 |
| 4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | página 37 |
| 4.4. Ensaio de atividade enzimática..... | página 38 |
| 4.5. Purificação da enzima conversora de angiotensina do muco epidérmico do <i>Scorpaena plumieri</i> | página 38 |
| 5. Resultados e discussão..... | página 40 |
| 5.1. Perfil de proteínas da peçonha e muco epidérmico de <i>S. plumieri</i> em SDS-PAGE..... | página 40 |
| 5.2. Purificação de proteínas e identificação das atividades vaso-peptidásicas de peçonha, muco epidérmico de <i>S. plumieri</i> e de suas frações cromatográficas..... | página 40 |
| 6. Conclusão..... | página 51 |
| Referências..... | página 52 |

1. Introdução

Peçonhas e venenos de origem animal apresentam uma grande variedade de composições e efeitos fisiológicos, e possuem importância tanto pelos danos que podem causar a seres humanos e animais domésticos quanto à sua relevância como fonte de compostos biotecnologicamente úteis. São misturas complexas, normalmente de elevado conteúdo proteico. Um exemplo clássico que podemos fornecer no Brasil é a descoberta da bradiginina, um peptídeo com ação vasodilatadora, por Rocha e Silva em 1949, descrita como um fator liberado do plasma sanguíneo sobre a ação da peçonha de serpentes e de enzimas como a tripsina (Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld, 1949).

As peçonhas mais estudadas são as de animais terrestres, devido à sua maior implicação na saúde (acidentes mais frequentes, pelo habitat dos seres humanos ser terrestre) e também pela maior facilidade de acesso às mesmas. As peçonhas animais mais estudadas são as de serpentes, escorpiões e aranhas, e entre os animais marinhos, as mais estudadas são as de águas-vivas, anêmonas e caracóis (Utkin, 2015). Há de se ressaltar a diferença entre peçonha e veneno. Define-se por veneno ou peçonha qualquer substância capaz matar seres vivos ou torná-los doentes, ou seja, causar injúria ao organismo. No entanto, as peçonhas são venenos que podem ser injetados em outro ser vivo através de aparatos especializados, como dentes modificados, ferrões, agulhões e espículos, e que possuem estruturas glandulares específicas para sua produção. (Hadley, Debbie. 2017).

Entre as peçonhas animais, as de animais aquáticos são as menos estudadas, principalmente as de animais marinhos (Church e Hodgson, 2002). Várias dessas propriedades já foram pesquisadas e identificadas. Entre elas, está a peçonha do *Scorpaena plumieri*. A composição das peçonhas de peixes parece ser, de fato, muito semelhante entre si, pela verificação de seus efeitos fisiológicos em vários estudos. Um exemplo disso é a verificação de que o antídoto para a peçonha de peixes do gênero *Synanceja*, produzido pela empresa de biotecnologia CSL, em Melbourne, na Austrália, se apresenta também eficiente em inibir o efeito inflamatório e cardiovascular induzido pela peçonha do *S. plumieri*, quando esta é injetada em camundongos (Gomes et al., 2011). O efeito cardiovascular da peçonha de *S. plumieri* é atribuído a uma toxina de 65

kDa chamada Sp-CTx (*Scorpaena plumieri* cyotoxin) (Andrich et al., 2010). Em ratos, Sp-CTx produz uma resposta bifásica, que consiste em um aumento inicial da pressão sistólica e diastólica, seguido por um declínio sustentado dessas mesmas pressões e da frequência cardíaca (Gomes et al., 2016).

A peçonha do *S. plumieri*, a qual nos referiremos aqui como SpV, também apresentou diversas outras atividades, como hemólise, atividade inflamatória, inibitória da ligação de integrinas e proteolíticas (Carrijo et al., 2005; Menezes et al., 2012; Andrich et al., 2010; Evangelista et al., 2009; Gomes et al., 2011). Em relação aos efeitos proteolíticos, a peçonha mostrou-se capaz de hidrolisar a caseína e a gelatina. Essa atividade também foi descrita na peçonha de *Potamotrygon falkneri* (uma espécie de arraia brasileira de água-doce) e *Thalassophryne maculosa*, um peixe-sapo habitante da costa tropical americana do oceano atlântico, respectivamente (Sosa-Rosales et al., 2005; Haddad et al., 2004).

As glândulas de peçonha do *S. plumieri* não são estruturas bem definidas; situam-se em sulcos anterolaterais aos espículos do peixe (Russel, 1965) em uma bainha subcutânea e o empeçonhamento ocorre quando a bainha é rompida por pressão no espinho, e a peçonha então vaza para o muco epidérmico (Halsted et al., 1951).

Peçonhas animais costumam apresentar inibidores da enzima conversora de angiotensina, chamados de peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs). É interessante notar que na peçonha e muco epidérmico do animal em questão, foram encontradas enzimas conversoras de angiotensina.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é o principal responsável pelo controle dos líquidos corporais e do tônus vascular (Basso e Terragno, 2001). A aldosterona, que tem sua liberação controlada pelo SRA, é um hormônio produzido pelo córtex da glândula supra-renal que diminui a excreção de sódio nos rins. O SRA tem sua ação a nível sistêmico e também a nível local, possuindo suas peculiaridades, a depender do tecido estudado (Banegas et al., 2006). Possui alguma ligação com o sistema calicreína-cininogênio-cinina, cujos peptídeos também possuem efeito local e sistêmico. A Enzima conversora de angiotensina I (ECA I) faz parte do sistema renina-angiotensina. Ela converte a angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo inativo, em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo, que é a forma predominantemente ativa da angiotensina (Mehta e

Griendling, 2007) e também é capaz de hidrolisar a bradicinina, sendo um elo de ligação entre os dois sistemas (Tom *et al.*, 2002).

Há dois tipos de receptores em que se liga a Ang II: os receptores a angiotensina tipo 1 (AT₁) e os tipo 2 (AT₂), os quais produzem efeitos diferentes quando associados à Ang II. O receptor AT₁ responde pelos efeitos classicamente conhecidos da Ang II, além de efeitos e interferências reconhecidos recentemente, como vasoconstrição, sede, apetite pelo sódio, resposta aos reflexos dos barorreceptores, comportamento sexual, crescimento celular, estresse, depressão, apreensão, ulceração gástrica, consumo de álcool, diabetes, doença de Parkinson e de Alzheimer. Já os receptores AT₂ desencadeiam efeito postos quando ligados à Ang II, como vasodilatação, efeitos anti-proliferativos e proteção cerebral.

Pensava-se até bem pouco tempo atrás, que o sistema renina-angiotensina seria um sistema linear (Varajic *et al*, 2008), com a ativação do angiotensinogênio pela renina, que retira deste um fragmento de 10 aminoácidos chamado de angiotensina I (Ang I), que por sua vez é transformado pela ECA em angiotensina II (Ang II), e exerce vários efeitos sistêmicos, que resultam basicamente em aumento da pressão arterial e da retenção de sódio nos rins, pela liberação de aldosterona. No entanto, nas últimas décadas, tem se constatado que existem outros peptídeos além de Ang I e Ang II, que exercem funções importantes no controle da pressão sanguínea, e podem servir de novos alvos para novas terapias. A angiotensina (1-7), angiotensina (1-12), angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina (2-10), angiotensina (1-9) são parte desses peptídeos que tem sido descobertos, e associadas a eles importantes funções no sistema renina angiotensina que, já sabe-se hoje, não ser linear como se pensava (Banegas *et al*, 2006). Além disso, novos receptores, como o receptor AT₄ (Chai *et al*, 2004), e uma nova enzima conversora de angiotensina, a ECA II (Rice *et al*, 2004), também foram descobertos. Todos com importantes novas funções no sistema renina-angiotensina, sendo o desequilíbrio em suas proporções uma provável causa de muitas doenças do sistema cardiovascular. A Ang II liga-se aos receptores AT₁ e AT₂. A Ang II (Ang 2-8) liga-se também a esses receptores e produz os mesmos efeitos da Ang II, porém com muito menor intensidade no receptor AT₁. Já a Ang (1-7) se liga ao receptor Mas, produzindo efeitos antiinflamatórios, antifibróticos, facilitação do uso da glicose pelas células e diminuição da resistência à insulina (efeitos anti-diabéticos) e facilita a potencialização

hipocampal de longo prazo, o que explica seus benefícios para o aprendizado e para a memória (Jiang et al., 2012). A Ang IV (Ang (3-8)) e a Ang (3-7) ligam-se ao receptor AT₄, exercendo efeitos relacionados com o fluxo sanguíneo, proteção cerebral, apreensão, memória e às doenças de Parkinson e Alzheimer.

Também tem sido encontradas evidências de que o SRA também está envolvido com a fisiopatogênese de neoplasias, pois em recentes estudos, verificou-se que muitos tipos de câncer estão relacionados com desequilíbrios nos SRA e em nem todos os tecidos foi verificada a presença de um SRA local, mas em todos os tipos de neoplasia em que o desequilíbrio do SRA mostrou exercer influência, havia nos tecidos em questão um sistema desse tipo, sendo as alterações não restritas apenas às células neoplásicas, mas também no tecido conjuntivo que as cerca (estroma) (George, Thomas e Hannan; 2010). Entre as capacidades celulares associadas com a transformação maligna, que são pelo menos 6: angiogênese sustentada, evasão da apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento, intensidade de sinais anti-crescimento, invasão de tecidos e potencial replicativo ilimitado (Hanahan e Weinberg, 2000).

A angiotensina II também é reconhecida como um componente chave nas patologias cerebrovasculares, e por promover a inflamação e o estresse oxidativo, está relacionada com a senescência celular. Por promover lesões em órgãos diversos, a ativação sustentada do SRA também tem é um fator de risco para o desenvolvimento precoce de doenças relacionadas com o envelhecimento, com os efeitos da Ang (1-7) sendo considerados como opostos dos efeitos da Ang II nesse aumento da propensão a essas doenças, comprovados pela verificação de benefícios produzidos pela expressão aumentada de ECA 2, responsável pela formação de Ang (1-7), e da expressão do receptor de Ang (1-7), o receptor Mas. Feitas essas constatações, imaginou-se que os efeitos antagonistas aos da Ang II poderiam ter um efeito no declínio cognitivo, e essa suposição tem se mostrado verdadeira, tendo a regulação para cima da ECA 2 e aumento da razão Ang (1-7)/Ang II, acompanhada de modulação positiva da sinalização de Ang II pelo receptor AT₂ e sinalização de Ang (1-7) pelo receptor Mas tem se mostrado boas estratégias para melhorar as funções cognitivas e prevenir a demência, assim como, maneira semelhante, tem-se encontrado evidências de que a Ang IV possa ser útil para tratar tanto a Doença de Parkinson quanto a de Alzheimer (Wright et al., 2015).

Sendo assim, este trabalho buscou avaliar tanto a capacidade de processar angiotensinas da peçonha quanto a do muco tegumentar, obtendo resultados diferentes, o que evidencia a diferença entre as duas preparações, e isolar a atividade conversora de angiotensina identificada. Os estudos referentes a muco de peixes concentram-se em sua quase totalidade nas propriedades antimicrobianas de tais secreções biológicas, nunca tendo sido avaliada a atividade conversora de angiotensina nesse tipo de fluido biológico.

1. Revisão de literatura

1.1. O *Scorpaena plumieri*

O *Scorpaena plumieri* (Bloch, 1789), classe Actinopterygii, ordem Scorpaeniformes, família Scorpaenidae (é um peixe encontrado mais comumente em recifes de corais rasos e áreas rochosas. Permanece imóvel no fundo (Lieske e Myers, 1994). Alimenta-se de outros peixes e crustáceos. Moderadamente comum entre 5 e 55 metros de profundidade. Mostra manchas brancas brilhantes características sua região axilar peitoral quando perturbado (Monteiro-Neto et al., 2003). Apresenta Sulcos anterolaterais com glândulas de peçonha. Habita a região pontilhada em vermelho e amarelo no mapa (fig 1). A ordem Scorpaeniformes, que compreende os peixes-escorpião, inclui 25 famílias, 266 gêneros e 1271 espécies presentes em ambientes marinhos e de água doce, largamente distribuídos em águas tropicais, incluindo 56 gêneros e 388 espécies (Nelson, 1994), mas podem ser observados em mares temperados e árticos (Halstead, 1995). Representantes da família Scorpaenidae são os peixes mais perigosos do mundo (Kizer et al., 1985; Williamson et al., 1996). São classificados em 3 gêneros, de acordo com seu aparato peçonhento: peixes-leão, peixes-peru e peixes-zebra (*Pterois*), peixes escorpião (*Scorpaena*) e peixes-pedra (*Synanceja*).

Figura 1: O *Scorpaena plumieri*.



Fonte: Autor

O aparato peçonhento é constituído por glândulas de peçonha alongadas em sulcos na porção anterior dos espículos das nadadeiras dorsais, pélvicas e anais, sem um ducto excretório (peixes-leão e peixes-escorpião) ou glândulas longitudinais pareadas altamente desenvolvidas que possuem extensões semelhantes a ductos (peixes-pedra). Os espinhos podem ser eretos, e a peçonha injetada na ferida através desses que penetram a pele da vítima.

Figura 2: Aspectos morfológicos do *Scorpaena plumieri*



Fonte: Autor

Notas: a) *S. plumieri*; b) espículos da nadadeira dorsal de *S. plumieri*; c) Manchas brancas brilhantes na região axilar das nadadeiras peitorais de *S. plumieri*. Foto: autor

A bainha dos espinhos é rompida e puxada para baixo e as glândulas comprimidas, liberando a peçonha (Halstead, 1951; Roche e Halstead, 1972). Todos os peixes da família *Scorpaenidae* têm 11-17 espinhos na nadadeira dorsal (no gênero *Scorpaena* são 12-13), dois espinhos na nadadeira pélvica e três espinhos na nadadeira anal (Moyle e Cech, 1996). Os espinhos dorsais das nadadeiras dos peixes-leão são longos e delgados

e apresentam pequenas glândulas de peçonha. Os espinhos dos peixes-escorpião são curtos e fortes, e as glândulas mais desenvolvidas que nos peixes-leão. Os espinhos nos peixes-pedra são grossos e curtos, com glândulas muito bem desenvolvidas (Halstead, 1995). No oceano atlântico não há peixes-leão ou peixes-pedra restringindo-se estes ao oceano pacífico e índico.

Figura 3: Mapa de distribuição gerado por computador para o *Scorpaena plumieri*



Note: Distribution range colors indicate degree of suitability of habitat which can be interpreted as probabilities of occurrence.

| | | | |
|---|--|---|--|
| Explore native range map Explore suitable habitat map Explore point map Show mapping parameters Create your own map | Download native range data About AquaMaps Comments & Corrections Proper map citation Rate this map | More species data: List of countries List of FAO areas List of ecosystems | Session no. 89 -Close window- <i>Please use -Close window- link just above to exit instead of the browser's X button.</i> |
|---|--|---|--|

Fonte: Intergovernment Panel of Climate Changes (IPCC). Disponível em: < https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular > Acesso em 10/02/2017.

Em relação à epidemiologia, há poucos relatos de acidentes com *S. plumieri* registrados. Estudos epidemiológicos de acidentes com peixes da família *Scorpaenidae* foram realizados mais intensamente a respeito dos peixes-leão (Saunders and Taylor, 1959; Wasserman and Johnston, 1979; Trestail and Al Mahasneh, 1989; Patel and Wells, 1993; Garyfallou and Madden, 1996; Aldred et al., 1996) e peixes-pedra (Green, 1966; Gwee et al., 1994; Chan et al., 1996; Williamson et al., 1996; Burnett, 1998). Acidentes com peixes peçonhentos são bem comuns nas regiões litorâneas brasileiras, principalmente

envolvendo pescadores. O peixe estuarino *Thalassophryne nattereri* (niquim) é um organismo que está frequentemente envolvido em acidentes com pescadores no litoral alagoano, que podem levar a deformidades em extremidades e até mesmo algum nível de perda funcional (das Neves et al., 2018).

1.2. O empeçonhamento por *S. plumieri*

De acordo com os relatos clínicos de acidentes com peixes da família *Scorpaenidae*, as principais manifestações incluem dor intensa, (100%), edema (58%), eritema e equimoses (11%). Em alguns casos (11%) há manifestações sistêmicas, que incluem ansiedade (18%) náuseas e vômitos (13%), hipotensão (2%) e síncope (3%). As lesões costumam ser classificadas em grau I quando apresentam eritema e edema, grau II quando apresentam grau I + formação de vesículas e bolhas e grau III quando há necrose do local (Kizer et al., 1985).

Quanto a acidentes com o *S. plumieri* especificamente, as manifestações clínicas observadas incluem também edema eritema, com necrose e infecção bacteriana secundária em alguns casos. Entre as manifestações sistêmicas, temos náuseas, vômitos, sudorese intensa, diarreia, taquicardia e arritmia, agitação e mal estar. A tabela 1 resume esses sinais e sintomas e sua frequência nos casos avaliados.

Tabela 1: Principais sinais e sintomas do empoçonhamento por *Scorpaenidae*.

| | Empoçonhamento por <i>S. plumieri</i> | Empoçonhamento por <i>S. brasiliensis</i> | <i>Scorpaena</i> não identificado | Total (n=23) |
|-----------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------|
| Dor intensa | 14 (60,9%) | 08 (34,8%) | 01 (4,3%) | 23 (100%) |
| Irradiação da dor | 04 (17,4%) | 02 (8,7%) | - | 06 (26,1%) |
| Adenopatia | 02 (8,7%) | - | - | 2 (8,7%) |
| Eritema | 14 (60,9%) | 08 (34,8%) | 01 (4,3%) | 23 (100%) |
| Edema | 14 (60,9%) | 08 (34,8%) | 01 (4,3%) | 23 (100%) |
| Náusea | 10 (43,5%) | 09 (39,1%) | 01 (4,3%) | 20 (86,9%) |
| Vômitos | 10 (43,5%) | 09 (39,1%) | - | 19 (82,6%) |
| Febre (não estimada) | 11(69,6%) | 09 (39,1%) | 01 (4,3%) | 21 (91,3%) |
| Agitação | 14 (60,9%) | 08 (34,8%) | 01 (4,3%) | 23 (100%) |
| Mal-estar | 14 (60,9%) | 08 (34,8%) | 01 (4,3%) | 23 (100%) |
| Sudorese aumentada | 12 (52,2%) | 05 (21,7%) | - | 17 (73,9%) |
| Diarreia | 03 (13,1%) | 01 (4,3%) | - | 4 (17,4%) |
| Taquicardia/arritmias | 06 (17,4%) | 04 (17,4%) | 01 (4,3%) | 11 (69,6%) |

Fonte: 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. *Toxicol* 42 (2003) 79–83

São conhecidas diversas atividades biológicas da peçonha do *S. plumieri*. Sabe-se que a peçonha é capaz de exercer atividade hemolítica, cardiovascular, inibitória da ligação de integrinas e proteolíticas. Todas essas atividades foram observadas em animais experimentais. A injeção intravenosa de SpV produz, em camundongos, perda da coordenação muscular, paralisia, perda de controle do esfíncter uretral, convulsões e falência respiratória (Carrijo et al., 2005). A peçonha mostra atividade hemolítica dose-dependente em eritrócitos de coelhos e como a peçonha carece da atividade fosfolipase A2, a hemólise pode ser explicada pela formação de poros (Gomes et al., 2013). A injeção da peçonha na pata de camundongos induziu edema que é tempo e dose-dependente (Gomes et al., 2011). A peçonha também causa uma resposta inflamatória clássica, com infiltrado de células inflamatórias e acúmulo de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e fator quimioatrativo de monócitos (MCP-1) (Menezes et al., 2012). O edema induzido pela injeção de peçonha na pata do camundongo foi significativamente reduzido pela administração prévia do inibidor de serina-proteases aprotinina, e também do antagonista dos receptores B2 de bradicinina, enquanto que o tratamento com o inibidor não-seletivo da ciclooxigenase (COX) diclofenaco e com o antagonista de receptores H₁ de histamina prometazina apresentou menos efeito, sugerindo um importante papel do sistema caliceína-cinina do empoçonhamento

(menezes et al., 2012). Além da resposta local, uma resposta sistêmica é ativada pela injeção da SpV na apata do camundongo, ou em sua cavidade peritoneal, levando à disfunção da barreira endotelial, hiperpermeabilidade vascular e resposta inflamatória sustentada, culminando em edema alveolar e inflamação neutrofílica. A resposta inflamatória pode estar relacionada a atividade de proteases, hialuronidases e fatores inibidores de integrinas, que podem afetar a matriz extracelular.

A SpV foi capaz de hidrolisar a caseína e a gelatina. Essas atividades também foram verificadas nas peçonhas de *Potamotrygon falkneri* e *Thalassophryne maculosa* (Sosa-Rosales, 2005; Haddad Jr. et al., 2004).

Em relação à pressão arterial é observado um aumento da pressão arterial média, mas uma resposta bifásica na pressão arterial média (PAM) na injeção de maiores quantidades (338 µg/kg) da peçonha do *S. plumieri* em camundongos. Um aumento inicial da pressão arterial média, seguido por uma queda e morte. A fase de elevada pressão tem sido associada a adrenorreceptores enquanto que a fase hipotensiva parece envolver receptores muscarínicos e/ou síntese de óxido nítrico (Church e Hodgson, 2002; Carlson et al., 1971).

Em corações isolados de ratos, SpV produz efeitos cronotrópico, ionotrópico e lusitrópico ventriculares positivos dose-dependentes e passageiros, que são atenuadas por um antagonista adrenérgico β não-seletivo (Gomes et al., 2010). Também produz um aumento dose-dependente na perfusão do leito coronário, e um efeito bifásico em anéis de aorta de ratos intactos e pre-contráídos, sendo uma fase inicial de relaxamento seguida por uma contração sustentada (Gomes et al., 2010; Andrich et al., 2010).

1.3. Proteínas bioativas isoladas de SpV

Protease gelatinolítica de Scorpaena plumieri (Sp-GP)

Considerada a primeira proteína ativa isolada de um peixe-escorpião (Carrijo et al., 2005). Embora muitas peçonhas de peixes possuam atividade proteolítica, as únicas outras proteases desta origem já isoladas consistem em um grupo de 5 toxinas chamadas *natterinas*, isoladas da peçonha do peixe-sapo *Thalassophryne nattereri*.

Essas proteases clivam o cininogênio humano e degradam o colágeno tipo I e tipo II *in vitro*.

Lectinas

Têm a habilidade de induzir a hemaglutinação e desfazer interações de células da matriz extracelular, pois são moléculas ligadoras de carboidratos. Plumieribetina, uma lectina homóloga a lectina ligadora de manose tipo B e um grupo de 5 isolectinas (Sp-CL 1-5), homólogas a lectinas do tipo C, foram purificadas da peçonha do *S. plumieri* (Evangelista et al., 2009; Andrich et al., 2015). Plumieribetina foi purificada tanto da SpV quanto do muco epidérmico como uma banda de 14 kDa no SDS-PAGE.

Toxina citolítica do S. plumieri

Consideráveis evidências sugerem que os efeitos cardiovasculares, citolíticos e inflamatórios das peçonhas de peixes da família *Scorpaenidae* devem-se a uma citolisina denominada Sp-CTX, uma glicoproteína com duas subunidades de aproximadamente 65 kDa. É uma proteína lábil e de acordo com a base de dados NCBI, possui 29 resíduos trípticos com identidade a outras citolisinas oligoméricas (SNTX, neoVTX, Pvtoxina e/ou Patoxina) encontradas em peixes da família *Scorpaenidae* e *Synanceiidae* (Gomes et al., 2013).

1.4. O sistema renina-angiotensina

1.4.1. Vias bioquímicas

O sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado atualmente como o principal mecanismo de controle sistêmico da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico humano. Está diretamente relacionado à produção de aldosterona, um hormônio produzido pelo córtex da glândula supra-renal que está envolvido na excreção de sódio e potássio pelos rins. A renina é a primeira enzima envolvida no SRA. A produção de

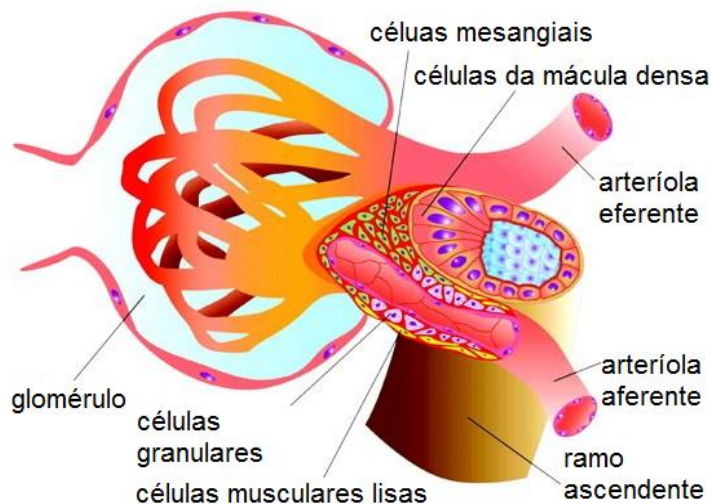
angiotensina II (Ang II) encontra-se diretamente em função da quantidade de renina disponível. O controle da liberação de renina se dá por 3 vias:

- Via da mácula densa;
- Via barorreceptora intrarrenal;
- Via do receptor β_1 -adrenérgico.

Via da mácula densa

A mácula densa é uma região de células especiais adaptadas, localizadas numa porção do túbulo contorcido distal adjacente às arteríolas aferente e eferente do glomérulo (fig. 5). Quando a mácula densa detecta alterações na absorção de sódio e cloreto, um sinal é enviado para as células justaglomerulares, desencadeando a liberação de renina por estas. Aumentos no fluxo de NaCl através da mácula densa inibem a liberação de renina, enquanto que a redução a estimula. ATP, adenosina e as prostaglandinas modulam a via da mácula densa.

Figura 4: Glomérulo e estruturas justaglomerulares.



Fonte: Phillip Darwin Bell. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. PNAS. April 1, 2003 vol. 100 no. 7. 4322-4327. Acessado em 9/1/2014 no endereço eletrônico: <http://www.pnas.org/content/100/7/4322/F1.expansion.html>

Adenosina é liberada quando o transporte de sódio aumenta no túbulo contorcido distal, e estimula a liberação de renina. As prostaglandinas são produzidas quando o transporte de sódio diminui, o que desencadeia a liberação de renina ao potencializar a formação de AMP cíclico (AMP_c) (Viridis, 1999). Há também evidências de que a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) estejam envolvidas na regulação da liberação de renina com a inibição seletiva dessas enzimas inibindo a liberação de renina (Harris, 1994). O transporte de NaCl na mácula densa é mediado pelo simportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻, que permanece quase todo o tempo saturado em relação ao Na⁺, mas não ao Cl⁻, o que confere à concentração de cloreto uma capacidade muito maior de influenciar a liberação de renina que a de íon sódio.

Via barorreceptora intrarrenal

O aumento da pressão sanguínea ou da perfusão renal nos vasos pré-glomerulares inibem a liberação de renina, enquanto que a diminuição da pressão sanguínea ou da perfusão renal a estimula. Acredita-se que o estímulo imediato para a secreção seja uma redução da pressão na parede da arteríola aferente.

Via do receptor β₁-adrenérgico

É determinada pela liberação de norepinefrina a partir dos nervos simpáticos pós-ganglionares.

A renina, por sua vez, cliva o angiotensinogênio, uma glicoproteína globular abundante, de massa molecular de 55 a 60 kDa, que é sintetizado na forma de pré-angiotensinogênio, que possui um peptídeo de sinalização de 24 ou 33 aminoácidos. Possui 452 aminoácidos, dos quais os 10 últimos são clivados pela renina para liberar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A síntese de angiotensinogênio é estimulada pela inflamação, insulina, estrogênios, glicocorticoides, hormônio tireóideo e Ang II.

A Ang I é convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II liga-se a dois receptores ligados à proteína G (GPCR), chamados de AT₁ e AT₂ (Lamarié e Schiffrin, 2009). Os efeitos clássicos da Ang II são

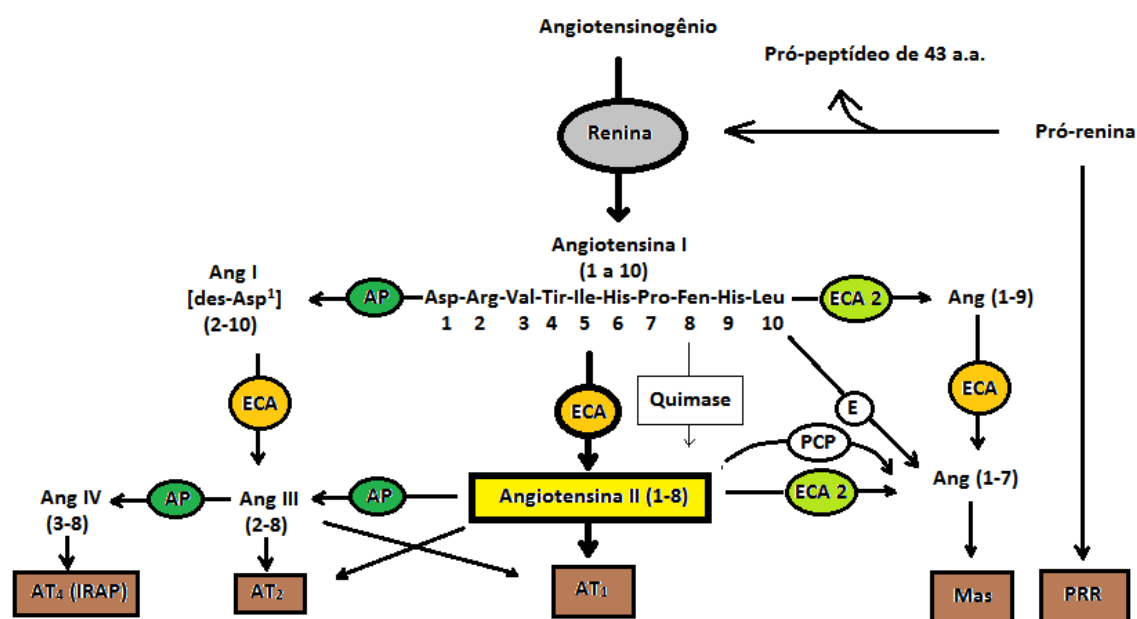
desencadeados quando o peptídeo ligam-se ao receptor AT_1 , possuindo vários efeitos fisiológicos, tais como a vasoconstrição direta das arteríolas pré-capilares e em menor grau nas vênulas pós-capilares; aumento da neurotransmissão noradrenérgica periférica (Zimmerman *et al.*, 1987), ao inibir a receptação de norepinefrina nas terminações nervosas simpáticas, e provoca liberação de catecolaminas na medula supra-renal, causando assim um aumento da resistência periférica total no sistema circulatório (Peach *et al.*, 1966). Também tem seus efeitos na função renal, onde diminui a excreção diária de Na^+ e de água, e aumenta a de K^+ . Em pequenas concentrações, estimula a troca de Na^+/H^+ no túbulo proximal, o que aumenta a reabsorção de Na^+ , Cl^- e bicarbonato (Liu e Cogan, 1987), e em altas concentrações pode inibir o transporte de Na^+ nesse mesmo local. Aumenta a expressão do simportador de Na^+ /glicose nesse local (Bautista *et al.*, 2004), e estimula diretamente o simportador de $Na^+/K^+/2Cl^-$ no ramo ascendente espesso da alça de Henle (Kovács *et al.*, 2002). Estimula a síntese e a liberação de aldosterona pelo córtex renal, e diminui o fluxo sanguíneo renal pela constrição direta do músculo liso vascular renal.

Existem algumas vias alternativas para a síntese de Ang II, enzimas presentes em alguns tecidos convertem o angiotensinogênio em Ang I (proteases não-renina) ou diretamente em Ang II, como a catepsina G (Rikl *et al.*, 2006) e a tonina (Garcia *et al.*, 1981). Existem também enzimas de processamento de Ang I em Ang II diferentes da ACE, como a catepsina G, enzima de geração de Ang II sensível à quimostatina (elastase-2) e a quimase cardíaca (Paula *et al.*, 1998; Urata *et al.*, 1990). Possivelmente, a quimase, que acredita-se ser derivada dos mastócitos, contribui para a conversão tecidual local de Ang I para Ang II, principalmente no coração (Wei *et al.*, 1999, Wolny *et al.*, 1997).

Ang II, o peptídeo mais ativo da angiotensina, sofre degradação adicional, e outros peptídeos são formados (fig. 5). O sistema renina-angiotensina tem se mostrado extremamente complexo, e uma série de inibidores de vários pontos desse sistema tem sido desenvolvidos e usados como anti-hipertensivos, com vantagens e desvantagens próprias (Hilgers e Mann, 2002). Durante muito tempo, pensou-se que o sistema renina-angiotensina (SRA) resumia-se a um sistema em que o peptídeo Ang II era o efetor de todos os efeitos, e que as enzimas renina e ACE eram as únicas responsáveis pela formação de Ang I e Ang II. No entanto, durante as duas últimas décadas, percebeu-se que o sistema é bem mais complexo, tendo suas peculiaridades em tecidos como o

coração e os rins (Varajic *et al.*, 2008). A angiotensina(1-7), por exemplo, é um heptapeptídeo, resultante tanto de Ang I e Ang II, que contrabalança os efeitos de Ang II (Ferrario, 1997). Na fig. 5, podemos ver as vias de formação não só da Ang(1-7), mas também de outras angiotensinas cujos papéis vem sendo elucidados no sistema renina-angiotensina.

Figura 5: Principais vias bioquímicas do sistema renina-angiotensina.



Fonte: Autor

Notas: As setas mais escuras indicam a via clássica, e as demais as vias alternativas. ECA: enzima conversora de angiotensina; Ang: angiotensina; AP: aminopeptidase; E: endopeptidases; IRAP: aminopeptidases reguladas pela insulina; PCP: prolilcarboxipeptidase; PRR: receptor (pró-)renina. Receptores envolvidos: AT₁, AT₂, Mas, AT₄ e PRR.

Várias endopeptidases específicas de tecidos, como a neprilisina (NEP), thimet oligopeptidase (TOP) e prolil oligopeptidase (POP), podem catalisar a hidrólise do decapeptídeo Ang I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) na ligação Pro⁷-Phe⁸ para liberar os três aminoácidos aminoterminais e Ang(1-7) (Varajic *et al.*, 2007). A neprilisina degrada o peptídeo natriurético atrial, que é um vasodilatador, tentou-se criar um anti-hipertensivo inibindo-se a neprilisina, mas essa estratégia não foi efetiva (Favrat *et al.*, 1995), talvez pelo fato de a neprilisina ter uma elevada especificidade para a formação de Ang(1-7), que também possui efeitos vasodilatadores, opostos aos da Ang

II. NEP também degrada Ang(1-7) até Ang(1-4) (Turner, 2003), e seu papel no SRA ainda deve ser elucidado de maneira mais eficiente.

Foi constatado que uma enzima homóloga da ACE, a ACE2, é capaz de fazer a conversão direta da Ang II em Ang(1-7) (figura 5). Como é uma carboxipeptidase, a ECA2 é também capaz de converter Ang I em Ang-(1-9), que pode ser posteriormente metabolizada a Ang-(1-7) pela ACE (Rice *et al.*, 2004). Foi constatado em camundongos nocaute para a ECA2 o desenvolvimento de severa disfunção cardíaca, o que pode ser explicado pelo fato de a ECA2 ter especificidade mais alta pela Ang II, demonstrando com isso a importância do balanço entre Ang II e Ang-(1-7) para a função cardíaca, uma vez que a Ang II exerce um efeito modelador sobre o miocárdio (Crackower *et al.*, 2002).

Além de clivar a bradicinina e acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, a ECA também degrada Ang-(1-7) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷), agindo na ligação Ile⁵-His⁶ para formar o metabólito inativo Ang-(1-5) (Allred *et al.*, 2000). A hidrólise da ligação Tyr⁴-Ile⁵ na Ang-(1-7) pela neprilisina parece ser a via metabólica principal para a Ang-(1-7) no rim (Chapell *et al.*, 2001).

Outros peptídeos, como a angiotensina III (Ang III) parecem exercer também funções importantes no sistema renina-angiotensina. A Ang III é um vasoconstrictor menos potente que Ang II e também estimula a liberação de aldosterona (Li *et al.*, 1997).

A Ang I é convertida em outros peptídeos, que não a Ang II, por vias alternativas de clivagem da mesma. Pelo fato de as pesquisas que investigaram as enzimas capazes de degradar a Ang I terem usado quase que completamente métodos baseados em anticorpos para detectar Ang II, tem-se muito pouco conhecimento acerca de outros metabólitos que podem ser formados a partir de Ang I (Velez *et al.*, 2009).

A neprilisina e a aminopeptidase-A têm ação sobre a Ang I e foi recentemente demonstrado que podócitos de camundongo em cultura metabolizam a Ang I principalmente a Ang(1-7) e Ang(2-10) através dessas duas enzimas (Velez *et al.*, 2007).

A Ang IV parece exercer uma função parácrina, regulando o fluxo sanguíneo local no córtex renal de ratos (Coleman *et al.*, 1997), e a Ang(2-10) parece ter efeitos opostos ao da Ang II (Min *et al.*, 2000).

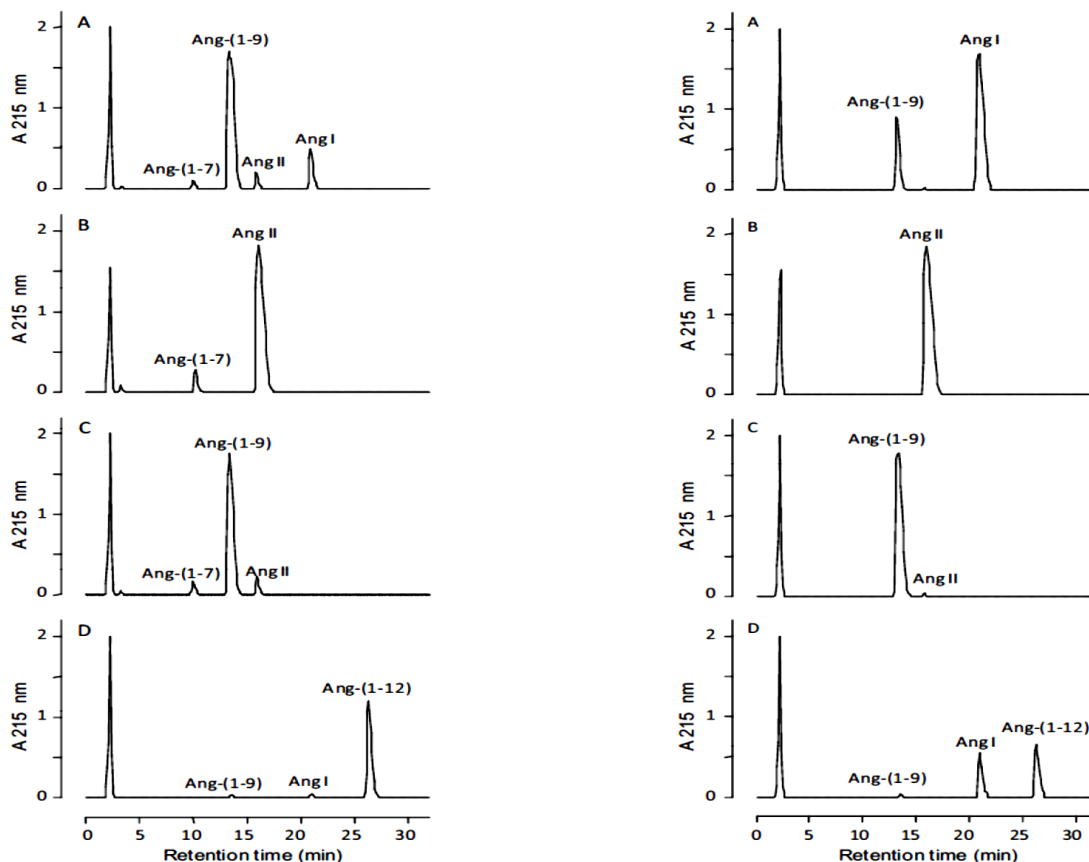
Há uma classificação que separa as enzimas capazes de clivar Ang I até Ang II em três categorias (Urata *et al.*, 1990), baseadas no critério de sensibilidade a inibidores enzimáticos. A primeira delas, e a mais importante sistemicamente, é a classe das

metalo-dipeptidil carboxipeptidases, da qual a ECA faz parte. A segunda classe é a das serino-proteases sensíveis à aprotinina, como a calicreína (Maruta e Arakawa, 1983) e a terceira são as serino-proteases sensíveis à quimostatina, como a enzima geradora de Ang II quimostatina-sensível encontrada na artéria mesentérica de cães (Okunishi et al., 1987), a quimase humana (Urata, Healy et al., 1990; Urata, Kinoshita et al., 1990) e a enzima elastase-2 de ratos (Paula et al., 1998; Santos et al., 2002). A elastase 2 também é capaz de formar Ang II diretamente a partir de angiotensinogênio (Boucher et al., 1977; Paula et al., 1998; Santos et al., 2004)

Tanto aminopeptidases quanto carboxipeptidases estão envolvidas no metabolismo das angiotensinas, e estas agem de maneira diferente, a depender do tecido em que se encontram. Aminopeptidases como aspartil-aminopeptidase (AspAP), glutamil-aminopeptidase (GluAP), alanil-aminopeptidase (AlaAP) agem no RAS renal de camundongos, em conjunto com as atividades de diferentes receptores de angiotensina, para regular os níveis de diferentes tipos de angiotensinas, como Ang II, Ang(2-10), Ang III e Ang IV (Prieto *et al*, 2002). Na figura 6, está mostrado como essas diferentes angiotensinas processam essas angiotensinas.

Carboxipeptidases também atuam no processamento de angiotensinas, igualmente com peculiaridades em diversos tecidos diferentes (Pereira *et al.*, 2012). Na figura 7, temos os cromatogramas que revelam o comportamento de carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos frente a diversas angiotensinas.

Figura 6: Processamento de Ang I, Ang II, Ang (1-9) e Ang (1-12) por carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos.



Fonte: Pereira, Hugo J.V.; Laura L. Souza, Claudio M. Costa-Neto, Maria Cristina O. Salgado, Eduardo B. Oliveira. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. *Peptides*, Volume 33, Issue 1, January 2012, Pages 67–76

1.4.2. Sistema renina-angiotensina e câncer

Tem sido constatadas algumas associações com a inibição/ativação de alguns componentes do SRA e neoplasias. Um dos exemplos é a transativação de receptores tirosina-quinase (RTKs) por receptores AT_1 . O receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR) é um desses receptores que pode ser ativado por mediadores liberados pela ativação do AT_1R , que é um receptor acoplado à proteína G. O AT_1R é capaz de aumentar a concentração de diversos segundo-mensageiros, como íon cálcio (Ca^{2+}), proteína quinase C (PKC) e proteína tirosina-quinase (PTK), que serão responsáveis pela ativação do EGFR. Outros mecanismos mediados por metaloproteinases da matriz extracelular

(MMPs) e membros da família de desintegrinas e metaloproteinases (ADAM) também promovem a ativação desse receptor, que tem sido associado ao desenvolvimento de neoplasias hepatocelulares (Itabashi et al., 2018). Em uma análise de larga escala, envolvendo 31 estudos de expressão gênica, verificou-se que AGTR1, o gene que expressa o receptor AT₁, tinha sua expressão aumentada em 10-20% de casos de câncer de mama em vários estudos independentes. A expressão aumentada de AGTR1 era restrita a tumores com receptores de estrogênio e nunca vinha acompanhada de expressão aumentada de ERBB2, sugerindo que o controle transcricional de AGTR1 no câncer de mama é responsivo a sinalização de estrogênio e funcionalmente redundante com a sinalização de EGFR (Rhodes et al., 2009).

Também um SRA localizado interfere em várias formas de câncer gástrico e correlaciona-se com a progressão do tumor e com suas metástases (Kinoshita et al., 2009; Rocken et al., 2005, 2007). No câncer de ovário, a malignização é acompanhada por um aumento da expressão de AT₁ e no câncer de próstata, também a expressão de ECA está aumentada quando comparada ao câncer não tratado e ao tecido prostático normal (Uemura et al., 2006). A expressão de SRA locais não segue um padrão específico, podendo ser variado a depender da progressão da doença, estando a expressão de AT₁ aumentada em lesões hiperplásicas ductais e carcinoma *in situ* da mama e diminuída no carcinoma ductal invasivo (De Paepe et al., 2001)

Observa-se como um padrão uma desregulação dos SRA locais na malignidade, que se estende para o estroma, vasculatura e células de defesa (macrófagos) associadas ao tecido, combinada com uma expressão aumentada de fatores de crescimento do epitélio vascular (VEGF), que promove a angiogênese (Amaya et al., 2004; Doi et al., 2010; Egami et al., 2003; Fujita et al., 2005; Imai et al., 2007). Uma das principais fontes de desregulação são os polimorfismos da ECA em células germinativas. Os mais estudados são os do tipo inserção/deleção (I/D), que são responsáveis por mais de 50% da variação dos níveis plasmáticos de ECA (Rigat et al., 1990; Tiret et al., 1992). Quanto a mutações somáticas, verificou-se que no genoma de células de 3.131 tumores e linhagens de células malignas, os genes responsáveis pela transcrição da renina e da ECA estão em áreas significativamente amplificadas focalmente, sugerindo que esse número elevado de cópias no genoma pode contribuir para a expressão aumentada de renina e ECA no câncer. Por outro lado, a região que codifica os receptores AT₁ não encontraram-

se em regiões focalmente amplificadas, o que é condizente com a suposição de que o número de cópias no genoma não é considerada a melhor explicação da região que codifica AT₁ no câncer (Rhodes et al., 2009). Outros mecanismos, como a desregulação da sinalização a montante parece ter um papel predominante na ativação do SRA na transformação maligna. No câncer de pâncreas, a superexpressão de AT₁ não estava limitada às células ductais cancerosas, mas também encontradas em toda vasculatura, fibroblastos e macrófagos associados ao tecido (Amaya et al., 2004; Ohta et al., 2003), sugerindo que a desregulação da sinalização está relacionada com o microambiente do câncer, ao invés de com as lesões genômicas em células pancreáticas ductais malignas (Fujimoto et al., 2001).

Todas evidências também são corroboradas pelo fato de, em estudos pré-clínicos, bloqueadores do receptor AT₁ (BRA) e inibidores da ECA (IECA) mostraram eficácia em reduzir metástases, e a expressão de AT₁ frequentemente está relacionada com a invasividade do tumor (Fujita et al., 2002; Miyajima et al., 2002).

A desregulação do SRA refletidas na inflamação e angiogênese agem sinergisticamente para promover o crescimento de tumores (Ager et al., 2008; Dashayes e Nahmias 2005; Smith e Missailidis 2004)

1.4.3. SRA, memória e cognição

Vários estudos tem verificado a relação do SRA com as funções cognitivas, assim como também doenças relacionadas a elas. A Ang II, a qual se acreditava ter um papel de hormônio regulador da pressão arterial e da homeostase de fluidos na periferia, tem sido reconhecido como um neuromodulador indutor da entrada de fluidos e sal e aumento da pressão arterial (Saavedra 2005; Saavedra et al., 2005). Os receptores AT₁ localizados no encéfalo mediam as clássicas funções da Ang II no cérebro, que são o controle dos sistemas hormonal e simpáticos centrais (Saavedra 2005, Saavedra et al., 2005). As localizações específicas de grande número de receptores AT₁ em vias sensoriais, todas as estruturas límbicas (Tsutsume et al., 1991) e microvasculatura do endotélio cerebral indicam a possibilidade de vários papéis centrais adicionais para a Ang II, incluindo a regulação da reação ao estresse, desenvolvimento cerebral, migração

neuronal, informação sensorial e atividade motora, cognição, controle das respostas emocionais e fluxo sanguíneo cerebral.

Ang II inibe a liberação de acetilcolina em modelos experimentais *ex vivo* no córtex temporal humano (Barnes et al., 1990) e na amígdala de roedores (von Bohlen e Albrecht, 1998).

Acredita-se que inibidores da ECA, como o captopril, facilitam a função cognitiva, provavelmente diminuindo os níveis de Ang II e removendo a influência inibitória frente à liberação de acetilcolina (Wright e Harding, 2010; Ellul et al., 2007), resultando em facilitação da consolidação da memória e recuperação (Barnes et al., 1992). Estudos mostram que a inibidores da Ang II ajudam a preservar as funções cognitivas em pacientes com Alzheimer por um mecanismo que é independente do abaixamento da pressão sanguínea (Shah et al., 2009).

Em um modelo de camundongos com Doença de Alzheimer (AD) induzido por injeção intracerebroventricular de amiloide β (A β) 1-40, a administração de perindopril, um inibidor da ECA com penetração no SNC, a atividade da ECA hipocampal foi significativamente inibida e preveniu o prejuízo cognitivo que foi atribuído à supressão da ativação e atenuação pela micróglia/astrócitos do estresse oxidativo causado pela indução da sintase de óxido nítrico indutível (iNOS) e regulação para baixo da superóxido dismutase extracelular (Maul et al., 2008). Em contraste, nem enalapril nem imidapril foram capazes de prevenir os prejuízos cognitivos e danos cerebrais neste modelo de camundongos AD. A Ang IV, quando se liga a seus receptores específicos AT₄, melhora a memória e o aprendizado (Wright e Harding, 2010).

Achados sugerem que muitos dos efeitos positivos sobre a memória inicialmente atribuídos à Ang II são, na verdade, devidos à conversão de Ang II a Ang IV, e é esse peptídeo agindo como agonista nos receptores AT₄ que é responsável pela facilitação cognitiva (Braszkko et al., 2006; Chai et al., 2004; Wright e Harding 1997). Essa hipótese é consistente com o achado de que bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs) melhoram a cognição (Basso et al., 2005; Ellul et al., 2006; Hajjar et al., 2005; Khachaturian et al., 2006; Mogi e Horiuchi, 2009). Ainda deve ser testado se o receptor AT₁ proporciona o excesso de Ang II endógena em Ang IV, que então ativa o receptor AT₄. Esta hipótese é corroborada pela observação de que inibidores da ECA melhoram a

cognição, uma vez que os níveis aumentados de Ang I resultantes são convertidos a Ang (1-9) e então a Ang III, Ang IV e Ang (3-7), que agem como agonistas no receptor AT₄.

A tabela 2 resume os potenciais papéis que o SRA apresenta em diversas desordens clínicas.

Tabela 2: Sumário referente a principais papéis para o SRA em desordens clínicas.

| Desordem clínica | Estratégia de tratamento | Resposta |
|-------------------------|---|--|
| Estresse | Bloqueio dos receptores AT ₁ em ratos pelo candesartan | Preveniu a ligação do receptor AT ₁ na pituitária anterior, adrenal e núcleo paraventricular, também reduziu elevações do ACTH pituitário e da corticoesterona adrenal; Ulceração gástrica diminuída induzida por estresse ao frio; Preveniu ativação simpática periférica e central ao estresse. |
| Doença de Alzheimer | BRAs administrados a ratos e pacientes com Doença de Alzheimer | Melhoria da memória |
| Facilitação da memória | Agonistas dos receptores AT ₄ em ratos; BRAs administrados a camundongos; BRAs administrados | Potenciação de longo termo aumentada; Melhora da memória espacial; Melhora da cognição; Melhora da memória. |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| | apacientes idosos e com Alzheimer | |
| Proteção cerebral | Ang IV administrada a ratos e gerbis; Fator de crescimento hormonal agindo em receptores c-Met em gerbis. | Fluxo sanguíneo cerebral facilitado e protegido contra a isquemia; Proteção contra a perda de células neuronais hipocampais durante isquemia cerebral global |
| Depressão | IECA administrados para pacientes portadores de Alzheimer; Catopril administrado a camundongos; Losartana administrada a ratos; | Redução dos sintomas depressivos; |
| Convulsões por consumo de álcool | IECA administrado a ratos; Ang II administrada a camundongos; Ang IV administrada a camundongos. | Redução do consumo de álcool; Elevado limiar a várias drogas indutoras de convulsões que podem ser bloqueadas pelo losartan; Forneceu um efeito anti-convulsivante para o fentilenotetrazol; |
| Doença de Parkinson | Tratamento com IECAs para pacientes com Parkinson; | Mostrou atividade motora melhorada; Protege neurônios de dopamina; |

| | | |
|----------|--|---|
| | BRAs administrados a modelos animais 6-OHDA e MPTP. BRAs administrados para modelos animais 6-OHDA e MPTP | |
| Diabetes | BRAs administrados para pacientes diabéticos; IECAS ou BRAs para pacientes diabéticos do tipo I. | Proteção contra danos em órgãos; Retinopatia atenuada; Lentificou a progressão da retinopatia |

Fonte: Adaptado de Wright e Harding: The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Arch.* 2013 Jan;465(1):133-51.

1.4.4. A enzima conversora de angiotensina 1 (ECA)

A enzima conversora de angiotensina 1 (ECA) é uma cininase II, dipeptilcarboxipeptidase, com massa molecular de aproximadamente 170 kDa, com a ECA humana exibindo 1.277 resíduos de aminoácidos e dois domínios homólogos, exibindo cada um um local catalítico e uma região de ligação ao Zn²⁺. A ECA humana possui um grande domínio extracelular aminoterminal, um curto domínio carboxiterminal e uma região hidrofóbica de 17 aminoácidos que ancora a enzima à membrana celular do epitélio luminal dos vasos sanguíneos. É bastante inespecífica e cliva unidades dipeptídicas de substratos com diferentes sequências de aminoácidos. A prolina não deve ser o penúltimo aminoácido, e daí a ECA não clivar a Ang II.

A ECA, além da Ang I, também degrada a bradicinina, um potente vasodilatador endógeno, contribuindo ainda mais para o efeito de elevação da pressão arterial (Erdos & Skidgel, 1977; Kaplan, 2014). Entre as formas de isoenzimas, temos as formas

somática e testicular da ECA. A forma somática é uma enzima ligeiramente maior, com massa molecular entre 150 e 180 kDa, e possui dois centros catalíticos, com diferenças para especificidade de substratos e perfis de inibição e desnaturação (Jaspard et al., 1993; Rousseau et al., 1995). A forma menor, a forma testicular, possui apenas um. (Langford et al., 1993; Kondoh et al., 2005, Ryan et al., 1975). A forma somática promove os efeitos clássicos sobre o sistema renina-angiotensina, com suas particularidades nos mais diversos sistemas; a forma testicular participa do processo de maturação de espermatídes e espermatócitos (Köhn et al., 1998).

1.4.5. *Enzimas conversoras de angiotensina em peçonhas animais*

É interessante ressaltar que peçonhas animais normalmente possuem inibidores da enzima conversora de angiotensina, contribuindo para seus efeitos hipotensores, ao contrário da amostra analisada aqui. Nosso grupo identificou pela primeira vez uma enzima conversora de angiotensina em peçonha de peixe (Tenório et al., 2015) e a isolou e caracterizou (Marques et al., 2016).

O Brasil foi pioneiro no que diz respeito às relações de peçonhas animais com o sistema renina-angiotensina ou de vasoceptídeos. Na década de 50, Maurício Rocha e Silva realizou pesquisas na Faculdade de Medicina da USP que culminaram na descoberta da bradicinina, um vasoceptídeo potente vasodilatador, em 1949. A partir disso, o pesquisador Sérgio Ferreira chegou aos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs) na década de 60 do século XX (Ferreira, 1965), que foram usados como modelo para a síntese do Captopril, fármaco que foi largamente usado como anti-hipertensivo e inaugurou uma nova classe desses fármacos, que viria a revolucionar o tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Desde então, muitos estudos visaram a identificação e caracterização de BPPs a partir de várias fontes naturais, mais recentemente tendo crescido o interesse pela relação estrutura-atividade (Conceição et al., 2007). Os componentes dessa peçonha inibem a lise do vasodilatador endógeno bradicinina (BK) enquanto também inibe a síntese do vasoconstrictor Ang II, levando a uma redução da pressão arterial sistêmica. Conceição e colaboradores (Gomes et al., 2007) isolaram um BPP, Phypo Xa (10 resíduos de a.a., 1215 Da) a partir da pele de *Phyllomedusa*

hypocondrialis (um sapo brasileiro) enquanto Verano-Braga et al. (Verano-Braga et al., 2008) descobriu um grupo de BBPs na peçonha de *Tityus serralatus* (escorpião amarelo).

2. Objetivos

2.1. Geral

Isolar e caracterizar as atividades processadoras de angiotensina do muco epidérmico do *S. plumieri*.

2.2. Específicos

- Extrair o muco epidérmico e avaliar suas atividades proteolíticas frente à angiotensina I;
- Isolar e caracterizar a enzima processadora de angiotensina I presente no muco epidérmico de *S. plumieri*;
- Definir a seletividade frente a inibidores específicos da enzima conversora de angiotensina do muco do *S. plumieri* por espectrometria de massas.

3. Materiais e métodos

3.1. *Extração da peçonha e do muco epidérmico*

Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo N° 77/2015). Os espécimes foram coletados no Pontal de Coruripe, na Cidade de Coruripe, no estado brasileiro de Alagoas.

A peçonha foi extraída pelo método previamente descrito por Schaeffer et al. (1971). Espécimes selvagens foram coletados de águas rasas do litoral do município alagoano de Coruripe. Os espículos foram extraídos com um alicate de corte, congelados com nitrogênio líquido e macerados. Foi acrescentado uma pequena quantidade (cerca de 100 µL/g) de água deionizada, e a essa mistura foi centrifugada a 10.000 g por 3 minutos. Chamou-se de extrato bruto da peçonha. O muco epidérmico foi coletado com uma espátula, passando-a delicadamente pelo corpo do peixe, antes de proceder à extração da peçonha.

3.2. *Ensaio de Bradford para quantificação de proteínas*

Foi criada uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) em duplicata, com pontos de concentração de 5, 10, 20, 40 e 80 µg de proteína. A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

3.3. *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

O método de Laemmli (1970) foi seguido, usando o sistema eletroforético Mini-Protean 3 da Bio-Rad, com gel de separação a 12% e de concentração a 6% e voltagem constante de 90 V para o muco epidérmico de *S. plumieri*. Os géis foram corados com azul rilhante de coomassie G-250.

3.4. *Ensaio de atividade enzimática*

Foi testada a atividade da peçonha frente a angiotensina I (Ang I), angiotensina II (Ang II) e bradicinina (BK). Estes substratos foram deixados a reagir por 4 horas, a 25°C, em uma quantidade de substrato de 20 nmol (20 µL de solução a 1 mM) + 10 µL de extrato bruto de peçonha e muco epidérmico, a uma concentração de proteína de 1,3 e 1,4 mg/mL, respectivamente. As reações com inibidores foram feitas com captopril (20 µM na reação) e ácido etileno-diamino tetraacético (EDTA) (1 mM na reação), num volume reacional total de 170 µL. A reação foi parada pela adição de 40 µL de ácido trifluoroacético 5%.

Para o muco bruto, usou-se 10 microlitros em 100 microlitros de tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0 e 10 microlitros de solução contendo angiotensina I à concentração de 1 mM. As misturas reacionais foram deixadas a reagir por 1 hora, e então a reação era interrompida com solução de ácido trifluoroacético (TFA) 5%. foram cromatografadas em cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, usando um equipamento Shimadzu SCL-6B acoplado a uma coluna C-18 (0,45 x 15), monitorado por absorvância em comprimento de onda de 215 nm, fluxo de 1 mL/min., com um gradiente que foi de 20% de solução B (acetonitrila 60% , TFA 0,1%) e 80% de solução A (acetonitrila 5%, TFA 0,1%) até 60% de solução B e 40% de solução A, em 24 min.

Para frações obtidas por cromatografia de desempenho rápido (FPLC), foram usados 100 microlitros da própria fração, 10 microlitros de AngI 1 mM e foram deixados reagir por 1-2 horas, de maneira que a conversão de Ang I em Ang II não fosse total, e em torno de 50%.

3.5. *Purificação da enzima conversora de angiotensina*

Foi usada cromatografia de desempenho rápido (FPLC), usando-se um cromatógrafo ÄKTA pure® GE Healthcare. Foi usada uma coluna de gel filtração S100 de 1,6 m de comprimento e volume de 55 mL, onde foram aplicados 300 microlitros do extrato bruto. A fase móvel consistiu de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Foi usada também uma coluna trocadora de ânions de alta resolução Mono Q, onde foram aplicadas as frações de interesse provenientes da cromatografia de filtração em gel, em

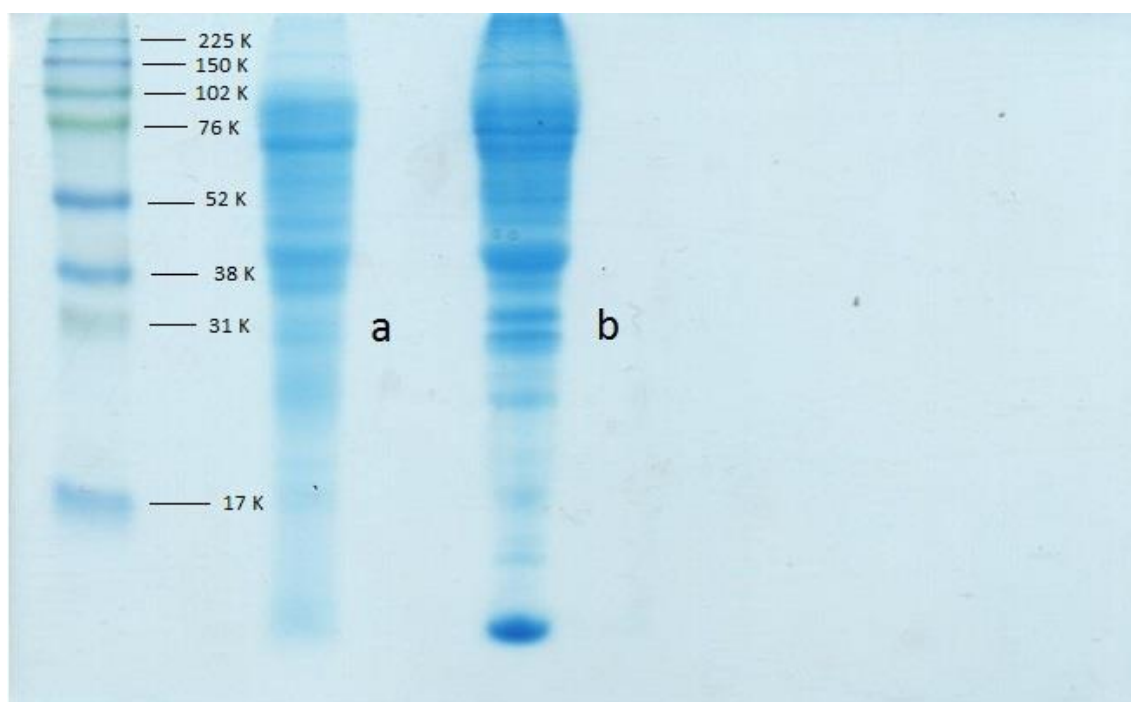
volumes que foram de 2 ou 5 mL. A fase móvel usada com esta coluna foi uma mistura de duas soluções, sendo uma delas (solução A) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e a outra (solução B) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + NaCl 0,5 M com um gradiente de 0 a 100% de solução B através de 200 volumes de coluna, monitorados a espectrofotometria de UV a 280 nm.

4. Resultados e discussão

4.1. Perfil de proteínas da peçonha e muco epidérmico de *S. plumieri* em SDS-PAGE

Na SDS-PAGE, as secreções de peçonha e muco apresentaram um perfil rico em proteínas, com bandas em comum entre as duas preparações e outras exclusivas de cada uma delas. A quantidade de proteína injetada nas canaletas foi de 18 µg de proteína para a peçonha e 22 µg de proteína para o muco epidérmico (figura 8).

Figura 7: SDS-PAGE de peçonha e muco epidérmico de *S. plumieri*



Fonte: autor

Notas: (a) peçonha e (b) muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*.

4.2. Purificação de proteínas e identificação das atividades vaso-peptidásicas de peçonha, muco epidérmico de *S. plumieri* e de suas frações cromatográficas

A capacidade de produção de cininas já havia sido estudada, a partir da capacidade da peçonha em degradar um substrato sintético (Pro-Phe-Arg-pNA) específico para a caliceína plasmática (Menezes et al., 2012). Porém, a capacidade de processar

vasopeptídeos não havia sido avaliada até então, quer seja na peçonha ou no muco epidérmico. Frente à Ang I, podemos verificar atividade conversora de Ang I em Ang II (figuras 9 e 10). Esta atividade conversora já foi verificada na peçonha de outro peixe, o *Thalassophryne nattereri* (Tenório et al., 2015). O produto principal formado é Ang II, que indica a presença de uma enzima processadora de angiotensina I, que pode ser de qualquer uma das 3 classes de enzimas capazes de converter Ang I em Ang II . ou seja, uma metalo-dipeptidil carboxipeptidases, da qual a ECA faz parte; uma serino-protease sensível à aprotinina, como a calicreína (Maruta e Arakawa, 1983) ou uma serino-proteases sensíveis à quimostatina, como a enzima geradora de Ang II quimostatina-sensível encontrada na artéria mesentérica de cães (Okunishi et al., 1987), a quimase humana (Urata, Healy et al., 1990; Urata, Kinoshita et al., 1990) e a enzima elastase-2 de ratos (Paula et al., 1998; Santos et al., 2002).

As atividades conversoras foram completamente inibidas por captopril e EDTA, tanto no muco quanto na peçonha de *S. plumieri* (figs 12 e 14). A peçonha e o muco não hidrolizaram os substratos cromogênicos para as serino-proteases e elastase II, N-succinil-AAPF-pNA e N-succinil-AAPL-pNA, respectivamente (não indicados), mostrando que não se encaixam nessa categoria de enzimas. Também se percebe a formação de Ang (1-7) tanto na peçonha quanto no muco de *S. plumieri* (figs 9 e 10), não inibidas por captopril e por EDTA (figs 11, 12, 13 e 14).

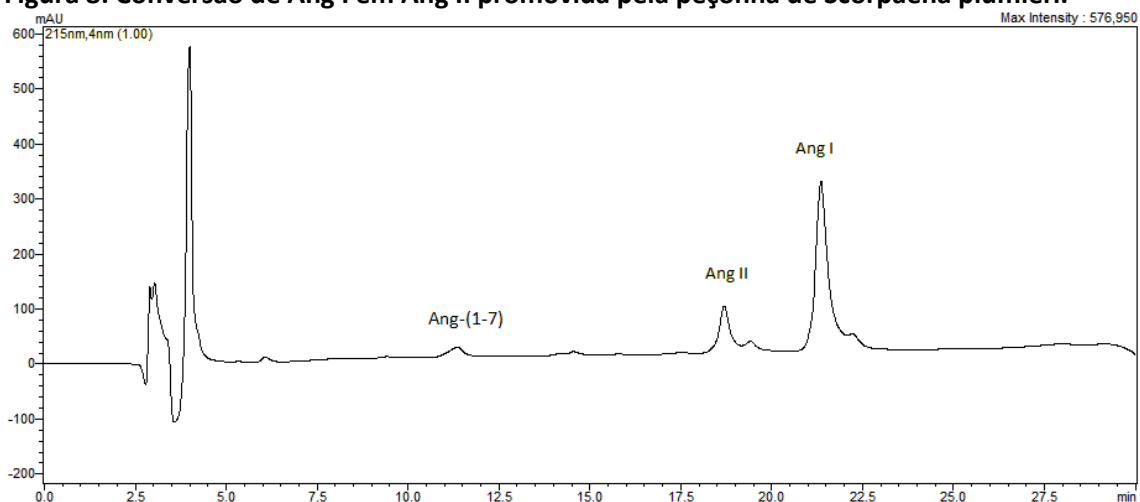
Considerando seu efeito sobre Ang II, a peçonha demonstrou a capacidade de formar Ang (1-7) (fig 15), enquanto que o muco não apresentou atividade (fig 16). EDTA (fig 18) e não captopril (fig 17) foi capaz de inibir a formação de Ang (1-7) a partir de Ang II pela peçonha, uma atividade carboxipeptidase; um padrão de formação de Ang (1-7) similar ao da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), ou seja, uma metalocarboxipeptidase sensível a EDTA mas não sensível a captopril (Donoghue et al., 2000).

No entanto, tanto EDTA quanto captopril foram incapazes de inibir a formação de Ang (1-7) tanto na peçonha (figs 11 e 13) quanto no muco epidérmico de *S. plumieri* (figs 12 e 14), indicando a existência de uma via que converte Ang I a Ang (1-7) diretamente e outra que converte Ang II em Ang (1-7), conduzidas por diferentes enzimas. Enzimas como a ECA2 (Rice et al., 2004), catepsina A (CATA) (Jackman et al., 2002), prolilcarboxipeptidase (PRCP) (Ody et al., 1978) e CPA-1 (Pereira et al., 2012) são

capazes de produzir Ang (1-7) diretamente de Ang II. A formação de Ang (1-7) a partir de Ang I poderia ser gerada pela ação direta de uma endopeptidase como a neprilisina (NEP) (Campbell et al., 1998), a “Thimet” oligopeptidase (TOP) (Chappell et al, 1994) e proliloligopeptidase (Welches et al., 1991), mas essas são metaloendopeptidases, e a atividade formadora de Ang (1-7) seria inibida pelo EDTA, o que não acontece.

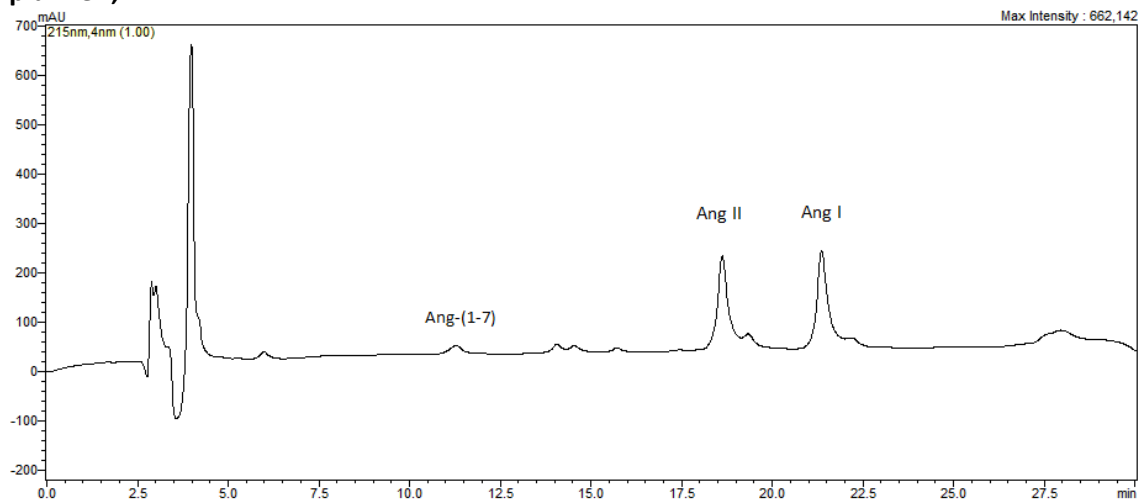
Peçonhas animais tem uma tendência de inibir a conversão de angiotensina (Ferreira et al., 1970; politi et al., 1985; Higuchi et al., 1999), mas as peçonhas de *t. nattereri* e *S. plumieri* mostraram o oposto: a presença de enzimas conversoras de angiotensina análogas à ECA. Enzimas como a Catepsina G (Rykl et al., 2006), a tonina (Garcia et al., 1981) quimase (Urata et al., 1990) e elastase II (Paula et al., 1998) também são capazes de converter Ang I a Ang II. No entanto, tanto a peçonha quanto o muco epidérmico de *S. plumieri* apresentaram conversão de Ang I em Ang II totalmente cancelada por captopril e EDTA, indicando a presença de uma enzima conversora como a ECA, uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de metal (Rice et al., 2004). A grande similaridade entre os padrões de degradação de vasopeptídeos Ang I e Ang II indica uma forte similaridade entre ambas as secreções. Devido à ausência de um aparato inoculador com ductos (Haddad et al., 2003), pensa-se que a peçonha dissemina-se pelo muco epidérmico.

Figura 8: Conversão de Ang I em Ang II promovida pela peçonha de *Scorpaena plumieri*.



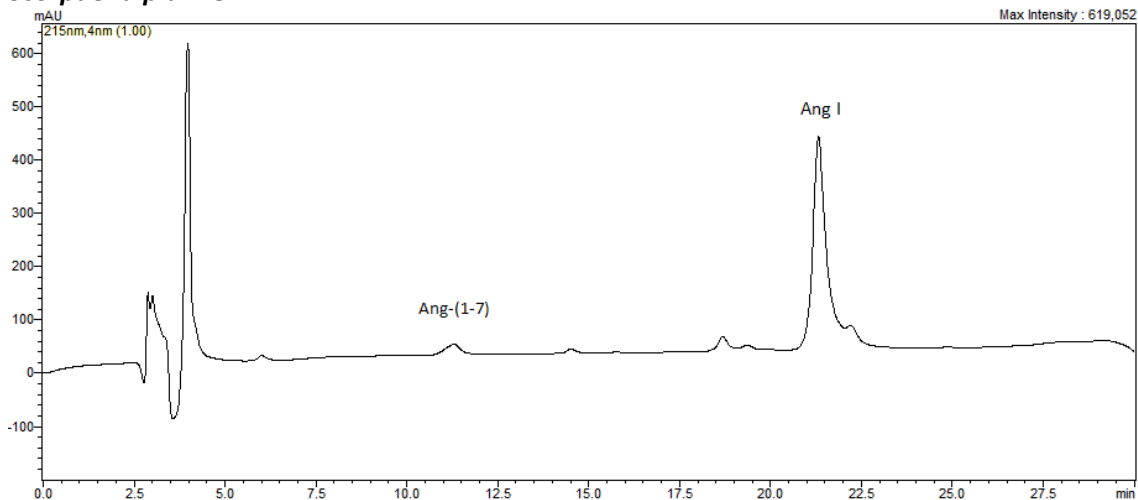
Fonte: autor

Figura 9: Conversão de Ang I em Ang II promovida pelo muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*,



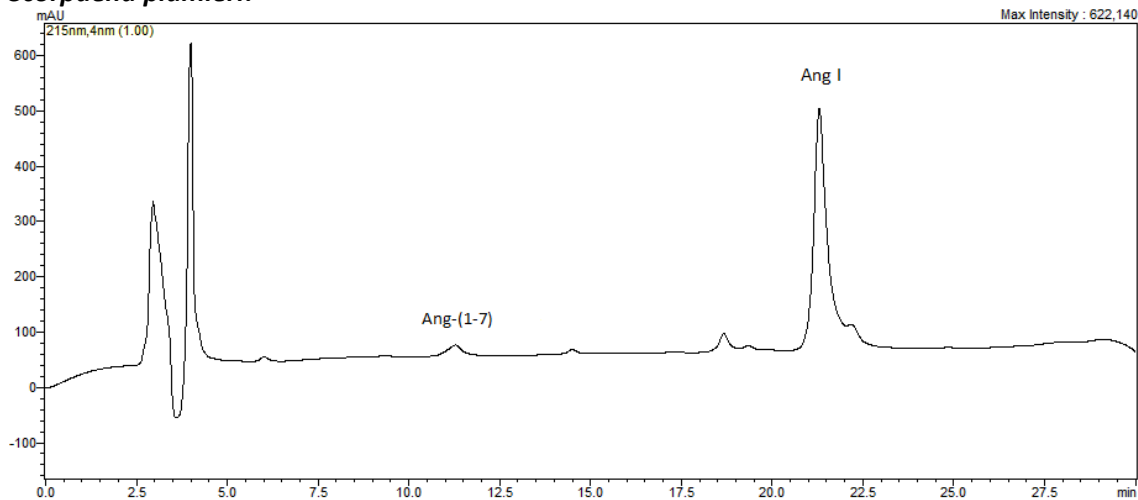
Fonte: Autor

Figura 10: Inibição provocada por captopril na conversão de Ang I para Ang II na peçonha de *Scorpaena plumieri*.



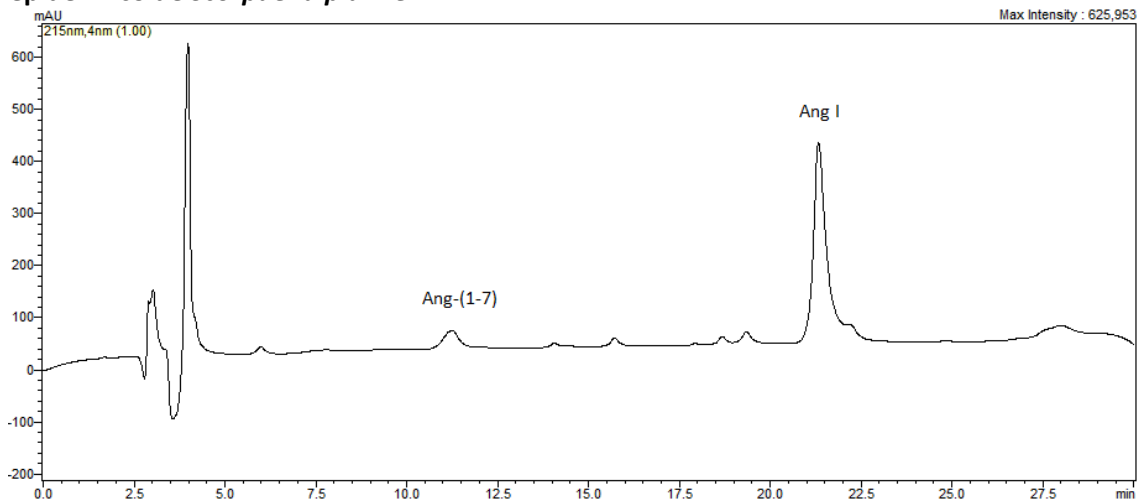
Fonte: Autor

Figura 11: Inibição provocada por EDTA na conversão de Ang I para Ang II na peçonha de *Scorpaena plumieri*.



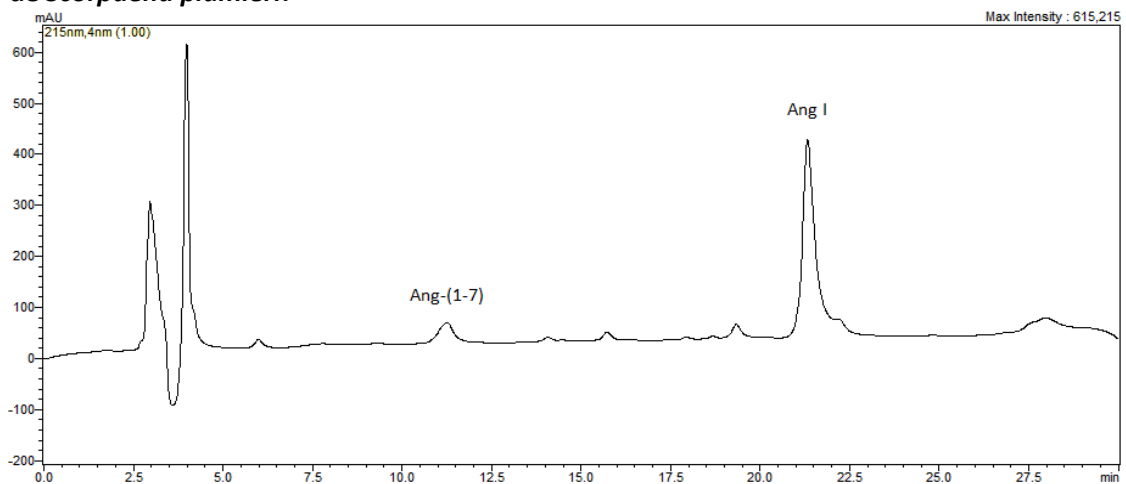
Fonte: Autor

Figura 12: Inibição provocada por captopril na conversão de Ang I para Ang II no muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*.



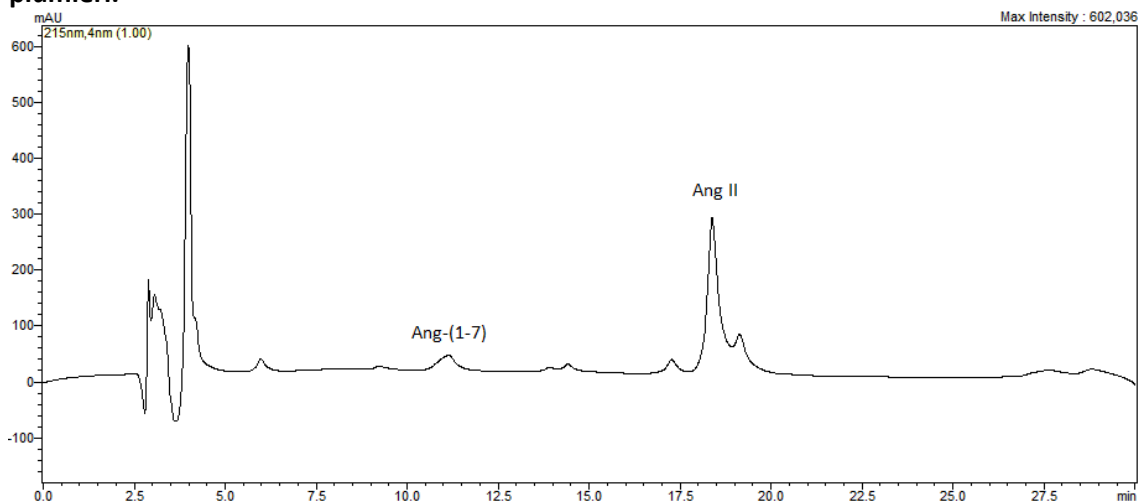
Fonte: Autor

Figura 13: Inibição provocada por EDTA na conversão de Ang I para Ang II no muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*.



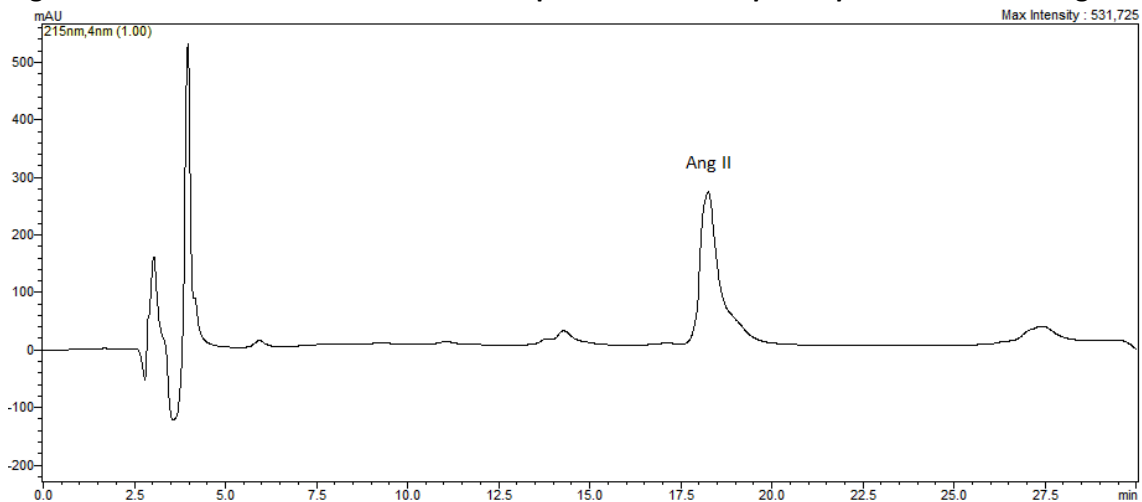
Fonte: Autor

Figura 14: Formação de Ang-(1-7) a partir de Ang II promovida pela peçonha de *Scorpaena plumieri*.



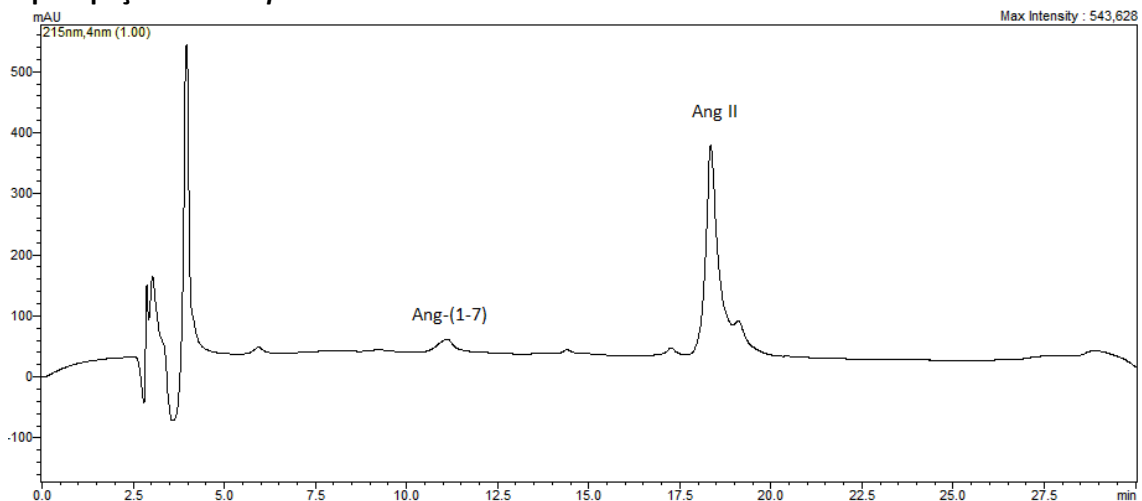
Fonte: Autor

Figura 15: Ausência de atividade do muco epidérmico de *Scorpaena plumieri* sobre a Ang II.



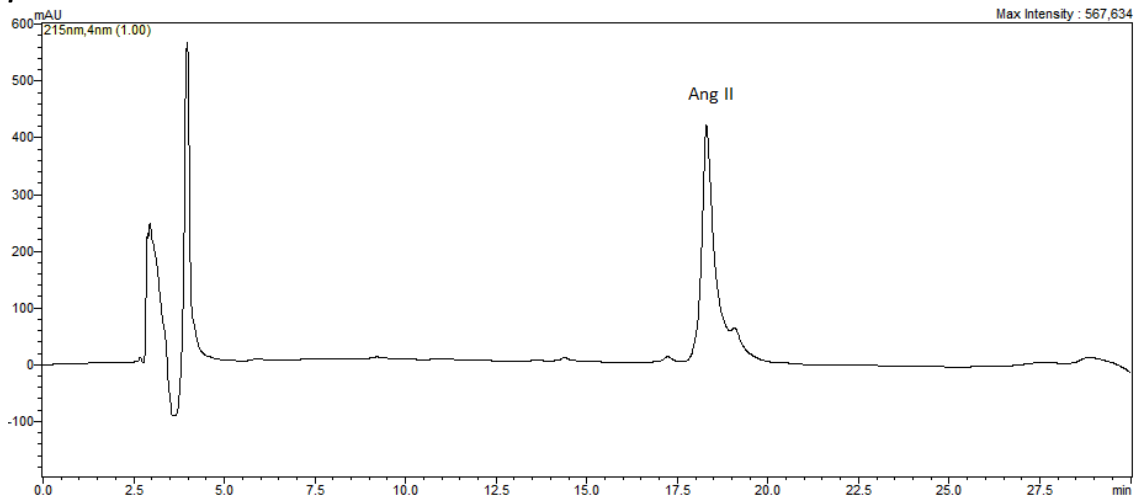
Fonte: Autor

Figura 16: Incapacidade do captopril de inibir a reação formadora da Ang-(1-7) a partir de Ang II pela peçonha do *S. plumieri*.



Fonte: Autor

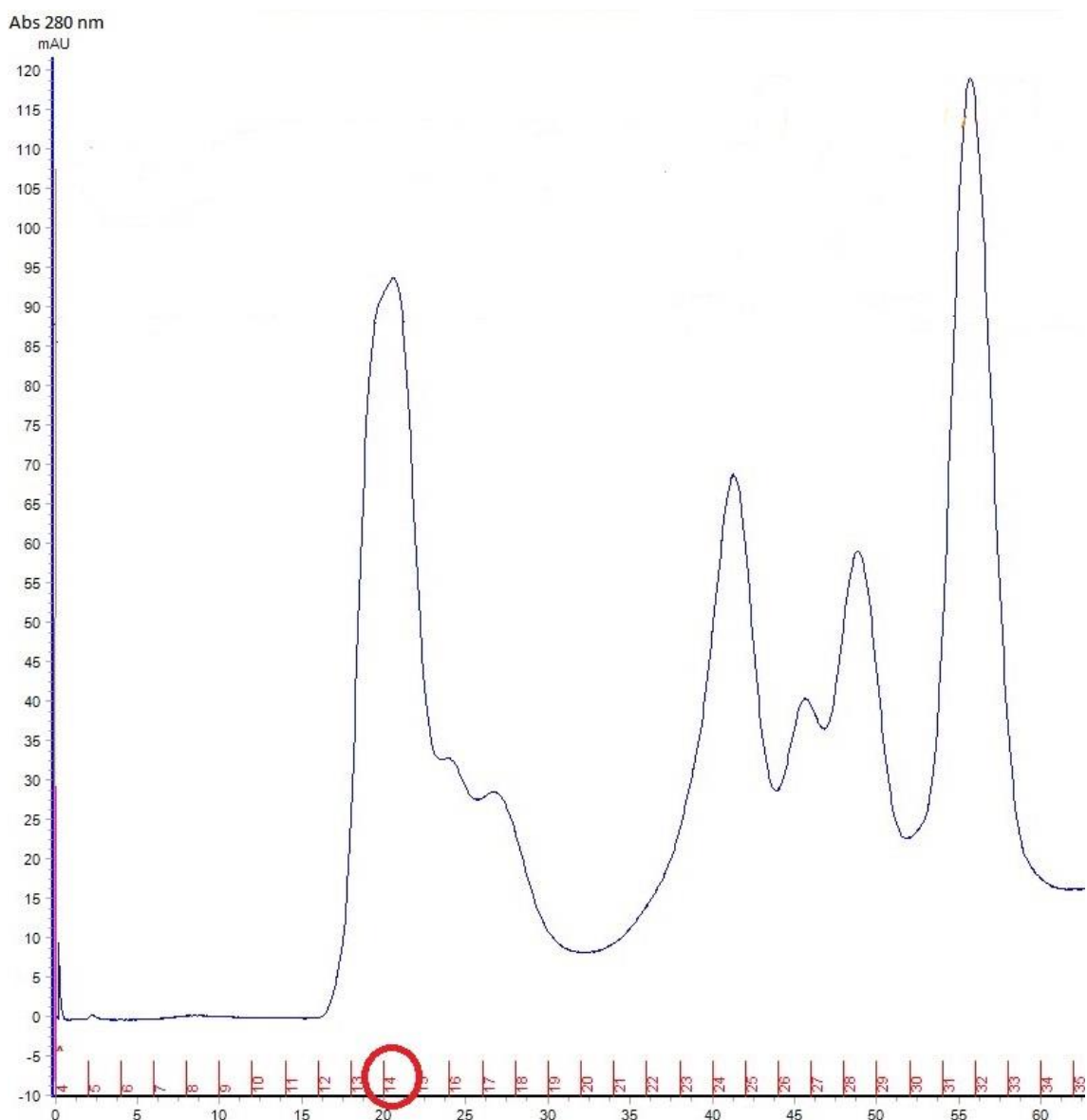
Figura 17: Inibição por EDTA da formação de Ang-(1-7) a partir de Ang II pela peçonha do *S. plumieri*.



Fonte: Autor

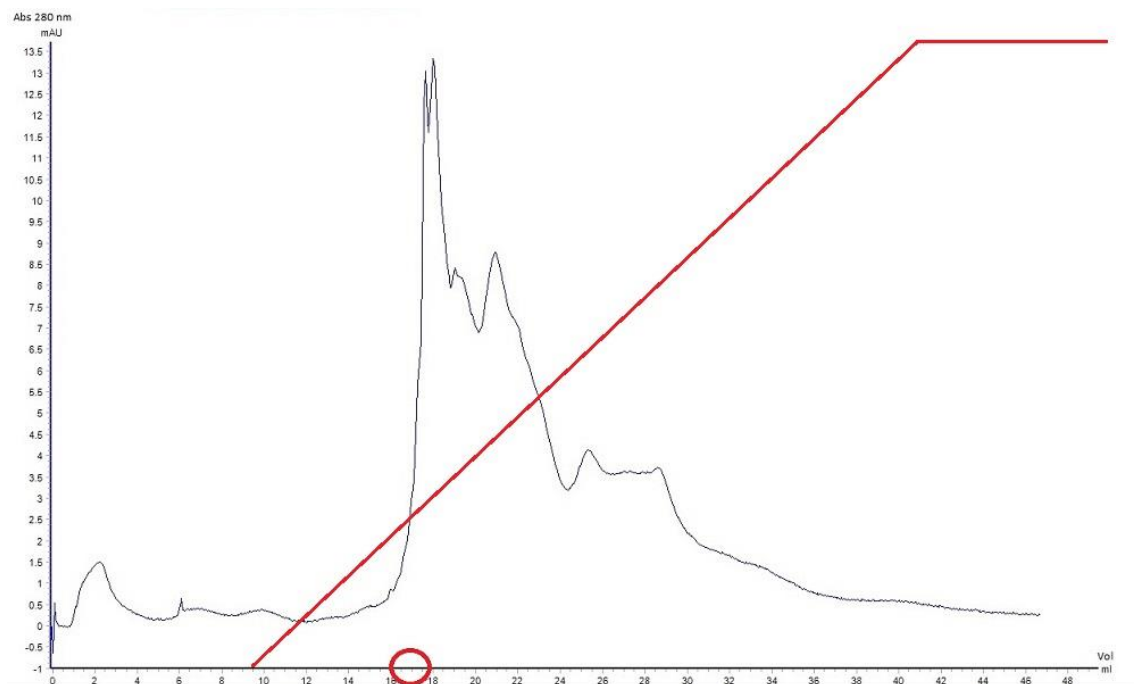
As frações foram testadas em reações enzimáticas com Ang I, que absorve no comprimento de onda de 215 nm. Pudemos observar que a fração mais ativa para a conversão de angiotensina I em angiotensina II foi a fração 14. A partir daí, a fração 14 foi submetida a cromatografia trocadora de ânions de alta resolução, e tivemos um perfil cromatográfico como mostra a fig. 20. A fração 16 foi capaz de converter fortemente a Ang I a Ang II, obtendo uma conversão total em 4 horas de reação.

Fig 18: Primeira etapa para a purificação da ECA do muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*



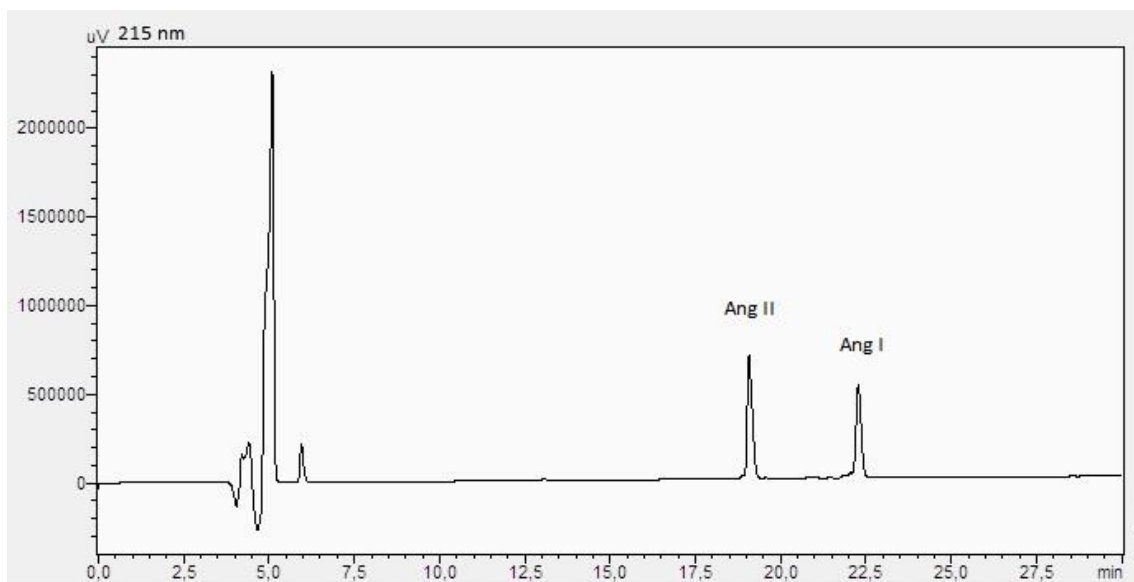
Fonte: Autor

Figura 19: Segunda etapa para a purificação da ECA do muco epidérmico de *Scorpaena plumieri*



Fonte: Autor

Figura 20: Conversão de Ang I em Ang II pela ECA do muco epidérmico do *Scorpaena Plumieri*.



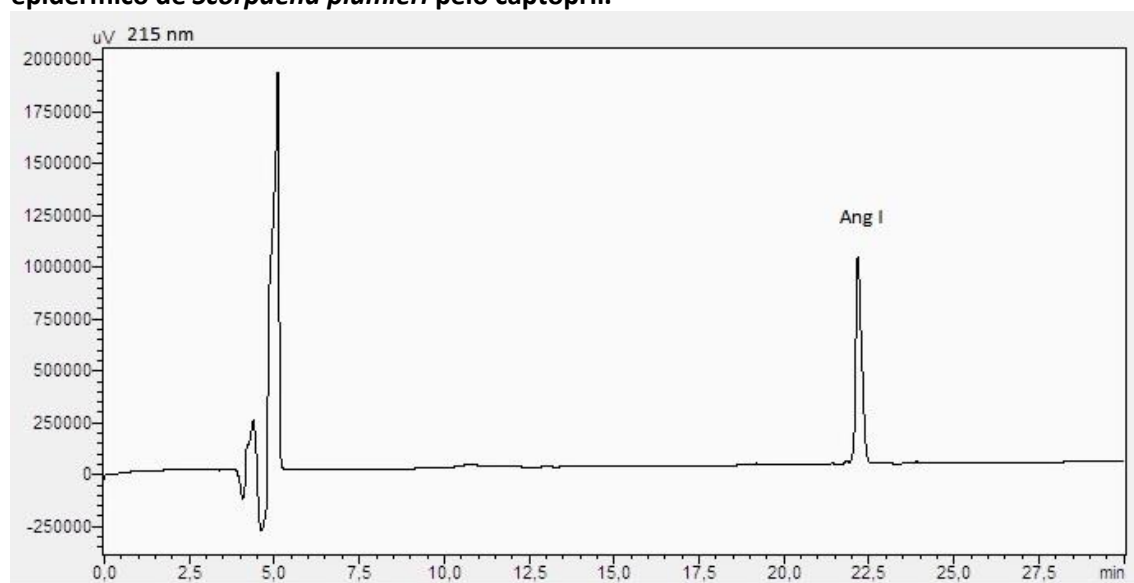
Fonte: Autor

A atividade conversora foi completamente bloqueada pelo inibidor de enzima conversora de angiotensina captopril (fig. 22) mas não pelo inibidor de serina-proteases fluoreto de sulfonil fenil-metano (PMSF, *phenylmethane sulfonyl fluoride*) (fig. 24). No

entanto, a reação de conversão foi inibida completamente por ácido etileno-diamino tetracético (EDTA), um sequestrador de metais (fig. 23). Os dados indicam que realmente trata-se de uma enzima conversora de angiotensina, pois está é uma metaloprotease e não uma serina-protease. Na eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), pudemos verificar que a proteína foi isolada, ao percebermos apenas uma banda no gel (fig. 25). De acordo com o padrão de massas moleculares, podemos ver que trata-se de uma proteína de aproximadamente 70 kilodaltons.

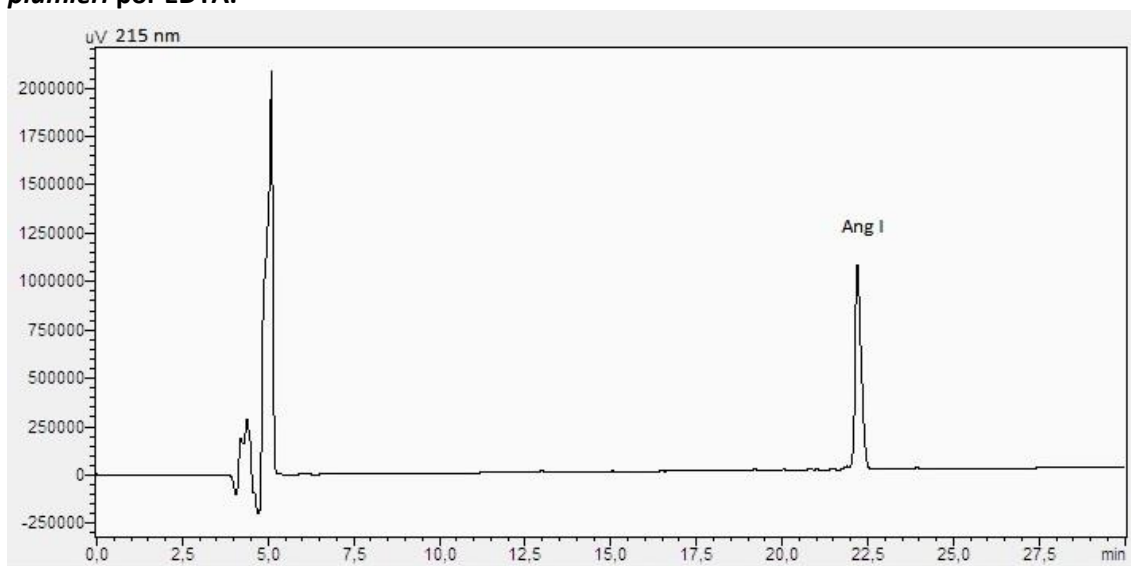
Como a glândula de peçonha não é bem definida, não possuindo um ducto que faz comunicação com um canal inoculatório nos espículos, sendo estes maciços, ao invés de ocos, como encontramos em outras espécies de peixes peçonhentos, como o *Thalassophryne nattereri*, seu conteúdo frequentemente escorre pela sua superfície corporal, principalmente quando o animal é capturado. Então, há a possibilidade de se tratar da mesma enzima. Entretanto, nosso grupo observou a propriedade, na peçonha de converter angiotensina II em angiotensina 1-7 na peçonha (Tenório et al., 2016), propriedade esta que não foi encontrada no muco epidérmico, abrindo a possibilidade que agentes presentes na peçonha não sejam encontrados no muco epidérmico.

Figura 21: Bloqueio da atividade de conversão de Ang I em Ang II da da ECA do muco epidérmico de *Scorpaena plumieri* pelo captopril.



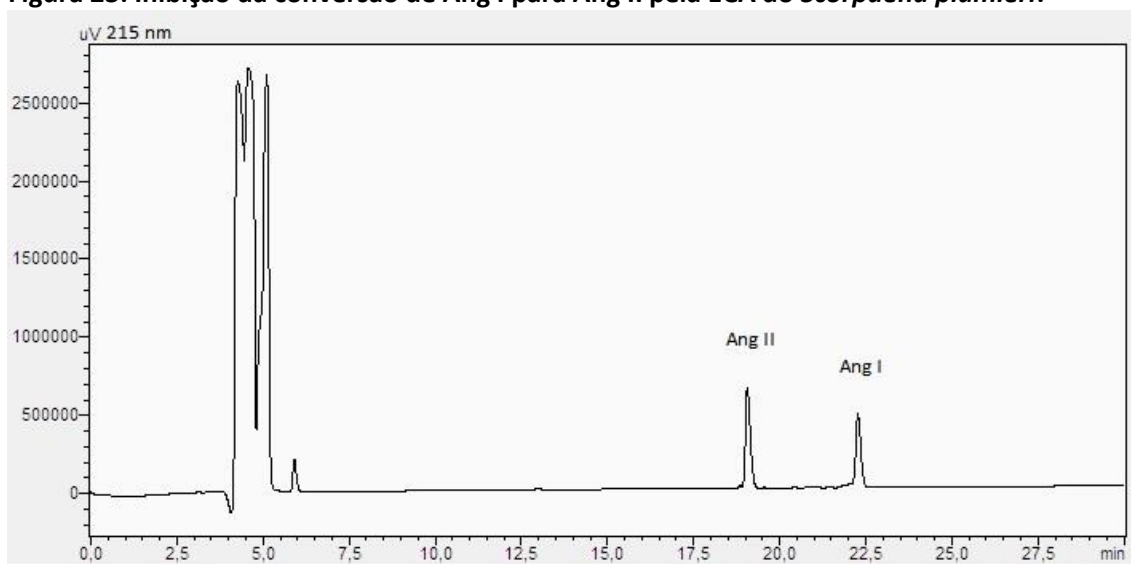
Fonte: Autor

Figura 22: Inibição da conversão de Ang I em Ang II pela ECA do muco epidérmico do *Scorpaena plumieri* por EDTA.



Fonte: Autor

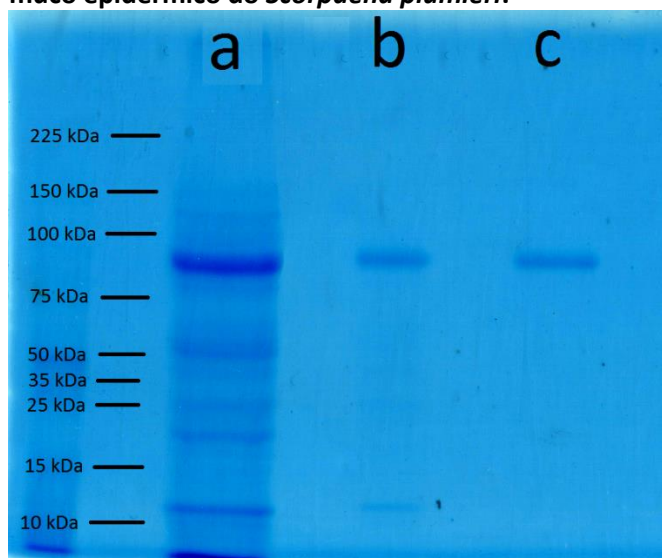
Figura 23: Inibição da conversão de Ang I para Ang II pela ECA do *Scorpaena plumieri*.



Fonte: Autor

A SDS-PAGE revelou que na fração 16 proveniente da Mono Q, testada com os inibidores, verifica-se a existência de uma única proteína (fig. 25)

Figura 24: SDS-PAGE das frações cromatográficas obtidas durante a purificação da ECA do muco epidérmico do *Scorpaena plumieri*.



Fonte: Autor

Notas: a) extrato bruto do muco epidérmico do *S. plumieri*; b) fração 14 proveniente de filtração em gel realizada com o extrato bruto; c) fração 16 proveniente da cromatografia trocadora de ânions de alta resolução realizada com a fração 14 proveniente da filtração em gel.

Estamos, no exato momento, aguardando o resultado da espectrometria de massas, que revelará a sequência primária da enzima conversora de angiotensina encontrada no muco epidérmico do *S. plumieri*.

5. Conclusão

Concluimos que tanto a peçonha quanto o muco do *S. plumieri* possuem atividades processadoras de angiotensinas e, mais especificamente, atividades conversoras de angiotensina.

Tanto a peçonha quanto o muco epidérmico de *S. plumieri* são capazes de processar os peptídeos Ang I e Ang II, que foi inibida por captopril e EDTA. O segundo produto mais abundante derivado de Ang I em ambas as preparações foi Ang (1-7), mas apenas a peçonha foi capaz de gerar Ang (1-7) a partir de Ang II, uma atividade carboxipeptidase. O EDTA foi capaz de inibir esta atividade carboxipeptidase, mas não o captopril, levando à conclusão de que uma enzima semelhante à ECA2 está presente na peçonha de *S. plumieri*.

A enzima conversora já purificada exibiu o comportamento esperado, sendo a conversão de Ang I a Ang II gerada por ela completamente inibida por captopril e EDTA, mas não por PMSE, indicando a atividade tipo ECA.

Referências

1. Ager EI¹, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1675-84.
2. Aldred, Brian; Lipscomb, Jack; Erickson, Timothy. Lionfish envenomations in an urban wilderness. *Wilderness and Environmental Medicine* 7(4):291-6 · December 1996.
3. Andrich F, Carnielli JB, Cassoli JS, Lautner RQ, Santos RA, Pimenta AM, de Lima ME, Figueiredo SG. A potent vasoactive cytolyisin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. *Toxicon*. 2010 Sep 15;56(4):487-96.
4. Andrich F, Richardson M, Naumann GB, Cordeiro MN, Santos AV, Santos DM, Oliveira JS, de Lima ME, Figueiredo SG. Identification of C-type isolectins in the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. *Toxicon*. 2015 Mar;95:67-71.
5. Amaya K¹, Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Takamura H, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Miwa K. Angiotensin II activates MAP kinase and NF-kappaB through angiotensin II type I receptor in human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2004 Oct;25(4):849-56.
6. Banegas, Inmaculada, Prieto, Isabel, Vives, Francisco, Alba, Francisco, de Gasparo, Marc, Bathon, J.M., Manning, D.C., Goldman, D.W., Towns, M.C., Proud, D., 1992 Jan. Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 (1), 384e392.

7. Banegas, Inmaculada; Prieto Isabel, Vives Francisco, Alba Francisco, Gasparo Marc de. 2006. *Renin Angiotensin Aldosterone System*. World Journal of Gastroenterology 7: 129-134.
8. Barnes JM¹, Barnes NM, Costall B, Coughlan J, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM, Williams TJ. Angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin, and cognition. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19 Suppl 6:S63-71.
9. Barnes JM¹, Barnes NM, Costall B, Horovitz ZP, Ironside JW, Naylor RJ, Williams TJ. Angiotensin II inhibits acetylcholine release from human temporal cortex: implications for cognition. *Brain Res*. 1990 Jan 22;507(2):341-3.
10. Basso N, Terragno NA (2001). History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 38 (6): 1246–9.
11. Basso N¹, Paglia N, Stella I, de Cavanagh EM, Ferder L, del Rosario Lores Arnaiz M, Inserra F. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul Pept*. 2005 Jun 30;128(3):247-52.
12. von Bohlen und Halbach O¹, Albrecht D. Angiotensin II inhibits long-term potentiation within the lateral nucleus of the amygdala through AT1 receptors. *Peptides*. 1998;19(6):1031-6.
13. Boletini-Santos D, Komegae EN, Figueiredo SG, Haddad Jr. V, Lopes-Ferreira M, Lima C., 2008. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. *Toxicon* 51, 585–596 pp.

14. Boucher R, Demassieux S, Garcia R, Genest J. Tonin, angiotensin II system. A review. *Circ Res.* 1977 Oct;41(4 Suppl 2):26-9.
15. Boylan, d. b. and Scheuer, P. J. (1967) Pahutoxin: a fish poison. *Science* 155,52.
16. Bradford, Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
17. Braszko JJ¹, Walesiuk A, Wielgat P. Cognitive effects attributed to angiotensin II may result from its conversion to angiotensin IV. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006 Sep;7(3):168-74.
18. Burnett, J.W., 1998. Aquatic adversaries: stonefish. *Cutis* 62 (6), 269–270.
19. Campbell DJ, Anastasopoulos F, Duncan AM, James GM, Kladis A, Briscoe TA. Effects of neutral endopeptidase inhibition and combined angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition on angiotensin and bradykinin peptides in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287:567–577.
20. Carrijo LC, Andrich F, de Lima ME, Cordeiro MN, Richardson M, Figueiredo SG. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon.* 2005 Jun 1;45(7):843-50. Epub 2005 Apr 21.
21. Carvalho-Filho, A., 1999. Peixes: Costa Brasileira (Fishes: Brazilian Coast). Melro, São Paulo, SP, 92–94 pp.
22. Chai SY¹, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Nov;61(21):2728-37.

23. Chan, T.Y.K., Tam, L.S., Chan, L.Y., 1996. Stonefish sting: an occupational hazard in Hong Kong. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90 (6), 675–676.
24. Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM Conversion of angiotensin I to angiotensin-(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Med Biol* 1994; 5:129–137.
25. Church, Jarrod E., Wayne C. Hodgson. The pharmacological activity of fish venoms (Review). *Toxicon* 40 (2002) 1083–1093.
26. Conceição K¹, Konno K, de Melo RL, Antoniazzi MM, Jared C, Sciani JM, Conceição IM, Prezoto BC, de Camargo AC, Pimenta DC. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*. 2007 Mar;28(3):515-23. Epub 2006 Nov 13.
27. De Paepe B¹, Verstraeten VL, De Potter CR, Vakaet LA, Bullock GR. Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol.* 2001 Sep;116(3):247-54.
28. Deshayes F¹, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Sep;16(7):293-9.
29. Doi C¹, Egashira N, Kawabata A, Maurya DK, Ohta N, Uppalapati D, Ayuzawa R, Pickel L, Isayama Y, Troyer D, Takekoshi S, Tamura M. Angiotensin II type 2 receptor signaling significantly attenuates growth of murine pancreatic carcinoma grafts in syngeneic mice. *BMC Cancer.* 2010 Feb 24;10:67.

30. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*. 2000;87:e1-e9.
31. Ebran N, Julien S, Orange N, Saglio P, Lemaître C, Molle G. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1999 Feb;122(2):181-9.
32. Egami K¹, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):67-75.
33. Ellul J¹, Archer N, Foy CM, Poppe M, Boothby H, Nicholas H, Brown RG, Lovestone S. The effects of commonly prescribed drugs in patients with Alzheimer's disease on the rate of deterioration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Mar;78(3):233-9. Epub 2006 Sep 29.
34. Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*. 2001 Oct-Dec;25(8-9):827-39.
35. Ferreira, S.H., Bartelt, C.D., Greene, L.J. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom *Biochemistry*, 9 (1970), pp. 2583–2593.
36. Evangelista KS, Andrich F, Figueiredo de Rezende F, Niland S, Cordeiro MN, Horlacher T, et al. Plumieribetin, a fish lectin homologous to mannose-binding B-type lectins, inhibits the collagen-binding alpha1beta1 integrin. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34747–9.

37. Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil (Handbook of Marine Fishes of Southeast of Brazil). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 14–18 pp.
38. Fujimoto Y¹, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. FEBS Lett. 2001 Apr 27;495(3):197-200.
39. Fujita M¹, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. Carcinogenesis. 2005 Feb;26(2):271-9. Epub 2005 Jan 6.
40. Fujita M¹, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jun 7;294(2):441-7.
41. Garcia, R., Schiffrin, E.L., Thibault, G., Genest, J., 1981. Effects of tonin, an angiotensin II-forming enzyme, on vascular smooth muscle in the normal rabbit. Hypertension 3, 1101.
42. Garyfallou, G.T., Madden, J.F., 1996. Lionfish envenomation. Ann. Emergency Med. 28 (4), 456–457.
43. George, Ameer J. ; Walter G. Thomas and Ross D. Hannan. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks Ameer J. Nature Reviews | Cancer Volume 10 745-759 | November 2010 |

44. Gomes CL¹, Konno K, Conceição IM, Ianzer D, Yamanoue N, Prezoto BC, Assakura MT, Rádis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Camargo AC, Hayashi MA. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem Pharmacol.* 2007 Nov 1;74(9):1350-60. Epub 2007 Jul 17.
45. Gomes HL, Andrich F, Fortes-Dias CL, Perales J, Teixeira-Ferreira A, Vassallo DV, Cruz JS, Figueiredo SG. Molecular and biochemical characterization of a cytolysin from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. *Toxicon.* 2013 Nov;74:92-100.
46. Gomes HL, Andrich F, Mauad H, Sampaio KN, De Lima ME, Figueiredo SG, Moysés MR. 2010. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon* 55, 580–589 pp.
47. Gomes HL¹, Menezes TN¹, Malacarne PF¹, Roman-Campos D², Gondim AN³, Cruz JS⁴, Vassallo DV¹, Figueiredo SG⁵. Cardiovascular effects of Sp-CTX, a cytolysin from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. *Toxicon.* 2016 Aug;118:141-8.
48. Green, K.C.B., 1966. The Stonefish, Sea Frontiers, International Oceanographic Foundation, Washington, pp. 369–377.
49. Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone, P., Yuen, R., Khoo, H.E., Low, K.S.Y., 1994. A review of stonefish venoms and toxins. *Toxicon* 64, 509–528.
50. Haddad Jr., V., 2000. Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento. São Paulo, SP, 37-40 pp.

51. Haddad Jr., Vidal, Martins IA, Makyama HM, 2003. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 42, 79–83 pp.
52. Haddad Jr V, Neto DG, de Paula Neto JB, de Luna Marques FP, Barbaro KC. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*. 2004;43(3):287–94.
53. Hadley, Debbie. "What is the Difference Between Venomous and Poisonous?" ThoughtCo, Feb. 23, 2017, [thoughtco.com/venomous-vs-poisonous-1968412](https://www.thoughtco.com/venomous-vs-poisonous-1968412).
54. Hajjar I¹, Keown M, Frost B. Antihypertensive agents for aging patients who are at risk for cognitive dysfunction. *Curr Hypertens Rep*. 2005 Dec;7(6):466-73.
55. Halstead, B.W., 1951. Injurious effects from the sting of the scorpionfish *Scorpaena guttata* with report of a case. *California Med*. 74 (5), 395–396.
56. Halstead, B. W. (1967) *Poisonous and Venomous marine Animals of the World*, Vol. 2. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.
57. Halstead, B.W., 1995. *Dangerous Marine Animals*, Cornell Maritime Press, Maryland, pp. 132–145.
58. Hanahan D¹, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
59. Hashimoto, Y., Shiomi, K. and Aida, K. (1974) Occurrence of a skin toxin in coral-gobies *Gobiodon* spp. *Toxicon* 12, 523.

60. Higuchi, S., Murayama, N., Saguchi, K., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C., Ogawa, T., Deshimaru, M., Ohno, M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. *Immunopharmacology*, 15 (44) (1999), pp. 129–135.
61. Imai N¹, Hashimoto T, Kihara M, Yoshida S, Kawana I, Yazawa T, Kitamura H, Umemura S. Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Lab Invest*. 2007 Feb;87(2):189-98. Epub 2006 Dec 18.
62. Itabashi H¹, Maesawa C, Oikawa H, Kotani K, Sakurai E, Kato K, Komatsu H, Nitta H, Kawamura H, Wakabayashi G, Masuda T. Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol Res*. 2008 Jun;38(6):601-13.
63. Jackman, H.L., Massad, M.G., Sekosan, M., Tan, N.F., Brovokovych, V., Marcic, B.M., Eerdos, E.G., 2002. Angiotensin 1e9 and 1e7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension* 39, 976-981.
64. Jiang T¹, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. Suppressing inflammation by inhibiting the NF-κB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*. 2012 Dec;167(7):1520-32.
65. Khachaturian AS¹, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Arch Neurol*. 2006 May;63(5):686-92. Epub 2006 Mar 13.

66. Kinoshita J¹, Fushida S, Harada S, Yagi Y, Fujita H, Kinami S, Ninomiya I, Fujimura T, Kayahara M, Yashiro M, Hirakawa K, Ohta T. Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin. *Int J Oncol.* 2009 Jun;34(6):1573-82.
67. Kizer, K.W., McKinney, H.E., Auerbach, P.S., 1985. Scorpaenidae envenomation: a five year Poison Center experience. *JAMA* 253 (6), 807–810.
68. Kuoppala, Antti, Lindstedt, Ken a., Saarinen, Juhani, Kovanen, petri t., Kokkonen, Jorma o., 2000. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1069-H1074.
69. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
70. Lemaître C, Orange N, Saglio P, Saint N, Gagnon J, Molle G. Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *Eur J Biochem.* 1996 Aug 15;240(1):143-9.
71. Lieske, E. and R. Myers, 1994. Collins Pocket Guide. Coral reef fishes. Indo-Pacific & Caribbean including the Red Sea. Haper Collins Publishers, 400 p.
72. Ligouri, v. r., Ruggieri, g. d., Baslow, m. h., Stempien, m. f. and Nigrelli, r. f. (1963) Antibioiic and toxic activity of the mucous of the Pacific golden striped bass *Gwmistrs sexiincatt!s*. *Am. Zool.* 3, 546.
73. Lopes-Ferreira, M., Emim, J.A.S., Oliveira, V., Puzer, L., Cezari, M.H., da Silva Araújo, Mariana, Juliano, Luiz, Lapa, Ant[^]onio Jos_e, Souccar, Caden, Moura-

- da- Silva, Ana Maria, 2004. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2151-2157.
74. Paul, martin; Mehr, Ali poyan and Kreutz, Reinhold. *Physiology of Local ReninÁngiotensin Systems.* *Physiol Rev* 86: 747-803, 2006
75. Mehta PK¹, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C82-97. Epub 2006 Jul 26.
76. Menezes TN, Carnielli JB, Gomes HL, Pereira FE, Lemos EM, Bissoli NS, et al. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon.* 2012;60(1):4–11.
77. Mogi M¹, Horiuchi M. Effects of angiotensin II receptor blockers on dementia. *Hypertens Res.* 2009 Sep;32(9):738-40.
78. Lopes-Ferreira, Mônica; Moura-da-Silva, Ana Maria; Piran-Soares, Ana Amélia; Farsky, Sandra H.P.; Lomonte, Bruno; Angulo, Yamileth; Gutierrez, José Maria; 2002. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium mediated blood flow impairment. *Toxicon* 40, 1.141-1.147.
79. Maruta H, Arakawa K. Confirmation of direct angiotensin formation by kallikrein. *Biochem J.* 1983 Jul 1;213(1):193-200.
80. Maul B¹, von Bohlen und Halbach O, Becker A, Sterner-Kock A, Voigt JP, Siems WE, Grecksch G, Walther T. Impaired spatial memory and altered dendritic spine morphology in angiotensin II type 2 receptor-deficient mice. *J Mol Med (Berl).* 2008 May;86(5):563-71.

81. Menezes T.N., Carnielli J.B.T., Gomes H.L., Pereira F.E.L., Lemos E.M., Bissoli N.S., Lopes-Ferreira M., Andrich F., Figueiredo S.G., 2012. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon* 60, 4–11 pp.
82. Miyajima A¹, Kosaka T, Asano T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4176-9.
83. Monteiro-Neto, C., F.E.A. Cunha, M.C. Nottingham, M.E. Araújo, I.L. Rosa and G.M.L. Barros, 2003. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, northeast Brazil. *Biodivers. Conserv.* 12:1287-1295.
84. Moyle, P.B., Cech, J.J. Jr., 1996. *Fishes: an Introduction to Ichthyology*, third ed, Prentice Hall, United States of America, pp. 308–309.
85. Nagata, S., Kato, J., Sasaki, K., Minamino, N., Eto, T., Kitamura, K., 2006. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin angiotensin system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 1026e1031.
86. Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the World*, Wiley, New York, pp. 308–327.
87. Das Neves, RRS; Tenório, HdA; Pereira, HJV. Epidemiological Profile of Accidents Involving *Thalassphryne nattereri* in Alagoas. *J Clin Toxicol* 2018, 8:1
88. Ng TB, Fai Cheung RC, Wing Ng CC, Fang EF, Wong JH. A review of fish lectins. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(4):337-51.

89. Ody, C.E., Marinkovic, D.V., Hammon, K.J., Stewart, T.A., Erdos, E.G., 1978. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. *J. Biol. Chem.* 253, 5927-5931.
90. Ohta T¹, Amaya K, Yi S, Kitagawa H, Kayahara M, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Miwa K. Angiotensin converting enzyme-independent, local angiotensin II-generation in human pancreatic ductal cancer tissues. *Int J Oncol.* 2003 Sep;23(3):593-8.
91. Okunishi H¹, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Dec 31;149(3):1186-92.
92. Patel, M.R., Wells, S., 1993. Lionfish envenomation of the hand. *J. Hand Surg.* 18A, 523–525.
93. Paula, C.A., Sousa, M.V., Salgado, C.O.M., Oliveira, E.B., 1998. Purification and substrate specificity of na angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 227-238.
94. Pereira HJ, Souza LL, Costa-Neto CM, Salgado MC, Oliveira EB. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. *Peptides.* 2012 Jan;33(1):67-76.
95. Politi, V., De Luca, G., Di Stazio, G., Schinina, E., Bossa, F. A new peptide from *Crotalus atrox* snake venom. *Pept. Suppl.*, 3 (1985), pp. 343–346.
96. Rhodes DR¹, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Kalyana-Sundaram S, Lonigro RJ, Helgeson BE, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Hayes DF, Lucas PC, Varambally S, Chinnaiyan AM. AGTR1 overexpression

defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 23;106(25):10284-9.

97. Rice, Gillian I., Thomas, Daniel A., Grant, Peter J., Turner, Anthony J., Hooper, Nigel M., 2004 October 1. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J*. 383 (Pt 1), 45-51.
98. Rigat B¹, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990 Oct;86(4):1343-6.
99. ROCHA E SILVA M, BERALDO WT, ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949 Feb;156(2):261-73.
100. Roche, E.T., Halstead, B.W., 1972. *Fish Bulletin of the Department of fish and game of State of California*, 156, pp. 1-49.
101. Röcken C¹, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, Krüger S, Malfertheiner P, Roessner A, Ebert MP. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2526-30.
102. Röcken C¹, Röhl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, Ebert MP. The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun;16(6):1206-12.

103. Rhodes DR¹, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Kalyana-Sundaram S, Lonigro RJ, Helgeson BE, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Hayes DF, Lucas PC, Varambally S, Chinnaiyan AM. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 23;106(25):10284-9.
104. Rykl, J., Thiemann, J., Kurzawski, S., Pohl, T., Gobom, J., Zidek, W., Schlüter, H., 2006 Sep. Renal cathepsin G and angiotensin II generation. *J. Hypertens*. 24 (9), 1797-1807.
105. Saavedra JM¹. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 Jun;25(3-4):485-512.
106. Saavedra JM¹, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A, Macova M. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept*. 2005 Jun 30;128(3):227-38.
107. Santos CF¹, Greene AS, Salgado MC, Oliveira EB. Conversion of renin substrate tetradecapeptide to angiotensin II by rat MAB elastase-2. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004 Nov;82(11):1000-5.
108. Santos CF¹, Paula CA, Salgado MC, Oliveira EB. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002 Jan;80(1):42-7.

109. Saunders, P.R., Taylor, P.B., 1959. Venom of the lionfish *Pterois volitans*. *Am. J. Physiol.* 197, 437–440.
110. Schaeffer Jr. R.C., Carlson, R.W., Russel, F.E., 1971. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon* 9 (1), 69–78.
111. Shah K¹, Qureshi SU, Johnson M, Parikh N, Schulz PE, Kunik ME. Does use of antihypertensive drugs affect the incidence or progression of dementia? A systematic review. *Am J Geriatr Pharmacother.* 2009 Oct;7(5):250-61. doi: 10.1016/j.amjopharm.2009.11.001.
112. Skeggs SLT, Kahn JR, Shumway NP: The preparation and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Exp Med* 1956, 103:295-299.
113. Smith VJ, Fernandes JM, Jones SJ, Kemp GD, Tatner MF. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 2000 Apr;10(3):243-60.
114. Smith GR¹, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm (Lond).* 2004 Sep 30;1(1):3.
115. Sosa-Rosales JI, Piran-Soares AA, Farsky SH, Takehara HA, Lima C, Lopes-Ferreira M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon.* 2005;45(2):155–61.
116. Tenório Hde A, Marques ME, Machado SS, Pereira HJ. Angiotensin processing activities in the venom of *Thalassophryne nattereri*. *Toxicon.* 2015 May;98:49-53. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.02.009. Epub 2015 Feb 19.

117. Tiret L¹, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet.* 1992 Jul;51(1):197-205.
118. Trestail, J.H., Al-Mahasneh, Q.M., 1989. Lionfish sting experiences of an Inland Poison Center: a retrospective study of 23 cases. *Vet. Hum. Toxicol.* 31 (2), 173–175.
119. Tsutsumi K¹, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol.* 1991 Jul;261(1 Pt 2):R209-16.
120. Uemura H¹, Hasumi H, Ishiguro H, Teranishi J, Miyoshi Y, Kubota Y. Renin-angiotensin system is an important factor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 2006 Jun 1;66(8):822-30.
121. Urata H¹, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res.* 1990 Apr;66(4):883-90.
122. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem.* 1990 Dec 25;265(36):22348-57.
123. Utkin YN¹. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J Biol Chem.* 2015 May 26;6(2):28-33.
124. Verano-Braga T¹, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, de Lima ME, Santos RA, Pimenta AM. *Tityus serrulatus*

- Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jul 4;371(3):515-20. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.104. Epub 2008 Apr 28.
125. Wasserman, G.S., Johnston, R.M., 1979. Poisoning from a lionfish sting. *Vet. Hum. Toxicol.* 21, 344–345.
126. Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens* 1991; 9:631–638.
127. Williamson, J.A., Fenner, P.J., Burnett, J.W., 1996. *Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook*, University of New South Wales Press, Sydney, pp. 375–386.
128. Wright JW¹, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Sep 30;25(1):96-124.
129. Wright JW¹, Harding JW. The brain RAS and Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2010 Jun;223(2):326-33.
130. Wright JW¹, Kawas LH², Harding JW². The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Neurobiol.* 2015 Feb;125:26-46.
131. Wright JW¹, Kramár EA, Meighan SE, Harding JW. Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides.* 2002 Jan;23(1):221-46.

132. Yuri N Utkin. Animal venom studies: Current benefits and future Developments *World J Biol Chem* 2015 May 26; 6(2): 28-33