

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

HUMBERTO DE ARAÚJO TENÓRIO

**ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DA PEÇONHA E DO MUCO TEGUMENTAR DO
*THALASSOPHRYNE NATTERERI***

MACEIÓ

2014

HUMBERTO DE ARAÚJO TENÓRIO

ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DA PEÇONHA E DO MUCO TEGUMENTAR DO
THALASSOPHRYNE NATTERERI

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em biotecnologia, no curso de pós graduação de Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira
Pereira

MACEIÓ

2014

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

T312a Tenório, Humberto de Araújo.
Atividades proteolíticas da peçonha e do muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri* / Humberto de Araújo Tenório. – 2014.
45 f. : il.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 40-45.

1. Enzima conversora de angiotensina. 2. Colagenase. 3. Angiotensinase.
4. Vasopeptídeos. 5. Cininases. 6. Bradicinina. 7. *Thalassophryne nattereri*.
I. Título.

CDU: 577.15/.152



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da defesa de Dissertação do Mestrando Humberto de Araújo Tenório, intitulada: "Atividades Proteolíticas da Peçonha e do Muco Tegumentar do *Thalassophryne nattereri*", realizada no dia 14 de março de 2014, às 09:00 horas, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.º Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
Orientador - PPGQB/IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Ana Catarina Rezende Leite
PPGQB/IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Sônia Salgueiro Machado
IQB/UFAL

Dedico este trabalho à minha avó, Maria das
Dores Araújo (*In Memoriam*), que sempre levarei
nas minhas lembranças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, que puderam fazer isso possível, devido ao apoio, compreensão e deposição de confiança.

A todos os professores que participaram de minha formação, desde as primeiras etapas, que na verdade são as mais importantes na formação de um indivíduo, pois são elas que construirão o sustentáculo sobre o qual será construído todo o resto.

Ao Professor Hugo Pereira, meu orientador, pela confiança depositada e pela capacidade de compreender as dificuldades em vários momentos e pelo compromisso da orientação.

Ao Professores Euzébio Goulart, Mário Meneghetti e Simone Meneghetti, por cederem seus laboratórios para realização de experimentos.

À Professora Marília Goulart, também por ceder seu laboratório para experimentos.

À Professora Janaína Bortoluzzi, pela sua solicitude e valiosas orientações.

À Professora Sônia Salgueiro, por todas as orientações, importantes no desempenho de minhas atividades.

À Professora Edma de Miranda, pelas significativas orientações tanto no campo profissional como pessoal.

Ao Professor Vitor Lima, pelo apoio e por me apresentar diferentes perspectivas, que puderam enriquecer meu conhecimento.

Ao Professor Edson Bento, pelo apoio que já vem sendo dado de longa data, desde que eu apenas me aventurava pelos corredores do IQB, como um aluno ansioso por aprender Química (e Bioquímica).

Ao Professor Carlos Guilherme Gaelzer (Faculdade de Medicina), por todo o seu apoio, conselhos e amizade, desde os tempos na Faculdade de Medicina.

Ao professor Frede de Oliveira (Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química) pelas inúmeras orientações e amizade.

À Professora Tatiane Balliano e ao Professor Mariano Pereira, pela orientação e acolhimento durante o semestre que passei como estagiário em seu laboratório.

À Professora Maria Tereza (Instituto de Física), pelo acolhimento e apoio nas minhas visitas ao Instituto de Física.

Aos Professores Marcelo Lyra (Instituto de Física) e Vinicius Manzoni (Instituto de Física), pelo apoio e ensinamentos durante minhas visitas ao seu laboratório.

Aos professores Adriano Aguiar (Instituto de Matemática, IM), Caio Faustino (IM), Dimas Martinez (IM), Euzébio Goulart e ao Prof. Nivaldo Alves, assim como também ao Prof. Edson Bento, por terem permitido que eu assistisse aulas como ouvinte quando ainda era estudante de Medicina.

À Professora Ana Catarina Rezende, pelo apoio e por compor a Banca Examinadora.

Ao Sr. Aldir, pela grande solicitude.

Aos amigos e companheiros de laboratório Fátima Lúcia dos Santos e Adeildo Junior, por todas as ajudas que me prestaram com gentileza e alegria.

À Nayara, minha namorada, e agora tomo emprestada a semântica inglesa para chamá-la de “garota amiga”, pois essa expressão pode explicar muita coisa com poucas palavras.

A todos os amigos que, em vários momentos pararam para uma conversa, que reforçaria a vontade de fazer o melhor, mesmo diante de várias dificuldades.

Um agradecimento especial a minha Avó Maria das Dores Araújo (*In Memoriam*), que não está mais entre nós, por me mostrar, mesmo através do silêncio do seu sofrimento, lições que levarei por toda a vida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, me ajudaram nesse empreendimento.

RESUMO

O *Thalassophryne nattereri* é um peixe peçonhento, de pequeno porte, que habita praticamente todo o litoral brasileiro. É causa relativamente frequente de acidentes entre os trabalhadores da pesca nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil, e também entre banhistas. Sua peçonha causa uma reação inflamatória intensa, seguida de necrose da área afetada, que persiste por vários dias. Como costumam ser as peçonhas, a do *T. nattereri* é uma secreção serosa, ou seja, rica em proteínas. Entre estas estão várias proteases e peptídeos, que possuem efeitos complexos no organismo humano. Nesta dissertação, busca-se investigar essas atividades proteolíticas, não só da peçonha mas também do muco tegumentar do *T. nattereri*, em relação à atividade colagenésica e atividade semelhante à tripsina/quimotripsina/elastase-II. Nenhuma das preparações demonstrou atividade semelhante à tripsina/quimotripsina/elastase-II frente aos substratos cromogênicos BApNA, N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida. Foram também avaliadas as propriedades proteolíticas do muco tegumentar do *T. nattereri*. Este possui atividade colagenásica, com pelo menos 5 proteínas capazes de degradar o colágeno. Por ter atividade colagenásica, há a possibilidade tratar-se de uma endopeptidase neutra, como as metaloproteinases, ou se tratar de duas enzimas diferentes, como uma metaloproteinase e uma carboxipeptidase. No futuro, o isolamento dessas enzimas ativas frente aos substratos testados na peçonha e no muco tegumentar do *T. nattereri* será necessário para uma melhor caracterização e identificação de suas propriedades e possíveis aplicações.

Palavras-chave: Enzima conversora de angiotensina. Colagenase. Angiotensinase. Vasopeptídeos. Cininases. Bradicinina. *Thalassophryne nattereri*.

ABSTRACT

The *Thalassophryne nattereri* is a venomous fish, small, inhabiting almost all Brazilian coast. It is relatively frequent accidents among workers fishery in the North and Northeast regions of Brazil, and also from sunbathers cause. Its venom causes an intense inflammatory reaction, followed by necrosis of the affected area, which persists for several days. How often the venoms in *T. nattereri* is a serous and rich in protein secretion . Among these are various peptides and proteases, which have complex effects on the human body. In this dissertation, we seek to investigate these proteolytic activities, not only but also from the venom of the cutaneous mucus from *T. nattereri*, in relation to collagenolytic activity and activity to trypsin/chymotrypsin/elastase-II like. The venom showed no collagenolytic activity. None of the preparations demonstrated to activity like trypsin/chymotrypsin/elastase-II against BApNA chromogenic substrates, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide and N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilide. We also assessed the proteolytic properties of cutaneous mucus from *T. nattereri*. This has collagenolytic activity, with at least 5 proteins bands capable of degrading collagen. By having collagenolytic activity and there is the possibility that it is neutral endopeptidase such as metalloproteinases or the case of two different enzymes, such as carboxypeptidase and a metalloproteinase. In the future, the isolation of these enzymes active against substrates in the venom and cutaneous mucus from *T. nattereri* will be needed to better characterize and identify their properties and possible applications.

Key words: Angiotensin-converting enzyme. Collagenase. Angiotensinase. Bradykinin. *Thalassophryne nattereri*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O <i>Thalassophryne nattereri</i>	13
Figura 2 – Distribuição do <i>T. nattereri</i> no litoral atlântico das américas.....	16
Figura 3 – O mecanismo de ejeção da peçonha do <i>T. nattereri</i>	17
Figura 4 – Efeitos vasculares da peçonha do <i>T. nattereri</i>	19
Figura 5 – O sistema caliceína-cininogênio-cininina.....	21
Figura 6 – Glomérulo e estruturas justaglomerulares.....	25
Figura 7 – Vias bioquímicas para a formação de Ang (1-7).....	27
Figura 8 – Ações de aminopeptidases no processamento de angiotensinas.....	29
Figura 9 – Processamento de angiotensinas por carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos.....	29
Figura 10 – Extração da peçonha do <i>T. nattereri</i>	31
Figura 11 – SDS-PAGE da peçonha e do muco tegumentar do <i>T. nattereri</i> . Canaletas 1 e 2 representam o muco tegumentar e a peçonha, respectivamente, em quantidades equivalentes de proteína total (77 µg em cada canaleta).....	36
Figura 12 – Zimografia da peçonha e muco tegumentar.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	O <i>Thalassophryne nattereri</i>.....	16
2.2	Epidemiologia dos acidentes com o <i>Thalassophryne nattereri</i>.....	17
2.3	Empeçonhamento pelo <i>T. nattereri</i>.....	18
2.4	O sistema calicreína-cininogênio-cinina.....	21
2.5	Métodos para o tratamento do empeçonhamento.....	22
2.6	O sistema renina-angiotensina.....	24
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Geral.....	30
3.2	Específicos.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Extração das amostras.....	31
4.1.1	Extração da peçonha.....	31
4.1.2	Extração do muco tegumentar.....	32
4.2	Homogeneização das amostras.....	32
4.2.1	Peçonha.....	32
4.2.2	Muco tegumentar.....	32
4.3	Ensaio de Bradford para quantificação de proteínas.....	32

4.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
4.5	Zimografia em gel de poliacrilamida.....	33
4.6	Testes de atividade em substratos cromogênicos.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Caracterização do perfil proteico na peçonha e no muco tegumentar do <i>Thalassophryne nattereri</i>.....	35
5.2	Caracterização das atividades colagenolíticas presentes na peçonha e no muco tegumentar do <i>Thalassophryne nattereri</i>.....	36
5.3	Caracterização das atividades proteolíticas frente a substratos cromogênicos presentes na peçonha e no muco tegumentar do <i>Thalassophryne nattereri</i>.....	38
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O estudo de peçonhas animais vem sendo realizado principalmente no sentido de compreender suas ações deletérias em humanos, possibilitando desta maneira o desenvolvimento de tratamentos específicos. Além disso, há na peçonha de muitos animais a presença de substâncias com potencial terapêutico. Dentre essas moléculas encontramos os peptídeos, que possuem algumas vantagens e desvantagens em comparação a pequenas moléculas que normalmente são usadas em fármacos tradicionais. A principal vantagem é a especificidade de ação. Enquanto um fármaco de baixa massa molecular tende a se difundir pelos tecidos, agindo sobre diversos alvos, um peptídeo pode ligar-se especificamente a um tipo de receptor, e exercer apenas o efeito desencadeado por essa ligação única. Porém, a biodisponibilidade é menor do que a de moléculas pequenas simples, devido a sua menor capacidade de atravessar barreiras biológicas, e também a sua maior fragilidade a variações de pH e ação de peptidases. Isso, portanto, limita o uso de possíveis medicamentos peptídicos (LEWIS; GARCIA, 2003). Por outro lado, partindo-se de peptídeos pode-se desenvolver fármacos. Um bom exemplo disso é o do fármaco Captopril®, cujos estudos que permitiram seu desenvolvimento foram iniciados a partir da descoberta do peptídeo bradicinina (BK) pelo pesquisador brasileiro Maurício Rocha e Silva e uma equipe de mais 3 fisiologistas no Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP em 1948.

Entre as peçonhas animais, as de peixes estão entre as menos estudadas. Isso se deve ao fato de que os animais peçonhentos terrestres co-habitarem nosso meio, e portanto haver um maior número de interações e acidentes envolvendo esses últimos e seres humanos. A facilidade de se obter peçonhas de animais terrestres, comparativamente muito maior em relação aos animais aquáticos, também contribui fortemente para que sejam mais estudados (CHURCH; HODGSON, 2002). A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Destarte, como um mecanismo de defesa, estes animais produzem um número enorme de metabólitos, cujas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas como peptídeos e proteínas com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelas peçonhas de animais terrestres.

O Brasil possui uma extensa linha costeira, aproximadamente 7.400 km, propiciando a existência de grande número de animais potencialmente perigosos que, associados a fatores como o grande fluxo de banhistas às praias, o incremento à pesca comercial e esportiva,

atividades como mergulho autônomo e pesca submarina, favorecem a ocorrência de muitos acidentes em humanos, sendo grande parte destes provocados por peixes peçonhentos. A distinção entre um ser venenoso e um peçonhento é que o primeiro possui alguma substância com elevada toxicidade em seu organismo, enquanto que o segundo, além disso, possui um aparato que permite usar essa substância tóxica contra outro ser vivo, seja para ataque ou defesa. Neste último caso, há também uma glândula que produz a peçonha, especificamente.

O *Thalassophryne nattereri* (Figura 1) conhecido no litoral brasileiro como niquim ou peixe-sapo, é um animal peçonhento, que habita regiões lagunares e estuarinas. Pertence à família *Batrachiodidae*, cujos indivíduos costumam ser conhecidos como peixes-sapo (HUTCHINS; PAXTON; ESCHMEYER, 1998). Aloja-se no fundo de águas rasas, e permanece imóvel durante boa parte do tempo. O peixe possui espinhos ocos inoculadores de peçonha na região dorsal, e os acidentes acontecem, na maior parte das vezes, quando pescadores, em sua maioria, ou banhistas inadvertidos pisam o peixe, ou tentam pegá-lo usando as mãos. A peçonha não tem, ao contrário de muitas outras peçonhas animais, ação hemorrágica ou neurotóxica, mas provoca inflamação local intensa, seguida de necrose, que se prolonga por vários dias (HADDAD JÚNIOR et al., 2003).

Figura 1 – O *Thalassophryne nattereri*



Fonte: LOPES FERREIRA, M. et al. **Peixes peçonhentos**: as potentes toxinas presentes nesses animais colocam em risco a saúde pública devido aos quadros patológicos que provocam nas situações de envenenamento. Projeto de Pesquisa. São Paulo: Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Grupo Pesquisa em Imunorregulação, [201-?]. Disponível em: <<http://imunorregulacaoibu.com.br/7-pesquisa/22-peixes-peconhentos/50-peixes-peconhentos>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

Acredita-se que principal mecanismo envolvido na fisiopatologia da lesão esteja envolvido com o sistema calicreína-cininogênio-cinina, onde substâncias presentes na peçonha com atividade cininásica (proteases) e de cininas que intensificam e simulam exacerbadamente os efeitos desse sistema (LOPES-FERREIRA et al., 2004).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é o principal responsável pelo controle dos líquidos corporais e do tônus vascular (BASSO; TERRAGNO, 2001). A aldosterona, que tem sua liberação controlada pelo SRA, é um hormônio produzido pelo córtex da glândula suprarrenal 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 caliceína-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; GRIENGLING, 2007) e também é capaz de hidrolisar a bradicinina, sendo um elo de ligação entre os dois sistemas (TOM et al., 2002).

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 peçonha possui diversas atividades citotóxicas relatadas. De acordo com o trabalho de Lopes-Ferreira et al. (2004), a peçonha possui ação direta sobre monócitos *in vitro*. Também possui propriedades trombogênicas, e são essas propriedades que, acredita-se, causam a necrose observada nas lesões, por geração de suprimento sanguíneo insuficiente (LOPES-FERREIRA et al., 2002).

Como todas as peçonhas costumam ser, a do *T. nattereri* é rica em proteases. Algumas substâncias, porém, parecem induzir o aparecimento de metaloproteinases no tecido intersticial, que degradam fibras colágenas (PAREJA-SANTOS et al., 2009). Essas metaloproteinases são endopeptidases neutras, e possuem importância no processo de estabelecimento de metástases no câncer (ALA-AHO; KÄRÄRI, 2005). Além disso, collagenases são também usadas na recuperação de ferimentos, como queimaduras (ÖZCAN et al., 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

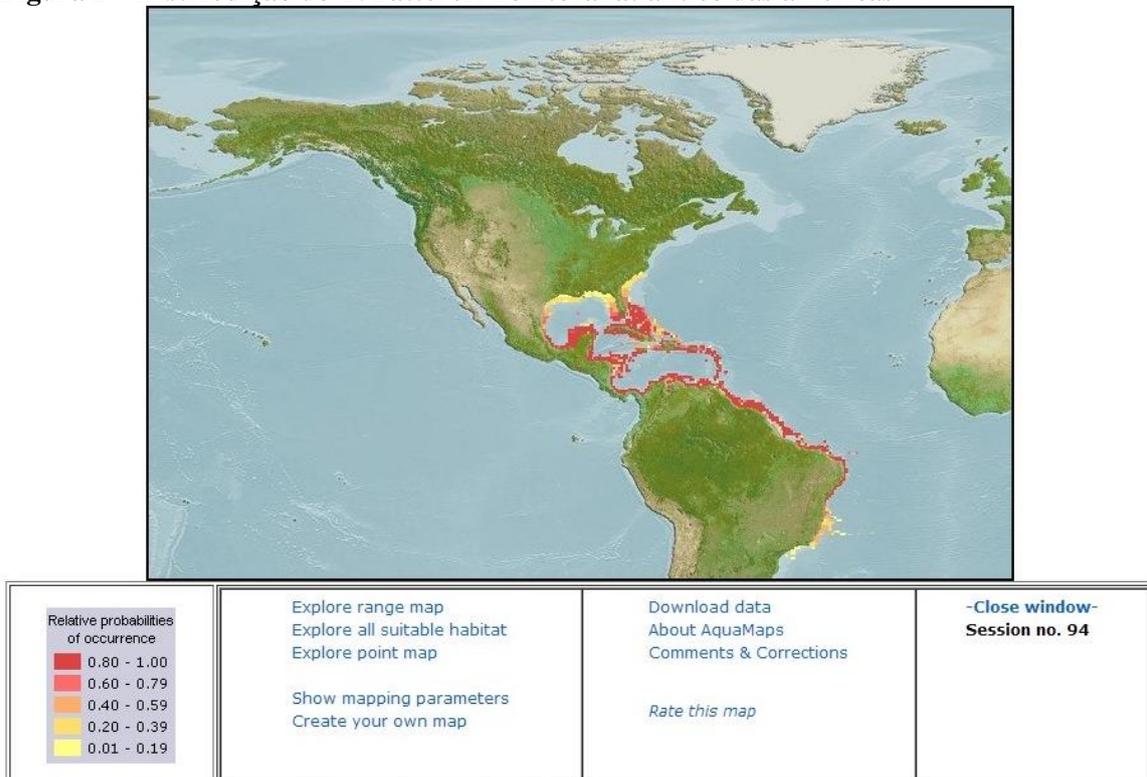
2.1 O *Thalassophryne nattereri*

A família *Batrachoididae* pertence à ordem *Batrachoidiformes*. Os peixes dessa família são conhecidos como peixes-sapo, devido à sua aparência (FROESE; PAULY, 2013).

Os peixes-sapo são predadores bentônicos de emboscada, e valem-se de sua coloração críptica para camuflarem-se no fundo do ambiente aquático. Geralmente não possuem escamas, e variam de tamanho de aproximadamente 7 a 55 cm de comprimento, sendo esses exemplares o *Thalassophryne megalops* e o peixe-sapo Pacuma, respectivamente. Todos os peixes-sapo possuem espinhos afiados nas nadadeiras dorsais e nos opérculos, e nos peixes da subfamília *Thalassophryninae*, que é a subfamília do *Thalassophryne nattereri*, esses espinhos são ocos, e possuem glândulas de peçonha em suas bases (HUTCHINS; PAXTON; ESCHMEYER, 1998).

O *Thalassophryne nattereri* (*T. nattereri*) é um peixe de hábitos bentônicos, ou seja, vive no fundo ambiente aquático. É endêmico em todo o litoral brasileiro (Figura 2). É um peixe peçonhento, e devido à prática disseminada da pesca nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, os acidentes envolvendo essa espécie são frequentes nessa região.

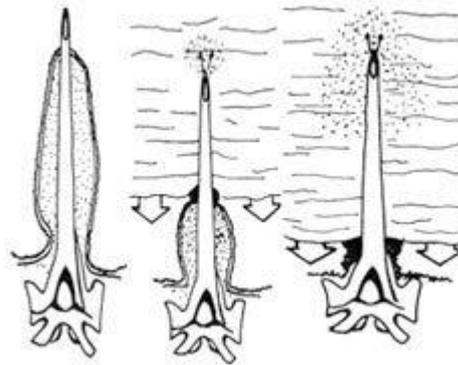
Figura 2 – Distribuição do *T. nattereri* no litoral atlântico das américas



Fonte: Mapa de distribuição nativa do *Thalassophryne nattereri* gerada por computador. Disponível em: <<http://www.aquamaps.org>, versão de agosto de 2013>. Acesso em: 19 jan. 2014.

O *T. nattereri* é um peixe de porte pequeno, alcançando em média 15 cm de comprimento (HADDAD JÚNIOR et al., 2003). É dotado de 2 (dois) espinhos ocos, injetores de peçonha, na região dorsal e mais dois operculares, um acima de cada nadadeira lateral (Figura 1). Na base de cada espinho, está a glândula de peçonha, que apresenta-se envolta por uma bainha, que por sua vez contém o espinho. Quando algo pressiona o espinho, este perfura a bainha, e com a continuidade do pressionamento, a peçonha acumulada nessa bainha é impulsionada através do espinho oco, e injetado na vítima (Figura 3).

Figura 3 – O mecanismo de ejeção da peçonha do *T. nattereri*



Fonte: LOPES-FERREIRA, M. et al. **Peixes peçonhentos**: as potentes toxinas presentes nesses animais colocam em risco a saúde pública devido aos quadros patológicos que provocam nas situações de envenenamento: Projeto de Pesquisa. São Paulo: Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Grupo Pesquisa em Imunorregulação, [201-?]. Disponível em: <http://imunorregulacaoibu.com.br/7-pesquisa/22-peixes-peconhentos/50-peixes-peconhentos> Acesso em: 19 jan. 2014.

2.2 Epidemiologia dos acidentes com o *Thalassopyrre nattereri*

Os acidentes com o *T. nattereri* ocorrem principalmente com homens, entre os 21 e 40 anos (FACÓ et al., 2005). Esta é a faixa de idade em que a maioria dos homens está trabalhando na pesca, e os acidentes ocorrem principalmente com os homens devido a estes estarem muito mais envolvidos na atividade pesqueira do que as mulheres.

Em um estudo feito no Pará e em Sergipe, em 2003, relatou-se as principais características de 43 acidentes registrados envolvendo o *T. nattereri* nessas regiões. Todas as vítimas eram homens, com idades entre 7 e 64 anos, 80% desses se acidentou enquanto caminhava pelas águas rasas, e 20% enquanto tentava remover o peixe das redes de pesca.

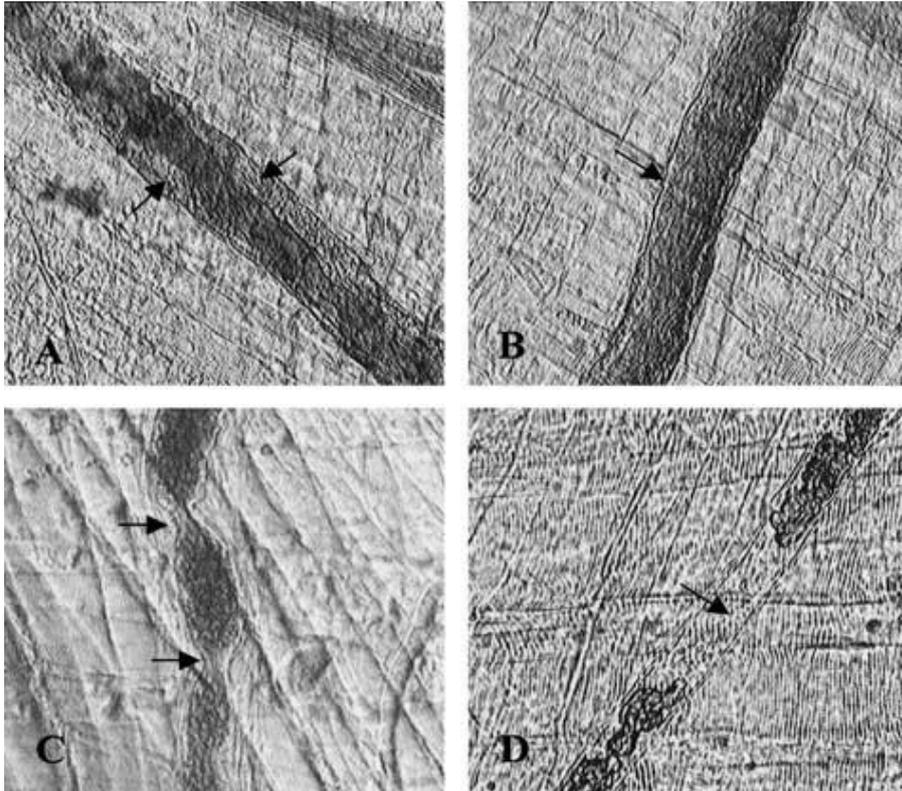
Acredita-se que exista muita subnotificação de acidentes com o *T. nattereri*. As principais razões seriam a dificuldade de acesso a serviços de saúde, que costumam ficar afastados das regiões em que os acidentes costumam ocorrer (FACÓ et al., 2005) e a ineficácia do tratamento oferecido nesses serviços de saúde (MAGALHÃES et al., 2005).

2.3 O empeçonhamento pelo *T. nattereri*

O empeçonhamento por *T. nattereri* apresenta as seguintes características: eritema local leve, edema severo, dor intensa e rápida progressão para necrose. Em ferimentos mais graves, a necrose pode ocorrer apenas algumas poucas horas depois do acidente e, em alguns casos, amputação e enxerto podem ser necessários (LOPES-FERREIRA; MOURA-DASILVA, 2000). A peçonha não apresenta atividade hemorrágica, ao contrário de várias outras peçonhas animais, como a de serpentes crotalínicas, que possuem metaloproteínas hemorrágicas (LOPES-FERREIRA et al., 2001) e é aparentemente desprovido de atividade de fosfolipase A₂ (LOPES-FERREIRA et al., 1998). A dificuldade de regeneração que acontece na mionecrose na lesão provocada pelo *T. nattereri* é atribuída ao suprimento sanguíneo insuficiente durante estágios críticos do processo de recuperação do tecido, e a perfusão sanguínea inadequada, decorrente da hemorragia, provoque a necrose. No empeçonhamento por *T. nattereri*, entretanto, não são observados os efeitos hemorrágicos, sendo os danos à fibra muscular induzidos diretamente, e a perfusão ineficiente também acontece, porém provinda de outros mecanismos, como os efeitos hemostáticos e citolíticos da peçonha (LOPES-FERREIRA et al., 2001).

Após aplicação tópica da peçonha no tecido muscular de camundongos, foram observados efeitos dose-dependentes na microvasculatura, como ocorrência de trombos de tamanhos variados na parede das vênulas, e constrição nas arteríolas, com redução de aproximadamente 25% no diâmetro dos vasos. Observa-se a formação de uma grossa camada de fibrina sobre o endotélio (Figura 4), alguns minutos após a aplicação da peçonha, e a rapidez com a qual esses efeitos se apresentam, assim como também a sua duração, são proporcionais à dose aplicada (LOPES-FERREIRA et al., 2002).

Figura 4 – Efeitos vasculares da peçonha do *T. nattereri*



Fonte: LOPES-FERREIRA, M. et al. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium mediated blood flow impairment. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1141-1147, 2002.

Notas: (A) Formação de trombos nas vênulas. (B) Vênula pós-capilar em estase. (C) Arteríola constricta (D) A camada de fibrina que se forma no endotélio vascular após a injeção de peçonha do *T. nattereri* (setas).

Como a peçonha apresenta atividade citotóxica contra plaquetas, é uma possibilidade que a formação dos trombos esteja relacionada à liberação de produtos trombogênicos de plaquetas lisadas pela ação da peçonha. Porém, há uma discrepância do número de plaquetas danificadas *in vivo* e a quantidade de trombos encontrados. Parece mais provável que a lesão do endotélio seja o principal envolvido na formação desses trombos, já que a peçonha também possui ação citotóxica endotelial *in vitro* (LOPES-FERREIRA et al., 2004). O fato de amostras de sangue dos animais injetados com a peçonha não apresentarem nenhuma alteração da coagulação sanguínea reforça a hipótese de liberação de fatores trombogênicos pelo endotélio (LOPES-FERREIRA et al., 2002).

A peçonha também possui atividade miotóxica. Após a injeção no músculo gastrocnêmio de camundongos, provocou alterações típicas de necrose celular, como degeneração de material miofibrilar, membrana plasmática rompida e mitocôndrias edemaciadas (LOPES-FERREIRA et al., 2001). A peçonha provocou aumento da atividade creatinina quinase no plasma, e diminuição da atividade dessa enzima no músculo. As lesões

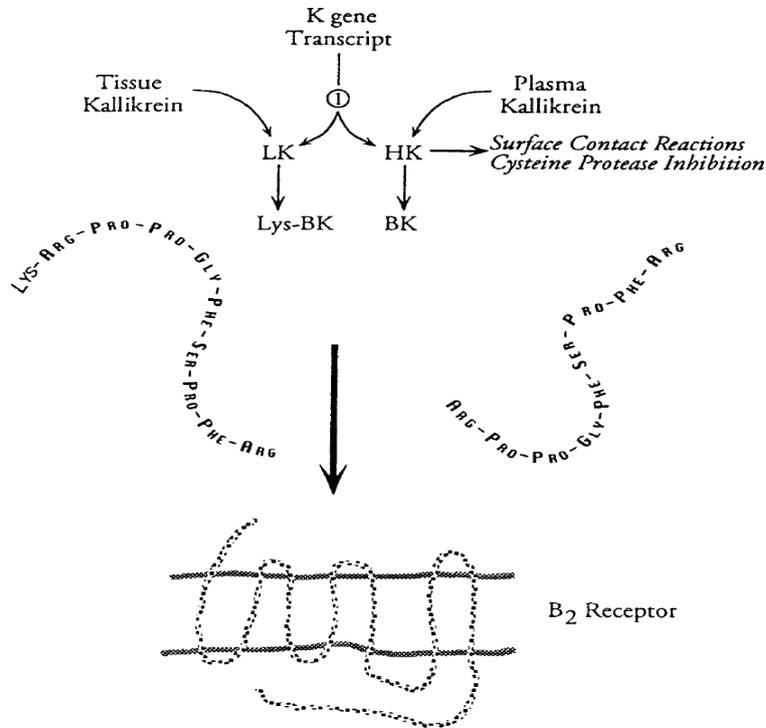
celulares foram observadas por microscopia intravital antes da estase circulatória, o que demonstra atividade miotóxica (LOPES-FERREIRA et al., 2001).

A atividade da peçonha também foi avaliada nos rins de ratos. Foram usadas três concentrações da peçonha em rins isolados de ratos, perfundidos com solução modificada de Krebs Henseleit (MKHS), e foi administrada a peçonha em 3 concentrações, de 0,1; 1,0 e 3,0 µg/mL. Foram observados aumento da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, da taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário nas primeiras duas doses, mas a taxa de filtração glomerular, fluxo urinário e o transporte tubular de Na⁺ e K⁺ diminuíram apenas após a administração da dose mais alta. Como neste trabalho não foi usado sangue, as alterações não foram creditadas a eventos trombogênicos, como o dano ao tecido endotelial, que pensou-se ser a causa da estase venosa completa e arteriolar transiente em tecidos afetados pela peçonha (LOPES-FERREIRA et al., 2002), mas a uma possível liberação de agentes vasoativos pelo endotélio (FACÓ et al., 2003).

Acredita-se que o principal mecanismo envolvido nos sintomas seja uma ação apresentada pela peçonha semelhante à ação do cininogênio, que atua no sistema fisiológico calicreína-cininogênio-cinina (LIMA et al., 2003) (Figura 5).

2.4 O sistema calicreína-cininogênio-cinina

Figura 5 – O sistema calicreína-cininogênio-cinina



Fonte: MILLER, D.; MARGOLIUS, H. S. The kallikrein-kinin-kininogen system. In: BITTAR, E. E.; BITTAR, N. (Ed.). **Molecular and cellular pharmacology**, Greenwich: JAI Press, c1997. p. 365. (Principles of medical biology, v. 8B).

Nota: Calicreínas, seus substratos cininogênio e seus produtos ativos. A transcrição do gene do cininogênio (K) é seguida por reações alternativas de splicing do RNAm, que leva à síntese ou do cininogênio de baixo peso molecular (LK) ou do cininogênio de alto peso molecular (HK). A clivagem proteolítica de cada um dos cininogênios pela calicreína libera os peptídeos bioativos, chamados cininas. Esses peptídeos, cujas sequências de aminoácidos são mostradas, possuem conformações aleatórias em solução. Cada um deles pode reagir com o receptor B₂, que é um receptor de membrana do tipo receptor de sete domínios.

O sistema calicreína-cinina-cininogênio atua no sistema circulatório e participa nas reações de coagulação (LYNCH; SHARIAT-MADAR, 2012). A calicreína é uma serino-protease, que circula no sangue em uma forma inativa, a pre-calicreína. O cininogênio é um precursor dos compostos biologicamente ativos, as cininas (BLAIS JÚNIOR et al., 2000). Encontramos o cininogênio de alta massa molecular (HK, do inglês *High molecular weight Kininogen*), com uma massa molecular de 120 kD e presente no plasma em uma concentração de 70 – 90 µg/mL, e o cininogênio de baixa massa molecular (LK, do inglês *Low molecular weight Kininogen*), com massa molecular de 68 kD e presente no plasma em uma concentração de 160 µg/mL (USHIDA; KATORI, 1986). A calicreína plasmática atua quase que exclusivamente sobre o HK, enquanto que a calicreína tecidual, quase que exclusivamente sobre o LK (MARGOLIUS, 1995). O produto de degradação do HK pela

calicreína plasmática é a bradicinina (BK), um nonapeptídeo dotado de intensa ação vasodilatadora Murphey et al. (2000). Já o produto da degradação da LK pela calicreína tecidual é a lisil-bradicinina (Lys-bradicinina), também conhecida como calidina. Quanto aos receptores de cininas, existem basicamente 2 tipos: os receptores B₁ estão envolvidos em situações de agressão ao tecido, como inflamação e trauma (HALL, 1992). Ligam-se des[Arg⁹]-bradicinina, um metabólito da bradicinina, e alguns estudos sugerem que a interleucina-1 é o sinal para a sua expressão (BATHON et al., 1992). Os receptores B₂ são relacionados à resposta fisiológica às cininas, como efeitos na pressão sanguínea, contração do músculo liso, fluxo sanguíneo local e transporte de eletrólitos (BÖCKMANN; PAEGELOW, 2000).

Algumas atividades são devidas a indução da liberação de outros mediadores pelas cininas, como a liberação de eicosanoides em reações de relaxamento da artéria basilar humana isolada, e a liberação de óxido nítrico na vasodilatação, assim como a liberação de substância P, neurocinina A, citocinas, histamina e serotonina (MILLER; MARGOLIUS, 1997).

A bradicinina é degradada pela ECA a BK-(1-7), um produto inativo, e posteriormente a BK-(1-5), um produto também inativo. No plasma humano, a bradicinina também pode ser convertida a BK-(1-8) por uma enzima do tipo carboxipeptidase N (KUOPPALA et al., 2000).

Em cães, ficou evidente a importância de cininases II, como a ECA, na degradação da bradicinina (NASJLETTI; COLINA-CHOURIO; MCGIFF, 1975). Em ratos, a neprilisina, uma endopeptidase neutra, assume um papel importante no catabolismo de cininas (URA et al., 1987).

2.5 Métodos para o tratamento do empeçonhamento

Até então, não há um método eficiente para tratar os sintomas que se apresentam no empeçonhamento por *T. nattereri*. Esse fator, aliado à dificuldade de acesso às unidades de saúde, uma vez que muitos acidentes ocorrem em áreas distantes de cidades com atendimento hospitalar, faz com que muitas vezes os indivíduos acidentados não procurem tratamento (FACÓ et al., 2005). O tratamento com drogas anti-inflamatórias, tanto esteroidais quanto não-esteroidais, não consegue aliviar a dor (LOPES-FERREIRA et al., 2004). Antibióticos, para prevenir infecções secundárias e colocar a região lesionada em água morna é o procedimento que mais alivia a dor, mas resulta apenas em uma leve melhora dos sintomas

(HADDAD JÚNIOR et al., 2003). O tratamento com anti-inflamatórios mostra que nem a ciclooxigenase nem a lipooxigenase estão envolvidas no mecanismo fisiopatológico (LIMA et al., 2003). O uso de analgésicos opióides apresentou alguma eficácia em reduzir a dor, porém não foi capaz de reduzir o edema, e os melhores resultados foram alcançados com inibidores da calicreína tecidual (LOPES-FERREIRA et al., 2004).

Em 2004, Lopes-Ferreira e colaboradores desenvolveram um estudo para avaliar a atividade cininogênica da peçonha do *T. nattereri*. Nesse estudo, foram injetadas doses da peçonha em patas de camundongos, e avaliado a nocicepção pela frequência de lambida da pata. O resultado mostrou que apenas o inibidor da calicreína tecidual TKI foi capaz de reduzir tanto a frequência de lambidas da pata quanto o edema no local da aplicação da peçonha (LOPES-FERREIRA et al., 2004). Também foi testado um inibidor da calicreína plasmática PKSI₅₂₇, mas este foi capaz apenas de reduzir levemente o edema (15% em relação ao controle), mas não apresentou efeito na nocicepção (LOPES-FERREIRA et al., 2004). Foi adicionado ainda um inibidor de enzima conversora de angiotensina (ECA), que também provoca a degradação da bradicinina, para demonstrar o envolvimento do sistema calicreína-cininogênio-cininas no fisiopatologia da lesão. Com a ACE inibida, há mais bradicinina presente, e portanto, tanto a nocicepção quanto o edema foram aumentados. O estudo mostra, dessa maneira, que a peçonha provoca uma reação inflamatória baseado na ativação de cininas, sendo portanto, concluído que a peçonha possui atividade cininogênica. Para provar que a peçonha tem essa atividade, os autores testaram a capacidade de liberação de cininas em substratos sintéticos fluorescentes derivados do cininogênio humano: (1) Abz-MISLMKR~~PQ~~-EDDnp, (Abz-Met-Ile-Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Gln-EDDnp), correspondendo à bradicinina N-terminal; (2) Abz-~~GFSPFRSSRQ~~-EDDnp (Abz-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Ser-Arg-Gln-EDDnp), correspondendo à bradicinina C-terminal e (3) Abz-LGMISLMKR~~PPGWSPFRSSRIW~~-NH₂ (Abz-Leu-Gly-Met-Ile-Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Trp-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Ser-Arg-Ile-Trp-NH₂), peptídeo contendo a sequência completa de bradicinina. Observou-se então a clivagem do peptídeo (3), resultando nos dois primeiros peptídeos, que correspondem à bradicinina e Lys-bradicinina. Também foram testados os cininogênios humanos, tanto de alta quanto baixa massa molecular. O cininogênio de alta massa molecular, o substrato para a calicreína plasmática, apresentou uma produção de cinina a partir do cininogênio significativamente menor do que no controle (6300 pg e 13500, respectivamente) mas no cininogênio de baixa massa molecular, foram obtidas quantidades similares, demonstrando que realmente a atividade da peçonha é semelhante à da calicreína tecidual. A bradicinina (BK) também é clivada pela enzima conversora de angiotensina, uma

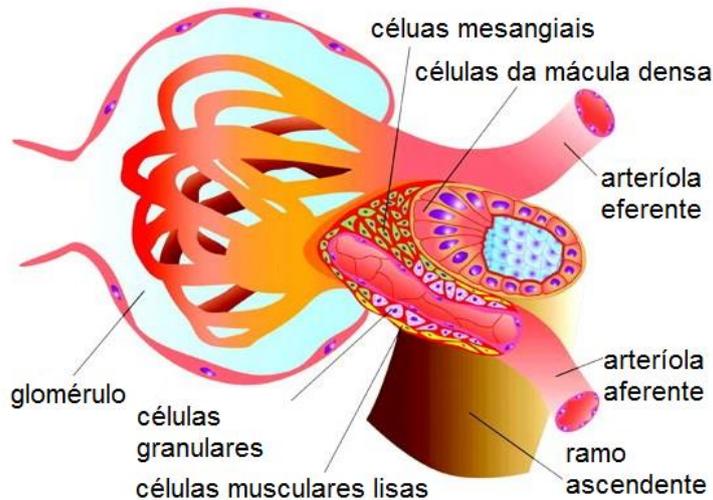
carboxipeptidase, também, pela sua capacidade de degradar cinina, classificada como cininase-2, que faz parte do sistema renina-angiotensina (Su, 2013). No plasma sanguíneo, a BK é clivada principalmente pela ACE e pela carboxipeptidase N (KUOPPALA et al., 2000). A ACE cliva a BK em BK(1-7) e BK-(1-5); a carboxipeptidase N, também classificada como uma cininase I (ERDOS; SLOANE, 1962), clivam a arginina C-terminal básica para formar BK (1-8) (SIVIERI et al., 2007).

Alguns métodos são usados pelos populares para diminuir os efeitos do empeçonhamento. Alguns pescadores conseguem reduzir os efeitos colocando a lesão em contato “com os olhos do peixe”, onde na verdade a pele do animal entra em contato com o ferimento (COSTA NETO, 2001). O mais comum consiste em aplicar água morna na região, mas o mais eficiente é a aplicação de soro antipeçonha, que é produzido apenas na Austrália (SUTHERLAND, 1992 *apud* FACÓ et al., 2003).

2.6 O sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina é considerado atualmente como o principal mecanismo de controle sistêmico dos líquidos corporais e, portanto, da pressão arterial. 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 mácula densa é uma região de células especiais adaptadas, localizadas numa porção do túbulo contorcido distal adjacente às arteríolas aferente e eferente do glomérulo (Figura 6). 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. A renina, por sua vez, cliva o angiotensinogênio, uma α_2 -globulina já presente naturalmente no sangue em sua extremidade aminoterminal, liberando um decapeptídeo chamado de angiotensina I (Ang I, Ang(1-10)), que por sua vez é rapidamente convertido, por uma enzima chamada enzima conversora de angiotensina (ACE) a um octapeptídeo denominado angiotensina II (Ang II, Ang(1-8)), que é considerada a forma ativa da angiotensina. A presença de Ang II, por sua vez, estimula a liberação de aldosterona, que tende a poupar sódio e eliminar potássio. A liberação de renina, portanto, visa recuperar o equilíbrio hemodinâmico, mantendo níveis pressóricos elevados.

Figura 6 – Glomérulo e estruturas justaglomerulares



Fonte: BELL, P. D. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *PNAS*, Boston, v. 100, n. 7, p. 4322, Apr. 2003. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/100/7/4322/F1.expansion.html>. Acesso em: 9 jan. 2014.

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 (VIRDIS, 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 (HARRIS, 1994).

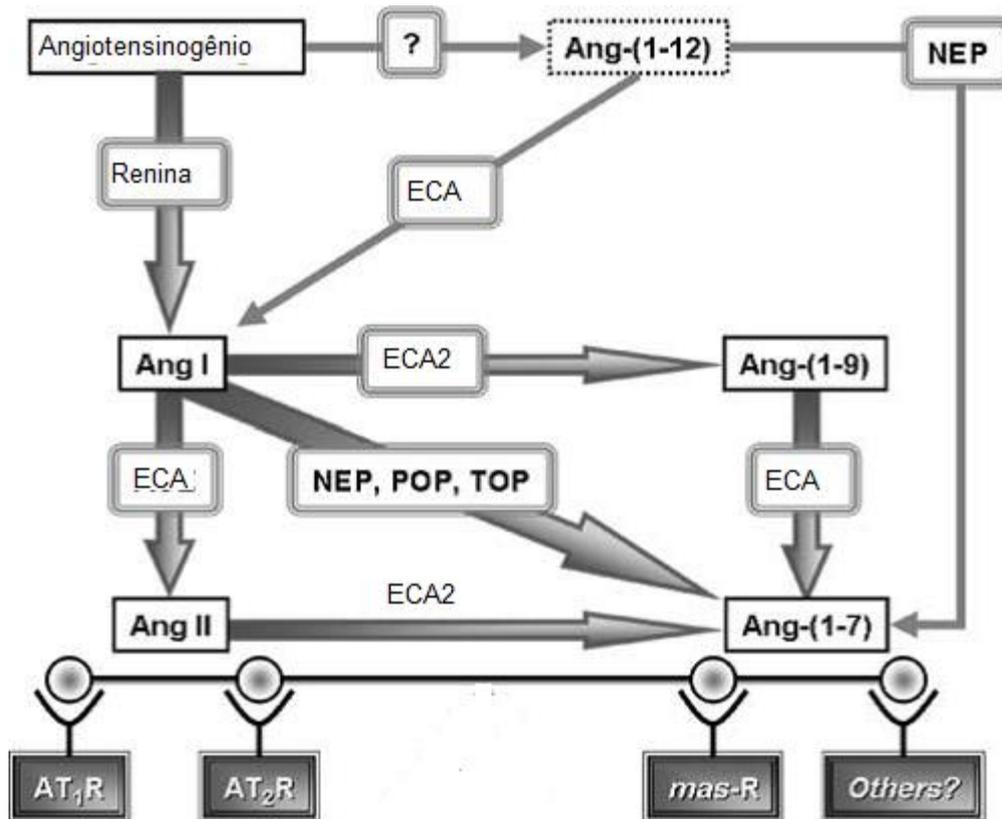
A Ang II liga-se a dois receptores ligados à proteína G (GPCR), chamados de AT₁ e AT₂ (LAMARIÉ; SCHIFFRIN, 2010). Os efeitos clássicos da Ang II são desencadeados quando o peptídeo ligam-se ao receptor AT₁, possuindo vários efeitos fisiológicos, tais como a vasoconstrição direta das arteríolas pré-capilares e em menor grau nas vênulas pós-capilares; aumento da neurotransmissão noradrenérgica periférica (ZIMERMAN; ROBERTSON; JACKSON, 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; CLINE JÚNIOR; WATTS., 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; 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 ECA, 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 (Figura 7). 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; 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 Figura 7, 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 7 – Vias bioquímicas para a formação de Ang (1-7)



Fonte: Adaptado de: TRASK, A. J.; FERRARIO, C. M. In: VARAGIC, J. et al. New angiotensins. *J. Mol. Med.*, Berlin, v. 86, n. 6, p. 663, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713173/>. Acesso em: 10 jan. 2014. e TRASK, A. J.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardiovasc. Drug Rev.*, New York, v. 25, n. 2, p. 162, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/enhanced/doi/10.1111/j.1527-3466.2007.00012.x/> Acesso em: 10 jan. 2014.

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) (VARAGIC 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.

Recentemente, foi constatado que uma enzima homóloga da ECA, a ECA2, é capaz de fazer a conversão direta da Ang II em Ang(1-7) (Figura 8). 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 acetil-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; ALLRED ; FERRARIO, 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).

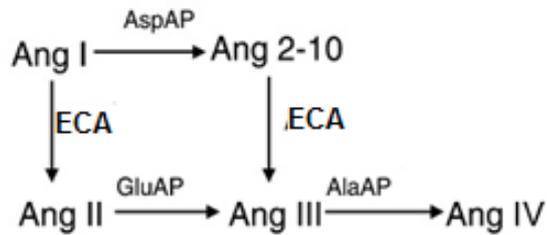
A Ang I é convertida em outros peptídeos, que não a Ang II, por vias alternativas de clivagem da mesma. Pelo fato de as pesquisas que investigaram as enzimas capazes de degradar a Ang I terem sido quase que completamente baseadas em métodos baseados em anticorpos para detectar Ang II, tem-se muito pouco 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., 1998), e a Ang(2-10) parece ter efeitos opostos ao da Ang II (MIN; SIM; XU, 2000).

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), glutamyl-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., 2003). Na Figura 8, está mostrado como essas diferentes angiotensinas processam essas angiotensinas.

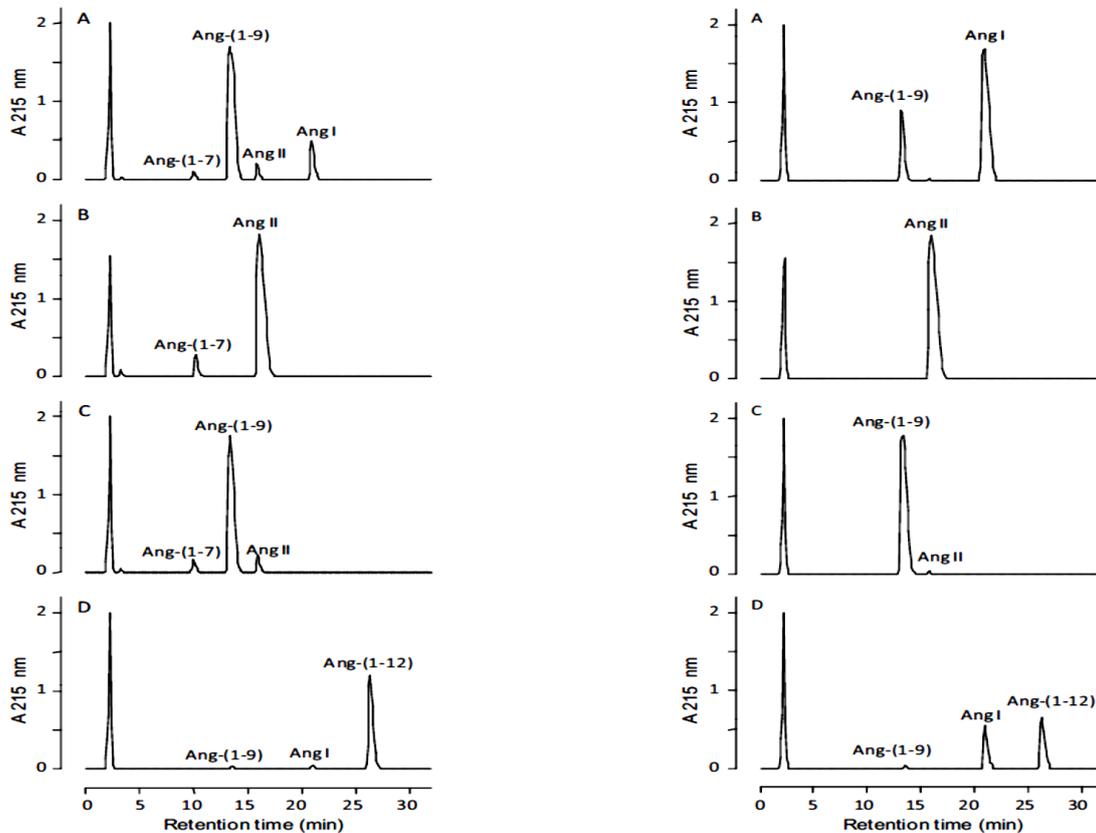
Figura 8 – Ações de aminopeptidases no processamento de angiotensinas



Fonte: Adaptado de: PRIETO, I. et al. Angiotensinase activities in the kidney of renovascular hypertensive rats. **Peptides**, New York, v. 24, n. 5, p. 755-670, May, 2003.

Carboxipeptidases também atuam no processamento de angiotensinas, igualmente com peculiaridades em diversos tecidos diferentes (PEREIRA et al., 2012). Na Figura 9, temos os cromatogramas que revelam o comportamento de carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos frente a diversas angiotensinas.

Figura 9 – Processamento de angiotensinas por carboxipeptidases encontradas no leito arterial mesentérico de ratos



Fonte: PEREIRA, H. J. et al. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. **Peptides**, New York, v. 33, n. 1, p. 67-76, Jan. 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Explorar as atividades proteolíticas da peçonha e do muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri*.

3.2 Específicos

- Caracterizar o perfil proteico quanto à massa e abundância relativa das proteínas presentes na peçonha e no muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri* através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Testar a atividade da peçonha e do muco da superfície corpórea em substratos cromogênicos;
- Testar a atividade proteolítica colagenésica da peçonha e muco da superfície corpórea;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração das amostras

4.1.1 Extração da peçonha

Para a extração da peçonha, usou-se uma pinça simples e uma pinça hemostática. O animal era retirado do gelo, com cuidado para que a bainha de peçonha não fosse rompida precocemente, ocasionando a perda da amostra. Então, usava-se a pinça hemostática para remover o animal, normalmente através do pinçamento de uma das nadadeiras. Com a pinça hemostática mantinha-se o peixe suspenso, preso pela mandíbula, enquanto que com a pinça comum, procurava-se romper a bainha de peçonha, pinçando-se o espículo e repuxando a pele que o cobre em direção à sua base, provocando o perfuramento da bainha (Figura 10), e expulsão da peçonha em um tubo já convenientemente posicionado.

Figura 10 – Extração da peçonha do *T. nattereri*



Fonte: Autor, 2013.

Nota: Os espinhos dorsais já perfuraram a bainha da peçonha, e a pressão exercida com a pinça faz com que a peçonha seja expelida através dos espinhos ocos.

4.1.2 Extração do muco tegumentar

A extração do muco da superfície corpórea foi realizada deslizando-se a pinça comum sobre o corpo do animal enquanto este era mantido suspenso pela pinça hemostática, como descrito na extração da peçonha, e colocando-se o muco em um tubo.

4.2 Homogeneização das amostras

4.2.1 Peçonha

A peçonha do do *T. nattereri* é uma secreção serosa, fluida o suficiente para ser diluída em tampão sem a necessidade de técnicas adicionais de homogeneização. Apresenta um certo turvamento algumas horas depois de extraída, com precipitação de grânulos. A amostra precisa ser centrifugada para atingir a homogeneidade quando ocorre essa precipitação, o que diminui o seu teor proteico.

4.2.2 Muco tegumentar

O muco tegumentar é uma secreção de elevada viscosidade e capacidade de aderência, que apresenta-se difusamente no corpo do *T. nattereri*, esses fatores associados fazem com que seja necessário homogeneizar o muco em um homogeneizador de tecidos. Foi feito um *pool* dessa amostra, onde o muco extraído de todos os peixes foi juntado em um único tubo. Após homogeneização, esse tubo foi centrifugado a 10.000 rpm em uma centrífuga por 5 minutos e o sobrenadante retirado.

4.3 Ensaio de Bradford para quantificação de proteínas

Foi construída uma curva padrão de albumina sérica bovina (ASB) com 5 pontos em duplicata, com concentrações de 5, 10, 15, 20 e 40 µg de ASB/mL. A solução de Bradford foi preparada com 50 mL de etanol a 95%, na qual foram diluídos 100 mg de azul brilhante de Coomassie G-250. Essa solução foi adicionada a 100 mL de ácido fosfórico. Cada um dos tubos de teste continha 250 µL desta solução. A quantidade de amostra usada para a quantificação foi de 2 µL, que foi lida com o detector regulado para a leitura a 595 nm.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram aplicadas em um gel com 12% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). Foi usada uma cuba de eletroforese *Miniprotean Bio Rad*, com gel de 5 mL. Usou-se solução 1500 µL de solução de acrilamida-bis-acrilamida (acrilamida 40%), 937,5 µL de solução tris(hidroximetil)aminometano-HCl (tris-HCl) 2,0 M pH 8,8, 500 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%, 1562,5 µL de água deionizada, além de 250 µL de soluções catalizadoras: 250 µL de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (temed) a 1% e 250 µL de solução de persulfato de amônio a 5% para o gel inferior. O gel superior continha 600 µL de solução de acrilamida 40%, 1000 µL de solução tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 400 µL de solução SDS a 1%, 1600 µL de água deionizada e 200 µL de cada uma das soluções dos catalisadores: temed e persulfato de amônio. A eletroforese foi realizada a uma corrente constante de 10mA.

4.5 Zimografia em gel de poliacrilamida

Usou-se gel de poliacrilamida a 12% (LAEMMLI, 1970), com SDS e 0,2% de colágeno. A eletroforese foi executada em uma cuba uma corrente constante de 20 mA. O gel recebeu então 5 banhos com uma solução de triton X-100 a 2,5% para remover os traços de SDS, sem agitação. A solução foi trocada a cada 15 minutos, totalizando 1 hora e 15 minutos de banho com a solução de triton X-100. Em seguida, lavou-se rapidamente com água destilada para retirar o excesso de triton X-100, o gel foi mergulhado em um tampão de reação, que consistiu em tris-HCl 50 mM, pH 8,1, e deixado durante toda a noite, a temperatura ambiente. O gel foi corado com solução de azul brilhante de coomassie 0,2% por 2 horas, e descorado com solução descorante metanol 50%, ácido acético 10%, até um ponto em que as bandas claras ficassem bem evidentes.

4.6 Testes com substratos cromogênicos

As atividades semelhante à tripsina, semelhante à quimitripsina e semelhante à elastase da peçonha e do muco tegumentar do *T. nattereri* foram testadas usando-se os substratos cromogênicos BApNA, N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida, respectivamente (ANILKUMAR, 2008). O teste se deu com a colocação de 5 µL de solução dos substratos cromogênicos BApNA a 50 mM e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida a 100 mM cada

em 490 μL de tampão tris-HCl 100mM, pH 8,1. Nesta solução resultante, foram colocados 5 μL de peçonha e do muco tegumentar, e esperou-se a formação de alguma cor.

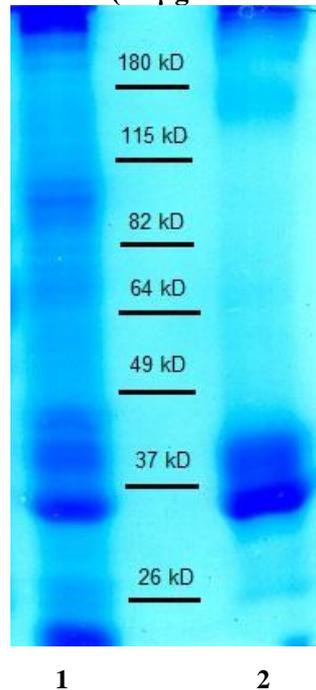
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do perfil proteico na peçonha e no muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri*

Para caracterizar os perfis proteicos em ambas as preparações, procedeu-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras (Figura 11). Vemos na canaleta indicada pelo número 1 um grande número de bandas presentes no muco tegumentar, o que demonstra a complexidade dessa preparação. Na canaleta 2, há uma amostra do muco tegumentar que possui 77 µg de quantidade total de proteínas. Na canaleta indicada na figura pelo número 2, temos a peçonha, com uma igual quantidade total de proteínas. As secreções contêm um alto teor de proteínas, em especial a peçonha, que possui concentração proteica de 55 mg/mL na amostra estudada. Podemos verificar que a amostra do muco tegumentar possui algumas bandas em comum com a peçonha. A peçonha possui uma complexidade menor, e uma maior presença de proteínas/peptídeos de menor peso molecular, bandas com maior migração no gel de poliacrilamida. Essa presença de peptídeos na peçonha é um indicativo que suas ações estejam mais relacionadas à ação direta de peptídeos e não da ação de proteases sobre peptídeos endógenos.

Devido à elevada concentração proteica, a secreção serosa da peçonha foi diluída para que a canaleta indicada com o número 2, na Figura 11, tivesse a mesma quantidade de proteínas da canaleta com o muco tegumentar.

Figura 11 – SDS-PAGE da peçonha e do muco tegumentar do *T. nattereri*. Canaletas 1 e 2 representam o muco tegumentar e a peçonha, respectivamente, em quantidades equivalentes de proteína total (77 µg em cada canaleta)

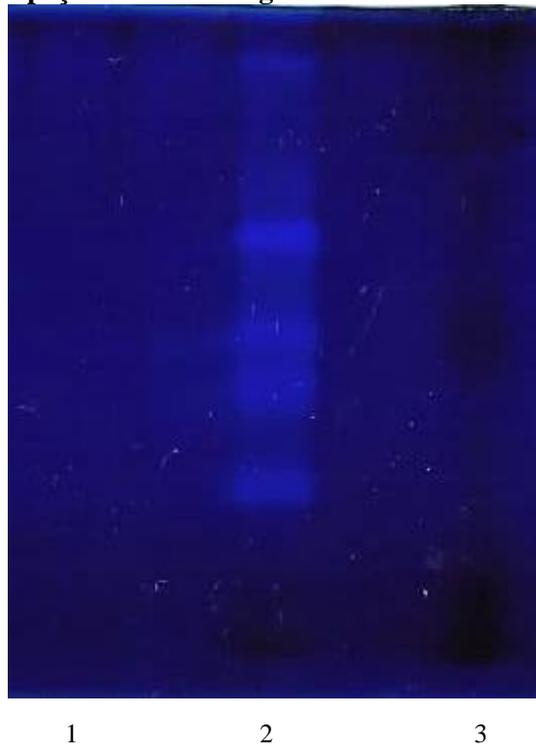


Fonte: Autor, 2013.

5.2 Caracterização das atividades colagenolíticas presentes na peçonha e no muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri*

Uma importante atividade proteolítica é a degradação de colágeno, (Figura 12). Colagenase é uma das enzimas utilizadas no debridamento. Ela decompõe as fibras de colágeno natural, que constituem o fundo da lesão, por meio das quais os detritos permanecem aderidos aos tecidos (OZCAN et al., 2002). Alguns autores citam que, além do caráter enzimático, a colagenase demonstra uma ação excitadora para o tecido de granulação, com aceleração do seu crescimento e enchimento do vazio da lesão, bem como sua epitelização, contribuindo assim para a cicatrização (HATZ et al., 1994). A Figura 12 é uma zimografia, onde observamos a degradação do colágeno por um clareamento da região onde a proteína encontra-se imobilizada, separada por massa molecular no gel de poliacrilamida com colágeno.

Figura 12 – Zimografia da peçonha e muco tegumentar



Fonte: Autor, 2013.

Nota: Zimografia em gel de poliacrilamida a 10%, com 0,2% de colágeno. Análise das atividades colagenolítica na secreção da pelo do *Thalassophryne nattereri*. 1- Controle, 2- muco tegumentar, 50 µg de proteína total 3- peçonha, 150µg de proteína total. O gel foi corado com coomassie blue.

O controle (canaleta 1, Figura 12) é necessário para garantir que o clareamento se deve a ação enzimática e não a nenhum efeito de matriz. Somente o muco tegumentar apresentou atividade sobre o colágeno (canaleta 2, Figura 12), a peçonha (canaleta 3, Figura 12) não apresentou ação nenhuma sobre o colágeno, mesmo sendo usada uma quantidade total de proteína 3 vezes maior (150 µg de proteína na peçonha e 50 µg no muco tegumentar) e fica evidente a presença de proteínas, bandas escurecidas na canaleta. Vemos na canaleta 2, cinco bandas com ação colagenolítica, podendo refletir cinco proteínas com ação sobre o colágeno ou processamentos proteolíticos que alterariam a massa molecular das collagenases e explicariam o padrão em arraste, encontradas principalmente nas bandas de maior massa molecular, mais altas no gel (menor migração).

As collagenases normalmente são metaloproteinases, que são endopeptidases neutras (ALA-AHO; KÄHÄRI, 2005).

5.3 Caracterização das atividades proteolíticas frente a substratos cromogênicos presentes na peçonha e no muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri*

Nenhuma atividade proteolítica sobre os substratos cromogênicos foi detectada. Os substratos cromogênicos utilizados para a determinação da atividade proteolítica foram os seguintes: N-succinil-AAPF-pNA, N-succinil-AAPA-pNA, N-succinil-AAPL-pNA e Bapna. Em todos os ensaios a concentração dos substratos foi de 500 μM .

6 CONCLUSÃO

Concluimos que foram encontradas importantes atividades proteolíticas no muco tegumentar do *Thalassophryne nattereri*. O muco tegumentar possui maior concentração de proteínas totais, e é uma amostra de maior complexidade. A peçonha mostra-se com proteínas menores, rica em peptídios e proteínas de baixo peso molecular. O muco tegumentar apresenta importantes ações colagenásicas, que são desempenhadas normalmente por metaloproteinases e angiotensinásicas, que são atividades encontradas tanto em endopeptidases neutras, como as metaloproteinases, quanto em aminopeptidases, como a aspartil aminopeptidase em glutamil aminopeptidase. Isso significa que a peçonha pode ter endopeptidases neutras, reponsáveis por ambas as ações, ou estas e as aminopeptidases, sendo cada uma reponsável por uma ação diferente. Tanto a peçonha quanto o muco não apresentam atividade semelhante à tripsina, à quimotripsina e à elastase, frente o resultado negativo de atividade sobre os substratos cromogênicos BApNA, N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida, respectivamente. Devemos nesse ano aprofundar o estudo para caracterizar e isolar essas atividades apontadas nesse relatório parcial, sendo assim possível precisar a descrição a natureza de cada uma dessas enzimas, apontando se são análogas de enzimas já conhecidas, como é possível descrever até agora, ou se são novas enzimas.

A atividade colagenésica encontrada no muco tegumentar representa um avanço na caracterização do repertório das proteases presentes nesta preparação. O reconhecimento de novas atividades como a encontradas nessas preparações são de vital importância no aumento do conhecimento do repertório de proteases, o que possibilita aplicações futuras em saúde e biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ALA-AHO, R; KÄHÄRI, V. M. Collagenases in cancer. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 3-4, p. 273-286, Mar.-Apr. 2005.
- ALLRED, A. J. et al. Pathways for angiotensin-(1-7) metabolism in pulmonary and renal tissues. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 279, n. 5, p. F841-850, Nov. 2000.
- ANILKUMAR, K. J. et al. **Production and characterization of Bt Cry1Ac resistance in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie)**. 2008. Dissertation. ProQuest UNI Microform 3333107, Ann Arbor, 2008. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=yWrhgucMtJ8C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 15 nov. 2013.
- BANEGAS, I. et al. Brain aminopeptidases and hypertension. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, Bermingham, v. 7, n. 3, p. 129-134, Sep. 2006.
- BASSO, N.; TERRAGNO, N. A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, Dallas, v. 38, n. 6, p. 1246-1249, 2001.
- BATHON, J. M. et al. Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 260, n. 1, p. 384-392, Jan. 1992.
- BAUTISTA, R. et al. Angiotensin II-dependent increased expression of Na⁺-glucose cotransporter in hypertension. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 286, n. 1, p. F127-133. Sep. 2004.
- BELL, P. D. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. **PNAS**, Boston, v. 100, n. 7, p. 4322-4327, Apr. 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/100/7/4322/F1.expansion.html>>. Acesso em: 9 jan. 2014.
- BLAIS JÚNIOR, C. et al. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. **Peptides**, New York, v. 21, n. 12, p. 1903-1940, Dec. 2000.
- BÖCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 68, n. 5, p. 587-592, Nov. 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAI, S. Y. et al. The angiotensin IV/AT₄ receptor. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 61, n. 21, p. 2728-2737, 2004.
- CHAPPELL, M. C; ALLRED, A. J; FERRARIO, C. M. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 16, suppl 1, p. 22-26, 2001.

- CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1083–1093, 2002.
- COLEMAN, J. K. et al, Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. **Peptides**, New York, v. 19, n. 2, p. 269-277, 1998.
- COSTA NETO, E. M. **A cultura pesqueira do litoral norte da Bahia**. Maceió, EDUFAL: Salvador, EDUFBA, 2001.
- CRACKOWER, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, London, v.417, n. 6891, p. 822-828, Jun. 2002.
- ERDOS, E. G.; SLOANE, E. M. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykines and kallidins. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 11, p. 585-592, jul. 1962
- FACÓ, P. E. et al. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 6, p. 479-482, nov.-dez. 2005.
- FAVRAT, B. et al. Neutral endopeptidase versus angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertension. **J. Hypertens.**, London, v. 13, n. 7, p. 797-804, Jul. 1995.
- FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, Dallas, v. 30, n. 3 pt 2, p. 535-541, Sep. 1997.
- FERREIRA, J. et al. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1006-1012, Dec. 2001.
- FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). FishBase (version Feb 2013): *Batrachoididae*.
In: **SPECIES 2000 & ITIS Catalogue of Life**, 11th March 2013 [Digital resource].
[Makati City, Philippines]: FishBase, 2013. Disponível em:
<http://www.catalogueoflife.org/col/> Acesso em: 15 jun. 2013.
- GARCIA, R. et al. Effects of tonin, an angiotensin II-forming enzyme, on vascular smooth muscle in the normal rabbit. **Hypertension**, Dallas, v.3, n. 3 pt. 2, p. 101-106, 1981.
- HADDAD JÚNIOR, V. et al. The venomous toadfish *thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 221-223, Jul.-Aug. 2003.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 131-190, Nov. 1992.
- HARRIS, R. C. et al. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 94, n. 6, p. 2504-2510, Dec. 1994.

HATZ, R. A. et al. **Wound healing and wound management: a guide for private practice.** Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.

HILGERS, K. F.; MANN, J. F. E. ACE Inhibitors *versus* at₁ receptor antagonists in patients with chronic renal disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 13, n. 4, p. 1100-1108, Apr. 2002. Disponível em: <http://jasn.asnjournals.org/content/13/4/1100.long> Acesso em: 10 fev. 2014.

HUTCHINS, J. B.; PAXTON, J. R.; ESCHMEYER, W. N. (Ed.). **Encyclopedia of fishes.** San Diego: Academic Press, 1998. p. 135-136.

JACKMAN, H. L. et al. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart role of cathepsin A. **Hypertension**; Dallas, v. 39; n. 5, p. 976-981, 2002.

KOVÁCS, G. et al. Angiotensin II directly stimulates macula densa Na-2Cl-K cotransport via apical AT₁ receptors. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 282 n. 2, p. F301-F306, Feb. 2002.

KUOPPALA, A. et al. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, Bethesda, v. 278, n. 4, p. H1069-H1074, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEMARIÉ, C. A.; SCHIFFRIN, E. L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, Birmingham, v. 11 n. 1, p. 19-31, Mar. 2010.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 2, n. 10, p. 790-802, Oct. 2003.

LI, Q. et al. Comparative vasoconstrictor effects of angiotensin II, III, and IV in human isolated saphenous vein. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, n. 4, Apr. 1997.

LIMA, C. et al. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon.**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 499-507, Oct. 2003.

LIU, F.; COGAN, M. G. Angiotensin II: a potent regulator of acidification on the rat early proximal convoluted tube. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 80, n. 1, p. 272-275, Jul. 1987.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium mediated blood flow impairment. **Toxicon.**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1141-1147, Aug. 2002.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 2151-2157, 2004.

LOPES-FERREIRA, M. et al. **Peixes peçonhentos**: as potentes toxinas presentes nesses animais colocam em risco a saúde pública devido aos quadros patológicos que provocam nas situações de envenenamento: Projeto de Pesquisa. São Paulo: Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Grupo Pesquisa em Imunorregulação, [201-?]. Disponível em: <http://imunorregulacaoibu.com.br/7-pesquisa/22-peixes-peconhentos/50-peixes-peconhentos> Acesso em: 19 jan. 2014.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 55-64, Feb. 2001.

LOPES-FERREIRA, M. et al. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 405-410, Feb. 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. **Toxicon.**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 1149-1156, Aug. 2000.

LYNCH, J.; SHARIAT-MADAR, Z. Physiological effects of the plasma kallikrein-kinin system: roles of the blood coagulation factor XII (Hageman Factor). **Clinic. Toxicol.**, New York, v. 2, n. 3, p. 1-3, 2012.

MAGALHÃES, G. S. et al. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 8, p. 687-699, Aug. 2005.

MARGOLIUS, H. S. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hypertension**, Dallas, v. 26, n. 2, p. 221-229, Aug. 1995.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am. J. Physiol.:Cell Physiol.**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. C82-C97, Jan. 2007.

MILLER, D.; MARGOLIUS, H. S. The kallikrein-kinin-kininogen system. In: BITTAR, E. E.; BITTAR, N. (Ed.). **Molecular and cellular pharmacology**, Greenwich: JAI Press, c1997. p. 363-384. (Principles of medical biology, v. 8B).

MIN, L.; SIM, M. K.; XU, X. G. Effects of des-aspartate-angiotensin I on angiotensin II-induced incorporation of phenylalanine and thymidine in cultured rat cardiomyocytes and aortic smooth muscle cells. **Regul. Pept.** Amsterdam, v. 95, n. 1-3, p. 93-97, Nov. 2000.

MURPHEY, L. J. et al. Metabolism of bradykinin In vivo humans: identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 294, n. 1, p. 263-269, Jul. 2000.

NASJLETTI, A.; COLINA-CHOURIO, J.; MCGIFF JC. Disappearance of bradykinin in the renal circulation of dogs. Effects of kininase inhibition. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 59-65, Jul. 1975.

ÖZCAN, C. et al. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. **Burns**, Amsterdam, v. 28, n. 8, p. 791-794, Dec. 2002.

PAREJA-SANTOS, A. et al. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 90, n. 1, p.34-43, Feb. 2009.

PAULA, C. A. et al. Purification and substrate specificity of na angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1388, n. 1, p. 227-238, Oct. 1998.

PEACH, M. J.; CLINE JÚNIOR, W. H.; WATTS, D. T. Release of adrenal catecholamines by angiotensin II. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 19, n. 3, p. 571-575, 1966.

PEREIRA, H. J. et al. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. **Peptides**, New York, v. 33, n. 1, p. 67-76, Jan. 2012.

PRIETO, I. et al. Angiotensinase activities in the kidney of renovascular hypertensive rats. **Peptides**, New York, v. 24, n. 5, p. 755-670, May, 2003.

RICE, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem. J.**; London, v. 383, pt 1, p. 45–51, Oct. 2004.

RYKL J. et al. Renal cathepsin G and angiotensin II generation. **J. Hypertens.**, London, v. 24, n. 9, p. 1797-1807, Sep. 2006.

SIVIERI, D. O. et al. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. **Hypertension**, Dallas, v. 50, n. 1, p. 110-115, Jul. 2007.

SU, J. B. Different cross-talk sites between the renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. **J. Renin Angiotensin Aldosterone System.**, Birmingham, v. 5, p. 1–10, Feb. 2013.
Disponível em:
<http://jra.sagepub.com/content/early/2013/02/05/1470320312474854.full.pdf+html> Acesso em:

SUTHERLAND, S. K. Antivenom use in Australia. Premedication, adverse reactions and the use of venom detection kits. **Med. J. Aust.**, Sidney, v. 157, n. 11-12, p. 734–739, Dec. 1992.

TOM, B. et al. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.137, n. 2, p. 276-284, Sep. 2002.

TRASK, A. J.; FERRARIO, C. M. In: VARAGIC, J. et al. New angiotensins. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 86, n. 6, p. 663, 2008. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713173/>. Acesso: 19 jan. 201

TRASK, A. J.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. **Cardiovasc. Drug Rev.**, New York, v. 25, n. 2, p. 162–174, 2007.

TURNER, A. J. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 31, pt. 3, p. 723-727, Jun. 2003.

UCHIDA, Y.; KATORI, M. Independent consumption of high and low molecular weight kininogens in vivo. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 198, pt. A, 1986, p 113-118, 1986.

URA, N.; CARRETERO, O. A.; ERDÖS, E. G. Role of renal endopeptidase 24.11 in kinin metabolism in vitro and in vivo. **Kidney Int.**, New York, v. 32, n. 4, p. 507-513, Oct. 1987.

URATA, H. et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 36, p. 22348-22357, Dec. 1990.

VARAGIC, J. et al. New angiotensins. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 86, n. 6, p. 663-671, Jun. 2008.

VELEZ, J. C. et al. Angiotensin-I is largely converted to angiotensin-(1-7) and angiotensin-(2-10) by isolated rat glomeruli. **Hypertension**, Dallas, v. 53, n. 5, p. 790-797, May, 2009.

VELEZ, J. C. et al. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 293, n. 1, p. F398-F407, Jul. 2007.

VIRDIS, A. et al. Adenosine causes the release of active renin and angiotensin II in the coronary circulation of patients with essential hypertension. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 33, n. 6, p.1677-1684, May, 1999.

WEI, C. C. et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme– and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo. **Circulation**, Dallas, v. 99, n. 19, p. 2583-2589, May, 1999.

WOLNY, A. et. al. Functional and biochemical analysis of angiotensin ii–forming pathways in the human heart. **Circ. Res., Baltimore**, v. 80, n. 2, p. 219-227, Feb.1997.

ZIMMERMAN, J. B.; ROBERTSON, D.; JACKSON, E. K. Angiotensin II-noradrenergic interactions in renovascular hypertensive rats. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 80, n. 2, p. 443-457, Aug. 1987.