

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR-PMBqBM**

MARIA ELIZABETH DA COSTA MARQUES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA DA PEÇONHA DO *Thalassophryne nattereri***

**MACEIÓ
2018**

MARIA ELIZABETH DA COSTA MARQUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA DA PEÇONHA DO *Thalassophryne nattereri*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Biológicas, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia

MACEIÓ

2018

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

M357i Marques, Maria Elizabeth da Costa.
Isolamento e caracterização de uma enzima conversora de angiotensina da
peçonha do *Thalassophryne nattereri* / Maria Elizabeth da Costa Marques. – 2018.
74 f.: il.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira
Coorientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia.
Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular.
Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 56-74.

1. Enzima conversora de angiotensina. 2. *Thalassophryne nattereri*. 3. Peçonha.
I. Título.

CDU: 577.15

MARIA ELIZABETH DA COSTA MARQUES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA DA PEÇONHA DO *Thalassophryne nattereri*

Tese submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Ciências Biológicas (Área de Concentração Bioquímica e Biologia Molecular) ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 22/05/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
(Universidade Federal de Alagoas)
Orientador

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinador Interno

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Edma Carvalho de Miranda
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Beatriz Tupinambá Freitas
(Universidade Federal de Sergipe)
Examinador Externo

À minha mãe, **Luiza**, exemplo de mulher, pelo amor, dedicação, apoio, conselhos e pelo esforço para minha educação e formação.

Aos meus irmãos **Elisangela**, **Luiz Carlos** e **Filho**, pelo amor, apoio, companheirismo em todos os dias de minha vida.

As minha avós e tias que sempre torceram por mim.

A todos os meus amigos que se fizeram presentes nesta jornada.

Ao meu orientador **Hugo Juarez**, pelos ensinamentos, paciência e por ter dividido comigo este projeto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade e ter me permitido chegar até aqui.

À minha mãe sempre meu porto seguro, minha base, a quem devo tudo que sou, que se fez de pai e mãe. É a pessoa que me entende sem eu precisar dizer nada.

À minha Família pelo apoio e confiança.

À Dona Teresa e Seu Manoel, pelo carinho, atenção e cuidado. Sou muito grata por ter vocês em minha vida!

À meu namorado Jandson, pelas vezes que tentou me distrair nos meus momentos de estresse, pelo incentivo de sempre para me fazer crescer profissionalmente e como pessoa, pela confiança e pela amizade.

Ao meu orientador Hugo Juarez, pela confiança em mim depositada no desenvolvimento deste projeto, pelos ensinamentos e pelas contribuições e apoio para minha carreira.

À todos os meus professores, grandes mestres de profissão e da vida, e nestes eu destaco as professoras Edma e Beatriz por enxergarem os alunos além do espaço acadêmico. Tenho uma grande admiração por vocês.

À todos os meus amigos de Laboratório que contribuíram para que este objetivo fosse alcançado, especialmente a Humberto, pela parceria e por compartilhar comigo os seus conhecimentos e experiências quanto a este trabalho; Cláudio e Ricardo pelas ajudas na bancada, pelo apoio, confiança e amizade.

À todas as meninas do pensionato, pelos bons momentos vividos com vocês.

Aos meus amigos de longe e de perto (Thomaz, Janaina, Gabi, Laís, Fabi, Kleyton, Dávida, Marta, João, Nicolás, Monize, Cledson e Roberto) pela amizade e torcida.

As minhas amigas Brunna, Magal, Maria, Karine, Tati e Cil por tudo que vocês fazem e fizeram.

Ao pessoal dos outros laboratórios pela sempre disponibilidade em ajudar.

Muito Obrigada.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”

(Charles Chaplin)

RESUMO

As peçonhas animais são misturas complexas que incluem peptídeos, proteínas, enzimas e outros compostos produzidos para predação, digestão e defesa. Estas moléculas são investigadas pelos seus mecanismos moleculares associados à ação fisiológica e possíveis aplicações farmacológicas. Recentemente, descrevemos a presença de uma atividade conversora da angiotensina (ECA) na peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri*. A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de zinco com uma vasta gama de efeitos. Ao remover o dipeptídeo His-Leu do C-terminal, a ECA converte angiotensina I (AngI) em angiotensina II (AngII) e inativa a bradicinina pela clivagem da penúltima ligação Pro-Phe, formando peptídeos reguladores da pressão sanguínea e da homeostase de eletrólitos. Os objetivos deste estudo foram isolar e caracterizar uma enzima conversora de angiotensina contida na peçonha do *T. nattereri* e avaliar o papel vasoativo desta enzima em artéria superior isolada de rato. O fracionamento da peçonha em coluna CM-Sepharose FF de 56 mL indicou um pico (CM2) com atividade de conversão de AngI em AngII. A eletroforese em gel de poli-acrilamida (12%) revelou uma banda com 30 kDa para CM2 de tamanho semelhante às natterinas, que são toxinas com atividade proteolítica encontradas na peçonha de *T. nattereri*. A espectrometria de massa indicou que a sequência protéica da ECA purificada da peçonha de *T. nattereri* corresponde à natterina 1. A proteína isolada também demonstrou inibição pelo captopril e EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) e é caracterizada como uma ECA clássica, pela atividade conversora apresentada *in vitro* e pelo perfil de inibição. Apesar de tal evidência, o peso molecular não se aproxima ao da ECA humana. Com estes dados vê-se que esta peçonha vai de encontro à outras peçonhas, que apresentam inibidores da ECA, o que reforça a relevância deste estudo. Assim, a enzima purificada da peçonha de *T. nattereri* é a primeira ECA isolada de peçonhas de peixes. A enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha de *T. nattereri* foi capaz de promover vasorrelaxamento de maneira dose-dependente em anéis de artéria mesentérica superior de ratos com endotélio intacto e sem endotélio pré-contráídos com Fenilefrina, demonstrando um efeito antagônico ao da peçonha. A identificação desta protease produtora de um peptídeo vasoativo na peçonha de *T. nattereri*, destaca o seu papel no empeçonhamento e melhora a nossa compreensão geral do processo de ação das peçonhas de animais marinhos.

Palavras-chave: Enzima Conversora de Angiotensina, natterinas, peçonha

ABSTRACT

The animal poisons are complex mixtures that comprise peptides, proteins, enzymes and other elements produced by animals for predation, digestion and defense. These molecules were investigated for their molecular mechanisms associated with physiological action and possible pharmacological applications. Recently, we describe the presence of angiotensin converting activity (ACE) in fish poison *Thalassophryne nattereri*. ACE is a zinc dependent dipeptidyl carboxypeptidase with a wide range of effects. By removing the His-Leu dipeptide from the C-terminal, an ACE converts angiotensin I (AngI) to angiotensin II (AngII) and inactivates bradykinin by cleaving the penultimate Pro-Phe binding, thereby forming peptides regulating blood pressure and homeostasis Electrolyte. The objective of this study was to isolate and characterize an angiotensin converting enzyme contained in the poison of *T. nattereri* and the vasoactive role of the enzyme in upper isolated rat artery was appreciated. The fractionation of the *T. nattereri* poison in 56 ml CM-Sepharose FF column, indicated a peak (CM2) with angiotensin converting activity, converting AngI to AngII. A polyacrylamide gel electrophoresis (12%) revealed a 30 kDa band for CM2 of size for natterins, which are toxins with proteolytic activity found in a *T. nattereri* poison. Mass spectrometry indicated that the ACE protein sequence purified from *T. nattereri* poison corresponds to natterin 1. The isolated protein also demonstrated inhibition by captopril and EDTA and was characterized by a classic ACE, by an activity *in vitro* and by a model of inhibition. Despite such evidence, the molecular weight does not resemble human ACE. With this data it is seen that this poison goes against other venoms, which present ACE inhibitors, which reinforces the relevance of this study. Thus, an isolated enzyme purified from *T. nattereri* poison is a first isolated fish ECA. The angiotensin-converting enzyme isolated from *T. nattereri* venom was able to promote dose-dependent vasorelaxation in the superior mesenteric artery rings of rats with intact endothelium and without endothelium pre-contracted with phenylephrine, demonstrating an antagonistic effect to the venom. The identification of this protease producing a vasoactive peptide in the venom of *T. nattereri*, highlights its role in the poisoning and improves our general understanding of the action process of marine animal venoms.

Key words: Enzyme converting of angiotensin, natterin, poison

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Espécime de Niquim	17
Ilustração 2 - Aparato inoculador de peçonha do <i>Thalassophryne nattereri</i>	18
Ilustração 3 - Principais manifestações pelo empeçonhamento do <i>Thalassophryne nattereri</i> em humanos	19
Ilustração 4 - Representação da cascata do sistema Renina-Angiotensina e sua interação com o metabolismo da Bradicinina.....	25
Ilustração 5 - Sistema Renina-Angiotensina vascular.....	26
Ilustração 6 - Perfil Cromatográfico da peçonha do <i>Thalassophryne nattereri</i>	43
Ilustração 7 - Perfil cromatográfico do ensaio de atividade enzimática.....	44
Ilustração 8 - Perfil eletroforético da peçonha e fração CM2 isolada da peçonha do <i>Thalassophryne nattereri</i>	45
Ilustração 9 - Sequenciamento da proteína Natterina-1	46
Ilustração 10 - Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos das Natterinas	49
Ilustração 11 - Perfil cromatográfico de inibição da enzima conversora isolada da peçonha de <i>Thalassophryne nattereri</i>	51
Ilustração 12 - Curva concentração-resposta da enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha do peixe <i>Thalassophryne nattereri</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACH	Acetilcolina
ACP	Carboxipeptidase A
ANG	Angiotensina
ANOVA	Análise de Variância
AP	Aminopectidase
BSA	Albumina Sérica Bovina
AT	Receptor de Angiotensina
BK	Bradicinina
CAGE	Enzima Geradora de Ang II Sensível à Quimostatina
CATA	Catepsina-A
cDNA	Ácido Desoxirribonucleíco Complementar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EST	Etiqueta de Sequencia Expressa
FDA	Food and Drug Administration
FEN	Fenilefrina
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
IL	Interleucina
IRAP	Aminopectidase Regulada por Insulina
MALDI-TOF	Ionização/Desorção à Laser Assistida por Matriz
MLCP	Fosfatase da Cadeia Leve da Miosina
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MS	Mass Spectrometry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Neprilisina
OAT	Transportador de Anions Orgânicos
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

PKC	Proteína Kinase C
PMSF	Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil
PMT	Placa de Microtitulação
PRCP	Prolilcarboxipeptidase
POP	Prolil oligopeptidase
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
	Ácido Trifluoracético
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOP	Timeth Oligopeptidase
	Células Musculares Vasculares Lisas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.	Empeçonhamento pelo peixe <i>Thalassophryne nattereri</i>	17
2.2.	A peçonha do <i>Thalassophryne nattereri</i>	20
2.3.	Sistema renina-angiotensina.....	22
2.3.1	Enzima conversora de angiotensina	29
2.4.	SRA e peçonhas de peixes	33
3	OBJETIVOS	37
3.1.	Objetivo geral.....	37
3.2.	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODO	38
4.1.	Extração da peçonha	38
4.2.	Quantificação protéica	38
4.3.	Ensaio enzimático de atividade conversora de angiotensina	38
4.4.	Cromatografia líquida de alta eficiência	39
4.5.	Purificação protéica.....	39
4.6.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	39
4.7.	Ensaio enzimático de inibição da enzima conversora de angiotensina.....	40
4.8.	Análise de espectrometria de massas e identificação da proteína.....	40
4.9.	Alinhamento de sequências.....	41
4.10.	Preparação da artéria mesentérica superior isolada de rato	41
4.11.	Avaliação do efeito da enzima isolada da peçonha de <i>T. nattereri</i> (fração CM2) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN	42
4.12.	Análises estatísticas	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Animais de diferentes filos desenvolveram poderosas secreções e peçonhas as quais são verdadeiros arsenais químicos que atuam sobre o sistema biológico com grande afinidade por seus alvos fisiológicos em presas/predadores. Estas são envolvidas em imobilização, necrose ou morte, atuando como ferramentas que aumentam a eficiência do ataque, captura ou digestão de alimentos, contribuindo para defesa. (Cassoli et al, 2013; Lopes-Ferreira et al., 2004).

Dentre os animais venenosos, encontram-se os peçonhentos, que apresentam glândula de peçonha que se comunica com um aparelho especializado (dentes, ferrões, agulhões) que é usado para inoculação da peçonha no organismo de outro animal. Animais venenosos não-peçonhentos não apresentam aparelho inoculador de veneno. De forma geral, uma peçonha é uma mistura complexa de múltipla composição química, produzida por um organismo em um tecido especializado, que é liberada ativamente por meio de mordidas, picadas ou ferroadas. A maioria das peçonhas animais é composta por misturas complexas de compostos bioativos, compreendendo, em grande parte, peptídeos e proteínas. A composição e alvos de uma peçonha podem ser usados para inferir sua função (Kundu et al., 2015).

Entre as peçonhas animais, as de peixes estão entre as menos estudadas. Isso se deve ao fato dos 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 estudadas, uma vez que é mais difícil capturar os espécimes marinhos e extrair a peçonha (Khoo, 2002; Church e Hodgson, 2002); e também pela natureza lábil das biomoléculas presentes nestas peçonhas (Schaeffer et al., 1971; Carrijo et al., 2005). Grande parte das toxinas bioativas das peçonhas de peixes são proteínas termolábeis de alta massa molecular, as quais são mais susceptíveis à desnaturação (Garnier et al., 1995; Church e Hodgson, 2002) e à ação de enzimas proteolíticas que hidrolisam outras proteínas bioativas presentes na peçonha (Carrijo et al., 2005). Entre peixes venenosos da mesma espécie podem ocorrer oscilações na produção de veneno, bem como diferenças na composição e potencial tóxico (Garnier et al., 1995).

Assim como as peçonhas de animais terrestres, peçonhas de animais aquáticos apresentam uma enorme diversidade e complexidade de componentes farmacologicamente

ativos, incluindo toxinas peptídicas e protéicas, sais e moléculas orgânicas tais como aminoácidos e neurotransmissores (Fry et al., 2009; Lewis e Garcia, 2003).

Venenos de animais são amplamente reconhecidos como excelentes fontes para a descoberta de novas drogas e ferramentas fisiológicas (Ziegman e Alewood, 2015). Muitas pesquisas têm se voltado para a descoberta de novos fármacos oriundos de peçonhas após a caracterização de peptídeos isolados da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*. Ferreira (1965) identificou o efeito potencializador da Bradicinina (BK) e a partir deste se tornou possível o protótipo do primeiro anti-hipertensivo comercial pertencente à classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), o Captopril®.

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. *Thalassophryne nattereri* pertencente a família *Batrachoididae* é um animal peçonhento que habita lagoas ou áreas estuarinas. Peixes desta família são chamados peixe-sapo por causa da aparência e são cobertos por um muco pegajoso. Também conhecido como *Niquim* na costa brasileira, este peixe possui um par de espinhos ocos e afiados inoculante de peçonha na região dorsal e na altura das barbatanas cobertos por uma membrana e conectados a glândula de peçonha. Quando o espinho penetra o tecido da vítima, a membrana se rompe e pressiona a glândula, a qual libera seu conteúdo, para o interior do tecido. Os acidentes ocorrem frequentemente com pescadores e banhistas desavisados (Lopes-Ferreira et al., 2014).

Este trabalho buscou investigar as atividades proteolíticas sobre angiotensinas apresentadas na peçonha do *T. nattereri* a partir dos sintomas observados como edema, dor intensa e eritema. Uma metaloprotease homóloga à ECA foi isolada da peçonha do *T. nattereri* e identificada como natterina-1. Esta enzima é responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II (um peptídeo vasoconstrictor) indicando um efeito fisiológico diferente das demais peçonhas estudadas, as quais possuem peptídeos inibidores da ECA (Ferreira et al., 1970; Politi et al., 1985; Higuchi et al., 1999). Este é o primeiro estudo que apresenta o isolamento e caracterização de uma ECA em peçonhas de peixes. A identificação desta protease

produtora de vasoativo na peçonha de *T. nattereri* destaca seu papel no empoçamento e melhora a compreensão dos processos fisiológicos gerais que desencadeia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Empeçonhamento pelo peixe *Thalassophryne nattereri*

O *Thalassophryne nattereri* é um peixe peçonhento da família Batrachoididae, de porte pequeno (12 e 15 cm) com olhos largos e salientes, uma cabeça grande e boca ampla, como pode ser visto na Figura 1. Peixes desta família são chamados, na costa brasileira, de peixe-sapo por causa da aparência, e também como Niquim. É carnívoro, não apresenta escamas e todo corpo é coberto por um muco pegajoso, sendo comumente encontrado enterrado na lama em águas rasas (Lopes-Ferreira et al., 2014).

Ilustração 1 - Espécime de Niquim



Espécime de Niquim (*Thalassophryne nattereri*) coletado na Lagoa Mundaú, em Macéio, Alagoas. Fonte: Autoria própria, 2017.

O Niquim possui um dos mais completos aparatos inoculadores de veneno (Figura 2), apresentando glândulas conectadas a acúleos ocos. Dois acúleos dorsais (localizados na região anterior à nadadeira dorsal) estão situados um após o outro na linha mediana com tamanhos diferentes, sendo o primeiro deles maior, e os dois acúleos operculares estão situados acima das barbatanas peitorais. Esses acúleos são caniculados, de forma cônica, pontiagudos, articulam-se com o plano ósseo subjacente e estão em parte recobertos por uma bainha que oculta o acúleo quase completamente, permitindo que a peçonha seja injetada sob pressão ao pisar ou apertar o peixe, acometendo assim, na maioria das vezes, a região plantar ou palmar das vítimas. Os

quatro espinhos eriçam-se de vez e perfuram o tegumento; ocorrendo a imediata liberação de peçonha, pela glândula (Facó, 2005).

De acordo com Fonseca e Lopes-Ferreira (2000), a palma das mãos e as solas dos pés de pescadores e banhistas são as áreas mais afetadas (Figura 3).

Ilustração 2 - Aparato inoculador de peçonha do *Thalassophryne nattereri*



As setas indicam o par de espinhos da região dorsal e o espinho na altura da barbatana.
Fonte: Autoria própria, 2015.

Os principais sintomas incluem edema, eritema e dor intensa que se desenvolvem poucos minutos depois do acidente, tanto em vítimas humanas quanto em animais experimentais (Fonseca e Lopes-Ferreira, 2000). Estes sintomas são seguidos pela ruptura de bolhas com conteúdo seroso além de necrose que persiste por muitos dias e uma resposta de cicatrização muito pobre. Efeitos locais ainda incluem efeito miotóxico com dano muscular e dificuldade de regeneração (Lopes-Ferreira et al., 2001). A ineficiência de cicatrização é muito importante para a evolução da injúria, a qual é desprovida de tratamentos específicos e terapias medicamentosas (Lopes-Ferreira et al., 2000; Lopes-Ferreira et al., 2001; Haddad Júnior et al., 2003). Segundo o estudo epidemiológico de Neves et al., (2018) pescadores entrevistados afirmaram não procurar atendimento médico e relataram tomar como medidas para diminuir os sinais apresentados após o empeçonhamento por *T. nattereri*: aplicar no local da lesão compressas com água, folhas e óleos quentes; massagem com unguentos (pomadas que

apresentam atividade revulsiva), amoníaco (ou amônia – NH_3 , substância normalmente utilizada como produto de limpeza), analgésico não discriminado; ingestão de bebidas alcoólicas e limão, além do uso do “loló” (solventes como o clorofórmio e o éter) para passar o efeito da dor; acidentados também relataram bater no local da lesão com a intenção de “espalhar o veneno” e perfurar a lesão causando uma sangria, para que parte do veneno fosse liberado junto com o sangue.

Ilustração 3 - Principais manifestações pelo empeçonhamento do *Thalassophryne nattereri* em humanos



As áreas mais afetadas são as mãos e os pés que apresentam edema e eritema logo após o empeçonhamento, seguido de formação de bolhas e necrose.

Fonte: Lopes-Ferreira et al., 2014.

No pequeno número de empeçonhados que busca assistência médica, é feita a limpeza e assepsia do local que entrou em contato com o espículo, retirada de possíveis fragmentos, administração de antibióticos e anti-inflamatórios (Neves et al., 2018). A maioria dos acidentes com *T. nattereri* ocorre nas comunidades brasileiras de pescadores e devido à falta de uma eficiente terapia, as vítimas podem passar semanas ou até meses para poder retornar ao trabalho quando não adquirem incapacidades permanentes. O empeçonhamento representa um grande custo para as comunidades do Norte e Nordeste do Brasil em termos de saúde pública (Fonseca e Lopes-Ferreira, 2000; Facó et al., 2005). Levantamentos epidemiológicos sobre acidentes com peixes peçonhentos são escassos no Brasil. Estima-se que centenas de acidentes ocorram todos os anos, mas que a incidência seja subestimada porque os pacientes raramente procuram cuidados médicos por conta da falta de eficácia (Neves et al., 2018).

O tratamento atual para os acidentes com *T. nattereri* inclui além das medidas já citadas, a imersão do tecido lesionado em água morna. Estes procedimentos não reduzem os sintomas agudos do acidente, sendo efetivo somente para prevenção de infecções secundárias (Lopes-Ferreira et al., 2014). A compreensão dos mecanismos que regulam os eventos inflamatórios do empeçonhamento contribui para o desenvolvimento de eficientes terapias.

Agentes antiinflamatórios do tipo esteroidal e não esteroidal e inibidores de serotonina não foram capazes de reduzir a nocicepção e o edema induzidos pela peçonha *T. nattereri* em ratos, mas elas foram reduzidas pela administração de um inibidor específico de caliceína tecidual, o mesmo não ocorrendo para inibidores específicos e não específicos de caliceína plasmática (Lopes-Ferreira et al., 2004).

2.2. A peçonha do *Thalassophryne nattereri*

A peçonha do *T. nattereri* mostra atividades proteolíticas, hemolíticas e miotóxicas, mas é destituída de atividade da fosfolipase A2, atividades coagulantes e não apresenta efeito hemorrágico e nem ação neurotóxica (Lopes-Ferreira et al., 1998). Análises intravitalis do músculo cremaster mostraram que a peçonha provoca uma alteração peculiar na microcirculação com trombose em vênulas, intensa congestão vascular, e com constrições transientes em arteríolas sem induzir hemorragia (Lopes-Ferreira et al., 2002). Alterações significantes nas paredes dos vasos ocorreram poucos minutos depois da administração da peçonha, com aumento da espessura e depósito de fibrina (Lopes-Ferreira et al., 2002). A injeção da peçonha na pata de camundongos aumentou a expressão de RNAs para os genes de IL-6, IL-1b e TNF- α , assim como a liberação destas citocinas solúveis. Também foram verificadas áreas com abundantes fibras necróticas e ausência de infiltração de leucócitos na região intraplantar da pata do camundongo, depois da aplicação da peçonha (Lopes-Ferreira et al., 2001; Lima et al., 2003).

Pareja-Santos e colaboradores (2009) mostraram que a peçonha de *T. nattereri* alterou a estrutura da matriz extracelular do tecido da pata do camundongo pela ativação de metaloproteases da matriz (MMP-2 e MMP-9), além da diminuição do conteúdo de fibra de colágeno durante a fase de cicatrização.

Estes dados inferem um papel ambíguo para a peçonha no processo inflamatório. Por um lado, ela mostra uma potente atividade pró-inflamatória, ilustrada pela detecção de um

aumento de quimioatraentes, e, por outro lado, também afeta a capacidade de cicatrização tecidual devido à desorganização da matriz extracelular causada pelo aumento nas atividades de MMPs e pela deficiente infiltração de células inflamatórias (Ferreira et al., 2014).

A ação da peçonha no endotélio contribui para estase sanguínea e a formação de plaquetas e trombos de fibrina, com conseqüente isquemia associada a um baixo fluxo de células inflamatórias para as lesões locais, conseqüência de um fluxo sanguíneo prejudicado em vênulas de tecidos injuriados e efeito citotóxico dos componentes da peçonha às células inflamatórias. A peçonha afeta a organização do citoesqueleto e a formação de pseudopodia de células epiteliais (Lopes-Ferreira et al., 2002; Lima et al., 2003).

A grande diversidade de efeitos desta peçonha, o potencial farmacológico para aplicação das toxinas e a falta de informação sobre peçonhas de peixes foram razões que levaram ao catálogo das toxinas presentes na peçonha de *T. nattereri*, usando a abordagem da etiqueta de sequencia expressa (EST). A realização desta tarefa foi possível por meio de uma biblioteca de cDNA a partir das glândulas de peçonha e do sequenciamento parcial destes cDNAs, gerando centenas de ESTs (Magalhães et al., 2006a).

Combinações de técnicas transcriptômicas e proteômicas foram usadas para analisar a complexidade da peçonha de *T. nattereri* e revelaram a identidade das principais toxinas como uma família de novas proteínas com atividade cininogenásica- as Natterinas. A nível funcional, as Natterinas mostram uma atividade cininogenásica e, portanto, podem ativar cininogênios inativos, liberando cininas ativas, as quais estão associadas com os efeitos de nocicepção e edema, assim como a peçonha (Lopes-Ferreira et al., 2004).

Chamadas de Natterinas 1 - 4 e P, estas novas proteínas mostram suas sequencias relacionadas e nenhuma semelhança significativa com calicreínas teciduais ou quaisquer outras proteases. Estas proteínas recém descobertas apresentam peso molecular da faixa de 30 a 45kDa (Magalhães et al., 2005; Magalhães et al., 2006a). Natterinas 1 e 2 têm uma homologia de sequência de 84%. Quando se compara estas duas com as natterinas 3 e 4, elas mostram uma identidade de cerca de 40%. Tomando a natterina 1 como referência, a natterina 2 possui uma extensão no C-terminal de 20 resíduos de aminoácidos incluindo um motivo catiônico-hidrofóbico, que frequentemente aparece em citotoxinas. Já as natterinas 3, 4 e P, apresentam uma inclusão na região N-terminal de 15, 38 e 37 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Natterina P é a mais curta entre as natterinas e apresenta 84% de homologia de sequencia com

a Natterina 4 (Magalhães et al., 2005). Estes mesmos autores também sugerem que o gene da família das Natterinas talvez esteja sofrendo uma evolução acelerada.

Uma vez que as Natterinas são os principais componentes da peçonha do *T. nattereri*, estas foram isoladas e submetidas à bioensaios correspondentes aos seus principais efeitos: nocicepção e edema (Magalhães et al., 2005). Os principais componentes da peçonha também foram avaliados, por microscopia intravital da microcirculação do músculo cremaster, depois da administração intraescrotal das natterinas e foram observados mionecrose, contração arteriolar e estase venular (Lopes-Ferreira, 2002; Ferreira et al., 2014).

Komegae e colaboradores (2011) demonstraram a habilidade das Natterinas para se ligar e clivar os colágenos tipo I e tipo IV, rompendo a aderência celular e sobrevivência de células HeLa da linhagem adenocarcinoma humano (CCL-2). Estas novas proteínas têm efeito citotóxico tanto em células aderentes quanto em suspensão, mostrando uma capacidade direta de indução de necrose que é seguida pelo descolamento celular.

A peçonha também contém uma lectina pertencente à família de lectinas tipo-C, chamada Nattectina, que mostrou atividade hemaglutinante independente de Ca^{2+} e induziu uma mobilização persistente de neutrófilos em camundongos, colocando os organismos marinhos também como fonte de agentes imunomodulatórios (Lopes-Ferreira, 2011).

Ensaio *in vivo* e *in vitro* das toxinas isoladas da peçonha permitiram verificar que componentes da matriz extracelular são alvo para natterinas e nattectina possibilitando entender melhor os mecanismos de patogênese da peçonha e elucidar o papel das suas principais toxinas (Komegae et al., 2011).

2.3. Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) não é apenas um sistema endócrino, mas também um parácrino e um sistema intrácrino (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). Em mamíferos, o SRA intravascular desempenha um papel chave na manutenção e homeostasia da pressão arterial e no balanço de líquidos e sal. O SRA local ou tecidual está envolvido em fatores fisiológicos e processos patológicos tais como crescimento e remodelação de tecidos, desenvolvimento e inflamação (Nguyen e Contrepas, 2008). Em um SRA clássico, o substrato angiotensinogênio, que é liberado na circulação pelo fígado, é degradado pela enzima Renina que se origina no

rim, gerando a Angiotensina I (Ang I) inativa (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). Quando este decapeptídeo sofre a ação da enzima conversora da angiotensina-I (ECA) na superfície endotelial dos vasos sanguíneos, o dipeptídeo C-terminal é clivado, dando origem à angiotensina II (Ang II) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), o principal efetor do SRA, que apresenta uma potente ação vasoconstritora (Guang et al., 2012). O angiotensinogênio, por sua vez, corresponde a uma globulina que circula no plasma em quantidades abundantes. O angiotensinogênio humano contém 452 aminoácidos e sua síntese é estimulada por vários hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônio tireoidiano e pela própria Ang II (Bem-Ari e Garrison, 1988). A enzima responsável pela clivagem do angiotensinogênio, a renina, é uma glicoproteína que contém 340 aminoácidos e foi considerada inativa, na forma de pró-renina, até a clonagem de um receptor de pró-renina humano em 2002. Este receptor é uma proteína de membrana que se liga tanto a renina quanto a pró-renina, agindo como amplificador para o SRA. (Danser et al., 2005; Nguyen et al., 2002; Cat e Touyz, 2011).

O SRA consiste atualmente em vários eixos que incluem mais de duas dezenas de peptidases, cerca de uma dúzia de fragmentos de Angiotensina e pelo menos seis receptores diferentes, como pode ser visto na Figura 4.

Ang II medeia seus efeitos via ligação a receptores específicos na superfície celular. Receptores de Ang II no sistema cardiovascular se dividem em dois subtipos: Ang II tipo 1 (AT1) e Ang II tipo 2 (AT2). Os receptores AT são membros da família de receptores ligados à proteína G com sete regiões transmembranas. Os efeitos farmacológicos principais de Ang II são atribuídos a sua interação com AT1, enquanto os receptores AT2 se opõem e contrabalaçam estes efeitos, exercendo papéis protetores (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). Os receptores AT compartilham 34% de homologia na sequência de aminoácidos (Grady, 1991). O receptor AT2 está amplamente distribuído nos tecidos fetais e em adultos sua distribuição é mais restrita (Cheng et al., 2005).

Além da via da ECA, vias alternativas formadoras de Ang II nos tecidos, incluem: Catepsina G, enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina (CAGE), Quimase, Tonina, o Ativador de plasminogênio tecidual (Gibbon et al., 1994) e elastase-2 (Paula et al., 1998). Tem sido estimado que no homem, pelo menos 40% do total de Ang II é formado por vias independentes da ECA, inferindo que a completa supressão do SRA não pode ser alcançada só com a inibição da ECA (Petrie et al., 2001; Hollenberg et al., 1998). Vários tecidos, como os

de cérebro, rins, adrenais, coração e vasculatura (Figura 5) contêm todos os componentes do SRA e dessa forma, são capazes de produzir Ang II localmente (Bader et al., 2001). Curiosamente, a resposta inflamatória vascular está mais estritamente relacionada a Ang II local do que a Ang II circulante (Shimizu et al., 1998).

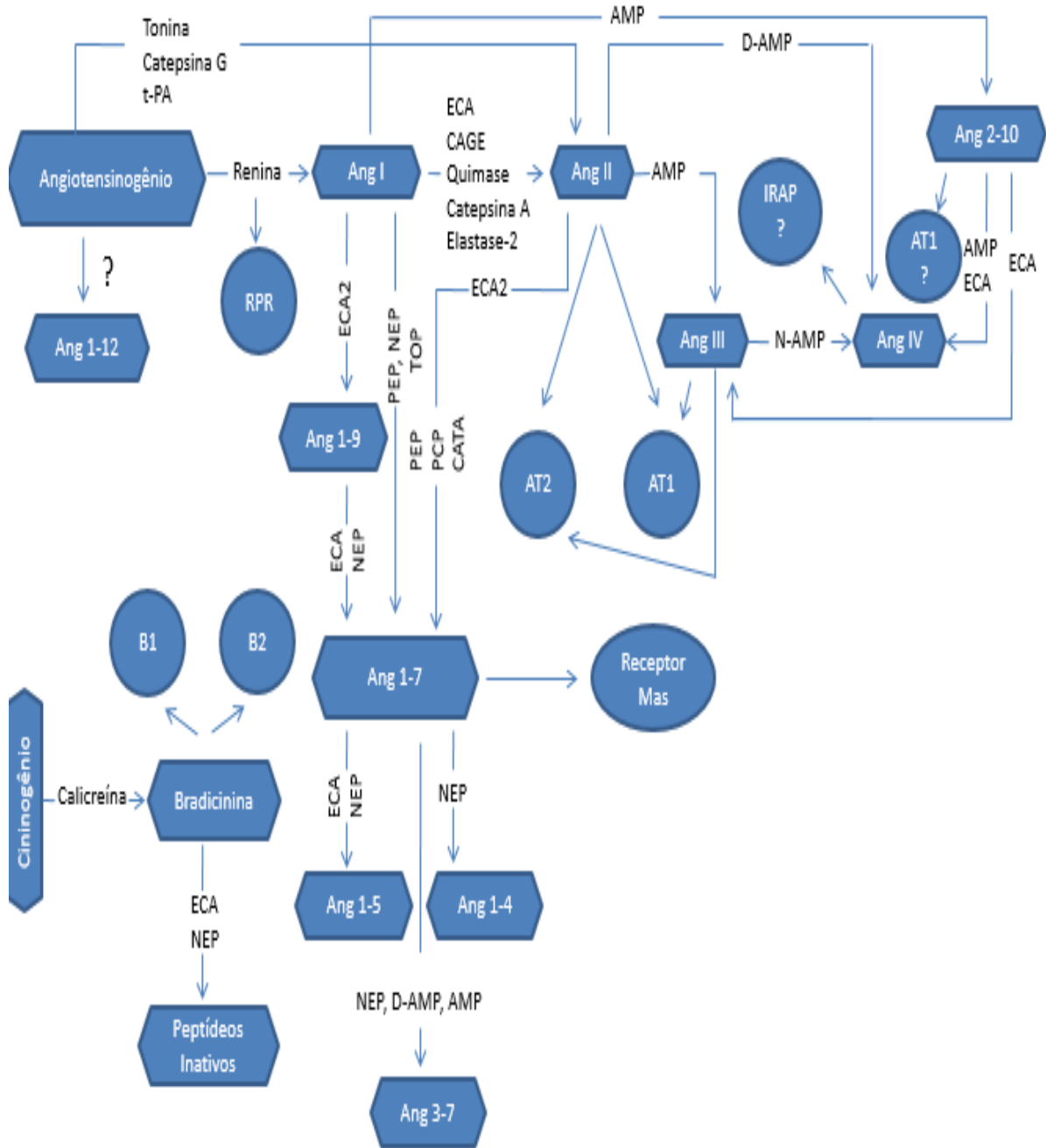
A expressão de renina, angiotensinogênio, ECA, Ang I e Ang II tem sido detectada pelos níveis de mRNA e proteínas nas veias safena e umbilical, em grandes artérias condutoras (aorta) e pequenas artérias de resistência (principalmente dentro do endotélio) (Agoudeiros e Greene, 2005; Oliver e Sciacca, 1984; Paul et al., 1993; Swales e Samani, 1993).

A concentração de Ang II e seus metabólitos ativos podem variar entre os tecidos já que a regulação do SRA se dá localmente, dessa forma estas concentrações podem ser maiores nos vasos do que no plasma (Danser, 2003). Com relação à expressão da renina, que se apresenta pouco na parede do vaso, parece provável que o receptor de pró-renina vascular tenha um papel crucial em capturar a renina circulante (Cat e Touyz, 2011) (Figura 5).

Na vasculatura, AT1 está principalmente nas células musculares lisas vasculares (VSMCs) e a maioria dos efeitos cardiovasculares é mediada por esses receptores. A estimulação dos receptores AT2 antagoniza os efeitos cardiovasculares mediados pelo receptor AT1. Ang II é uma molécula chave que regula a adesão de leucócitos na parede arterial em doenças cardiovasculares e adesão de monócitos e neutrófilos nas células endoteliais através do aumento de mediadores pró-inflamatórios (Dzau 1984a, Dzau 1984b, Dzau, 1993).

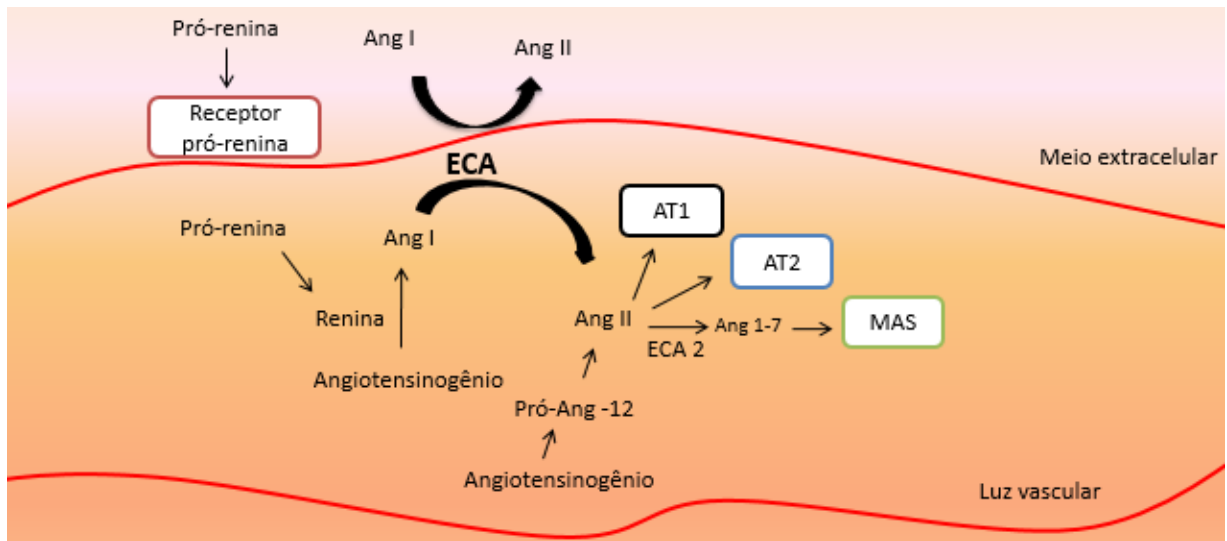
Ang II induz a expressão de fatores vasoativos, tais como endotelina e aldosterona, e aumenta a ativação do sistema nervoso simpático (Wolf e Wenzel, 2004). Estes fatores, por sua vez, exibem efeitos modulatórios de crescimento (Cheng et al., 2005).

Ilustração 4 - Representação da cascata do sistema Renina-Angiotensina e sua interação com o metabolismo da Bradicinina



Fluxograma das vias metabólicas representadas mostra a geração dos principais produtos e as interações entre tais vias. ECA (enzima conversora de Angiotensina), Ang (Angiotensina), AMP (aminopeptidase), AT1 (receptor tipo 1), AT2 (receptor tipo 2), Mas (receptor de Ang 1-7), B1 (receptor tipo 1 da Bradicinina), B2 (receptor tipo 2 da Bradicinina), DAMP (dipeptidil-aminopeptidase), t-PA (ativador do plasminogênio tecidual), IRAP (aminopeptidase regulada por insulina), PCP (prolilcarboxipeptidase), PEP (prolilendopeptidase), NEP (endopeptidase neutra 24.11), N-AMP (Aminopeptidase N), TOP Thimet[®] oligopeptidase, CATA (Catepsina A), CAGE (Enzima geradora de Ang II sensível a quimostatina), RPR (Receptor de pró-renina). As setas indicam a conversão enzimática de um peptídeo em outro ou os receptores nos quais podem ligar-se.
Fonte: Autoria Própria, 2017.

Ilustração 5 - Sistema Renina-Angiotensina vascular



Receptor de pró-renina no sistema vascular para a captura da pró-renina circulante e a formação de Ang II por uma via independente da ECA, envolvendo Ang 1-12. ECA (enzima conversora de Angiotensina), Ang (Angiotensina), AT1 (receptor tipo 1), AT2 (receptor tipo 2), Mas (receptor de Ang 1-7).
 Fonte: Autoria própria, 2017.

Espécies reativas de oxigênio podem ser formadas na parede vascular, VSMCs e fibroblastos por ação mediada de Ang II via AT1. Várias enzimas têm sido implicadas na formação de espécies reativas de oxigênio, mas a enzima NADP(H) oxidase parece ser a principal fonte de superóxido nos vasos, conduzindo a uma diminuição na biodisponibilidade de NO e um aumento na produção de peroxinitrito. O estresse oxidativo induzido por Ang II resulta na ativação de vários fatores de transcrição pró-inflamatórios (Cheng et al., 2005; Imanishi et al., 2008).

Através de interações com receptores, particularmente o seu receptor AT1, Ang II estimula uma grande variedade de vias de sinalização no coração, vasos sanguíneos, rins, tecido adiposo, pâncreas e cérebro. Ativação do receptor AT1 por Ang II subsequentemente ativa uma série de proteínas quinases, incluindo uma proteína quinase C (PKC). Um recente estudo mostrou que Ang II inibe a atividade de Transportador de Anions Orgânicos humano (hOAT3), internalizando-o, por meio de PKC α e sem induzir simultaneamente a internalização de Na/K-ATPase. Transportadores de Anions Orgânicos possuem papéis importantes na disposição corporal para diversas drogas clinicamente importantes (Duan et al., 2010).

Ang II induz inflamação através de mecanismos dependente e independente da pressão sanguínea (Mervaala et al., 2000). Experimentos clínicos e pré-clínicos têm revelado que o

bloqueio farmacológico do SRA com os inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1 diminui a expressão de células inflamatórias vasculares, se mostrando um efetivo tratamento em complicações cardiovasculares associadas com hipertensão, hiperlipidemias ou diabetes (Burnier e Brunner, 2000; Takai et al., 2003; Chen et al., 2001; Schoolwerth et al., 2001; Mervaala et al., 1999; Cheng et al., 2001; Cheng et al., 2003).

Considerando que Ang II é o principal produto da SRA, certamente há outros peptídeos biologicamente ativos produzidos por este sistema. A Ang II pode ser convertida em produtos peptídicos menores com atividade biológica, pela ação de aminopetidase A que remove um único aminoácido do N-terminal de Ang II para produzir Ang III (Ang 2-8). A ação adicional de aminopeptidases-N pode gerar Ang IV (Ang 3-8) que se liga e sinaliza através de receptores AT1 e AT2 (embora com menor afinidade). Ang IV também pode ser gerado a partir de Ang II por aminopeptidase D (Cat e Touyz, 2011). Um possível receptor de Ang IV é uma aminopeptidase transmembrana regulada por insulina (IRAP) (Lew et al., 2003). Ang III e IV são mais susceptíveis de serem produzidas em tecidos ricos em aminopeptidases, tais como cérebro e rim. Várias linhas de evidência sugerem que Ang III promove vasoconstrição e estimule a produção de aldosterona (Padia et al., 2008). Experimentos com Ang III *in vitro* têm permitido observar estimulação de crescimento, produção de mediadores pró-inflamatórios e deposição de proteínas da matriz extracelular (Wang et al., 2010). Ang III se liga a qualquer um dos receptores AT. Ang IV aumenta o fluxo sanguíneo renal, induz vasodilatação e melhora a função cardíaca (Yang et al., 2010). Também exerce uma série de efeitos neurais no aumento da aprendizagem e recuperação da memória, além de ter propriedades anticonvulsantes e proteger contra isquemia cerebral. O mecanismo pelo qual Ang IV interage com IRAP para exercer seus efeitos biológicos permanece sem elucidação (Cat e Touyz, 2011).

Um derivado nonapeptídico de Ang I, des-Asp1-Ang I (2-10), previne a ocorrência de lesões e distúrbios cardíacos não relacionados com infarto (Guang et al., 2012).

Ang I pode sofrer ação de Prolil endopeptidases e endopeptidase neutra produzindo Ang1-7 e este pode ser metabolizado a Ang 1-5 pela ECA. Ang 1-7 é descrito como um potente vasodilatador e atua como inibidor natural da ECA (Ferrario et al., 2004). Ang 1-9 é produzido por ação de carboxipeptidase, a partir de Ang I, e atua potencializando as ações da bradicinina, produção de óxido nítrico (NO) e regulação de plaquetas (Ocaranza et al., 2010). Outros

peptídeos incluem: Ang (3-7), importante no cérebro e rim (Ferreira et al., 2007) e Pró-Ang 1-12 que apresenta implicações na função cardíaca (Cummins, 2009).

Pró-Ang1-12 é um dodecapeptídeo derivado do angiotensinogênio. O referido peptídeo pode servir como substrato alternativo para a produção de Ang II local. Pró-Ang 1-12 tem função vasoconstrictora por mecanismos dependentes de ECA e quimase. Seus efeitos patofisiológicos vasculares permanecem desconhecidos (Bujak-Gizycka et al., 2010; Cat e Touyz, 2011).

Uma homóloga da ECA, conhecida como enzima conversora de angiotensina-2 (ECA2) foi clonada por dois grupos de pesquisa (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). Estudos sugerem que ECA2 regula negativamente o SRA ativado, pela degradação de Ang II para o heptapeptídeo Ang 1-7, o qual por meio do seu receptor Mas (um receptor acoplado à proteína G) contrabalança os efeitos cardiovasculares de Ang II ao se opor às muitas ações mediadas pelo receptor AT1 (Kuba et al., 2010).

ECA2 e o eixo ECA2/Ang 1-7/Mas estão se tornando o foco de investigação sobre o SRA (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). ECA2 tem aproximadamente 40% de similaridade em aminoácidos com a ECA e é também uma glicoproteína integral do tipo I ligada à membrana. Os 805 aminoácidos da ECA2 incluem um peptídeo sinal amino terminal, um ectodomínio catalítico (com o motivo de ligação ao zinco), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático carboxila-terminal. A ECA2 funciona como uma carboxipeptidase (Iwata et al., 2011).

Embora a ECA2 seja expressa de forma ubíqua em múltiplos roedores e seres humanos, sua expressão é particularmente elevada no coração, rim e testículos (Tipnis et al., 2000; Donoghue et al., 2000; Gembardt et al., 2005). ECA2 também pode sofrer modificações pós-traducionais, uma delas conhecida como liberação do ectodomínio, em que proteases (sheddas) liberam o ectodomínio como forma solúvel *in vitro* e *in vivo* (Epelman et al., 2008).

Apesar da Ang1-7 ter demonstrado efeitos benéficos em várias doenças cardiovasculares, este peptídeo tem limitada ação farmacológica devido a sua rápida rotatividade. Os análogos mais estáveis de Ang 1-7 ou agonistas do receptor Mas poderiam, no entanto, ter grande potencial como agentes terapêuticos cardiovasculares (Iwata et al., 2011).

Fibroblastos cardíacos parecem ser alvo predominante para o SRA durante o remodelamento cardíaco. A Ang II ativa funções nos fibroblastos cardíacos que aumentam a quantidade da matriz extracelular no coração durante o processo de remodelamento (Villarreal et al., 1993; Kim et al., 1995). Sugere-se que Ang 1-7 pode reduzir a deposição de tecido fibroso, particularmente em situações em que houve estimulação por Ang II (Iwata et al., 2011).

O receptor Mas exibe um perfil de expressão bastante amplo sendo detectado, além do coração e outros tecidos, também em neurônios, microglias e células endoteliais no cérebro, sugerindo um possível envolvimento na função cerebral (Shi et al., 2010, Xu et al., 2011). Além disso, a ECA2 também se mostrou expressa em todo o cérebro. Este eixo de expressão ECA2/Ang1-7/Mas evidencia um efeito amplo no sistema nervoso central, além de seu papel regulador na função cardiovascular (Mecca, 2011; Shahid, 2011).

No sistema cardiovascular sugere-se que o equilíbrio entre ECA e ECA2 possa regular os níveis e efeitos de Ang II nas patologias. A interação de Ang1-7 com Mas é capaz de alterar outras vias de sinalização, incluindo atenuação por Ang II (Iwata et al., 2005; Kostenis et al., 2005) e aumentar aquelas ativadas por BK (Peiró et al., 2007). A hidrólise de Ang II pela ECA2 é considerada uma via chave para gerar Ang1-7 em corações com insuficiência cardíaca (Zisman et al., 2003). A atividade da ECA2 solúvel é aumentada no sangue de coração com insuficiência e o nível correlaciona com a gravidade da doença (Epelman et al., 2008).

O peptídeo BK é o efector chave no sistema caliceína-cinina com potente atividade vasodilatadora, além de ser um dos principais mediadores pró-inflamatórios. A BK é degradada por duas principais cininases, uma cininase II idêntica à ECA e uma endopeptidase neutra (Figura 4). Os efeitos biológicos da bradicinina são mediados por B1 e B2. Os receptores B2 medeiam a maioria dos efeitos conhecidos desta cinina, incluindo efeitos antiproliferativos, antioxidantes, antitrombóticos e são expressos constitutivamente em muitos tipos de células (Marceau, 1995; Coelho et al., 1997; Gohlke et al., 1994; Regoli e Barabe, 1980).

2.3.1 Enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1) é uma glicoproteína monomérica que é distribuída em muitos tecidos e fluidos biológicos. Existem dois tipos de isoformas da ECA em seres humanos: a ECA somática (sECA) e a ECA testicular (tECA). A ECA somática é encontrada em muitas células endoteliais e epiteliais (Riordan, 2003) enquanto a tECA está

presente exclusivamente nas células germinais dos testículos. Apesar da ECA ser uma proteína de membrana integral do tipo I, ela pode ser liberada como uma enzima solúvel em fluidos extracelulares, tais como plasma, fluidos seminais e cerebrospinais, após clivagem proteolítica pós-traducional por uma proteína de membrana *shedase* ou secretase (Balyasnikova et al., 2002; Hooper e Turner, 2003; Parkin et al., 2004).

O dipeptídeo His-Leu pode ser clivado do peptídeo Ang 2-10 pela ECA, para produzir Ang III (2-8) (Murray e FitzGerald, 2007) que tem 40% da atividade de vasoconstrição de Ang II (Guang et al., 2012). Ang III exerce os seus efeitos, em princípio, numa semelhança à Ang II e pode ser igual ou mais importante na mediação da liberação de vasopressina (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). ECA também degrada Ang 1-9 para Ang 1-7, o qual apresenta funções opostas a Ang II por mediar vasodilatação, inibição do crescimento, respostas antiinflamatórias, efeitos antiarritmogênicos e antitrombóticos, produção de NO e inibição da produção de espécies reativas de oxigênio a partir de NADPH-oxidase (Sampaio, et al., 2007 a; Sampaio, et al., 2007 b). ECA degrada mais ainda este peptídeo para Ang 1-5, inativo (Guang et al., 2012). A ECA, denominada Cininase II, também inativa vasodilatadores como Bradicinina e calidina (Lys-Bradicinina) no sistema caliceína-cinina por clivagem do dipeptídeo Phe-Arg do C-terminal (Guang et al., 2012). A ECA eventualmente cliva o metabólito primário da bradicinina (1-7) em Bk1-5 (Sivieri Jr, et al., 2007). ECA pode afetar o sistema digestivo pela hidrólise do hormônio peptídico colecistoquinina e gastrina (Dubreuil et al., 1989). Também possui a capacidade de hidrolisar neuropeptídeos tais como encefalina (Leung et al., 1992; Lund et al., 1998), substância P, neurotensina (Skidgel et al., 1984) e LH-RH, estando a ECA, portanto, envolvida no funcionamento do cérebro e do sistema nervoso (Guang et al., 2012).

Um único gene, contendo 26 éxons, codifica para as duas isoformas da ECA humana. A forma mais longa da ECA é a somática (sECA), com 150 a 180 kDa, e é transcrita do éxon 1 até o éxon 26, excluindo o éxon 13, enquanto que a ECA testicular (tECA), mais curta, (90-110 kDa) é transcrita a partir do éxon 13 ao 26. O éxon 13 codifica uma sequência única para a região N-terminal da tECA (Hubert et al., 1991). A tECA possui papel importante na fertilidade de machos (Krege et al., 1995; Esther, et al., 1996). Ambas sECA e tECA apresentam um domínio C-terminal hidrofílico de 28 resíduos de aminoácidos, um domínio transmembrana hidrofóbico de 22 resíduos de aminoácidos que ancora a proteína na membrana e um ectodomínio N-terminal que é altamente glicosilado com manose, galactose, frutose, ácido N-acetilneuramínico e N-acetilglicosamina (Murray e FitzGerald, 2007). O ectodomínio da sECA

humana é ainda dividido em dois domínios catalíticos, cada um contendo uma sequência His-Glu-X-X-His (HEXXH) ativa. A tECA é quase idêntica ao domínio C da sECA, exceto pelos primeiros 36 resíduos (Zhang et al., 2013). Os dois domínios da sECA humana possuem em torno de 55% de similaridade de sequência. Ambos os domínios conseguem converter Ang I em Ang II com a mesma eficiência (Junot et al., 2001). A ECA circulante solúvel não possui uma porção transmembrana e nem domínio citosólico (Corradi et al., 2006).

O domínio C-terminal é o principal local de conversão de angiotensina no controle da pressão arterial e funções cardiovasculares, pois se observou que na presença de inibidores do domínio N-terminal não havia alterações nestas funções (Junot et al., 2001). Os dois domínios ativos da sECA também são sutilmente diferentes na especificidade do substrato. Eles hidrolisam a bradicinina quase igualmente, mas o sítio ativo do domínio C pode hidrolisar Ang I, substância P (Jaspard, 1993) e Hipuril-His-Leu (Corradi et al., 2007) mais eficientemente, enquanto que o sítio ativo do domínio N hidrolisa preferencialmente Ang1-7 (Deddish et al., 1998), o hormônio liberador do hormônio luteinizante (Jaspard, 1993), o peptídeo hemoregulador N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), que controla os receptores hematopoiéticos, proliferação e diferenciação de células-tronco (Rousseau et al., 1995) e β -peptídeo amilóide da doença de Alzheimer (Oba, et al., 2005). Esta diferença na especificidade catalítica pode ser devido à variação de aminoácidos específicos do substrato (Araújo, et al., 2000) ou alteração conformacional dos sítios ativos, induzida por cloretos (Jaspard, 1993).

A ECA atua como exopeptidase clivando dipeptídeos do C-terminal livre de dois substratos típicos: Ang I e BK. Para outros substratos como colecistoquinina (Dubreuil et al., 1989), substância P (Skidgel et al., 1984) e LH-RH (Skidgel e Erdo, 1985) que possuem C-terminais amidados, a ECA não apenas exibe atividade exopeptidase, mas também endopeptidase (Naqvi et al., 2005). Assim, a ECA tem um impacto geral no metabolismo de peptídeos biologicamente ativos.

Hattori et al., (2000) isolaram e caracterizaram duas formas de ECA na urina humana. Uma forma de elevado peso molecular (170 kDa) e uma outra forma de baixo peso molecular 65kDa (Domínio N da ECA). Gomes et al., (2004) encontraram uma atividade conversora de angiotensina I de aproximadamente 140 kDa, no líquido pericárdico humano, refletindo uma rota fisiológica importante desta enzima neste ambiente.

A estrutura tridimensional por cristalografia de raios-X da tECA deglicosilada complexada a um inibidor revelou uma preponderância de α -hélices com um íon zinco e dois íons cloreto incorporados. Há um estreito e profundo canal que separa a molécula em dois subdomínios com o sítio ativo localizado na parte inferior deste canal. Uma “tampa” N-terminal no topo da molécula parece permitir somente a entrada de pequenos substratos peptídicos (Guang et al., 2012). Com exceção do motivo de ligação ao zinco, a estrutura apresenta pouca semelhança com a carboxipeptidase A, na qual o desenvolvimento de fármacos inibidores de ECA foi planejado (Zhang et al., 2013; Guang et al., 2012). A ECA é membro da família M2 das metalopeptidases, as gluzincinas (Rawlings e Barrett, 1993).

O íon zinco é tetra coordenado com dois resíduos de histidina do motivo funcional HEXXH, um resíduo de glutamato e uma molécula de água no sítio ativo. Esta molécula de água complexada ao zinco serve como um nucleófilo para atacar o grupo carbonila da ligação peptídica alvo (Lew, 2004; Coates, 2003).

A atividade da ECA também é dependente de cloreto. Ions cloreto ativam os sítios ativos da ECA e melhoram a ligação aos substratos (Riordan, 2003). Cada domínio ativo da ECA exibe diferenças na sensibilidade à ativação do cloreto (Wei et al., 1991).

Dois íons cloreto foram identificados fora do sítio ativo e se mostraram importantes tanto para a estabilização da estrutura enzimática global quanto para facilitar a reação catalítica (Buening e Riordan, 1983; Shapiro et al., 1983). No entanto, há evidências de que a taxa de hidrólise influenciada pelos íons cloreto seja altamente dependente da natureza da molécula do substrato (Shapiro et al., 1983; Liu, et al., 2001; Cheung et al., 1980).

A ausência do segundo cloreto no homólogo da ECA de *Drosophila melanogaster* AnCE, não afetou a ligação de moléculas pequenas como lisinopril e enalapril (Akif et al., 2010; Kim et al., 2003). Zhang et al., (2013) simularam esta ausência e confirmaram que a ausência do segundo cloreto pode enfraquecer significativamente a atividade enzimática, mas não afeta as características de ligação ao substrato. A contribuição do íon cloreto para a reação parece que se dá por interações eletrostáticas distantes e não por mecanismos alostéricos.

Um grande passo para o desenvolvimento de moléculas inibidoras da ECA foi a identificação de peptídeos potenciadores da Bradicinina, presentes no veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Ferreira et al., 1970). Estas descobertas foram cruciais para o

desenvolvimento de inibidores da ECA, tais como o captopril (D-3-mercaptopropanoil-L-Pro) o qual foi o primeiro inibidor específico da ECA, ativo por via oral para o tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca (Cushman e Ondetti, 1991; Camargo et al., 2012). Posteriormente outros inibidores foram desenvolvidos e nos últimos anos os peptídeos que podem inibir a ECA estão recebendo atenção porque são considerados alternativas não-farmacológicas para a prevenção e controle da hipertensão arterial (Vermeirssen, Van Camp e Verstraete, 2004).

Os inibidores da ECA apresentam poucos efeitos colaterais e são bem tolerados. Um efeito colateral comum desses inibidores é uma tosse seca que aparece em 5 a 10% dos pacientes e o angiodema que afeta 0,1-0,5% dos pacientes. Estes dois efeitos secundários têm sido atribuídos a concentrações alteradas de bradicinina (Acharya et al., 2003). Recentemente foi observado que a albumina sérica humana suprime a atividade da ECA endógena (Fagyas, et al., 2014).

2.4. SRA e peçonhas de peixes

Enzimas são componentes importantes e comuns nas peçonhas de muitos animais. Estão frequentemente envolvidas em ações tóxicas, as quais, não surpreendentemente, agem como instrumentos na degradação deletéria das estruturas fisiológicas. Enzimas podem agir como fatores de propagação para as outras toxinas do veneno. Proteases podem também agir como toxinas. A atividade proteolítica foi confirmada nos venenos de muitas espécies de peixes (Ziegman e Alewood, 2015). A peçonha de *Synanceia verrucosa* demonstrou 10 atividades peptidásicas diferentes (Garnier et al., 1995).

O peixe bagre oriental, *Plotosus lineatus*, é conhecido por conter toxinas proteínicas na secreção da pele bem como na glândula de veneno. Tamura e colaboradores (2011) purificaram duas toxinas (toxinas I e II) a partir da secreção da pele. Estas toxinas apresentam quase a mesma massa molecular (35kDa para toxina I e 37 para toxina II) e exibem letalidade, formação de edema e nocicepção. Além de compartilhar 86% de identidade de sequência entre elas, ambas as toxinas são homólogas (56-75% de identidade) às natterinas.

O espinho de *Potamotrygon leopoldi*, localizado na cauda e utilizado para defesa, produz lesões graves em humanos, especialmente pescadores e banhistas, que ocasionalmente pisam nos elasmobrânquios (Haddad Júnior et al., 2004). O veneno é composto principalmente

por enzimas com atividade nociceptiva (dor), edematogênica e necrótica (Haddad Júnior et al., 2004; Magalhães et al., 2006b). A comparação entre arraias marinhas e de água doce revelou que para estas últimas há um maior número de células secretoras de veneno e as lesões causadas são mais graves (Barbaro et al., 2007; Pedroso et al., 2007, Kirchhoff et al., 2014).

Atividade conversora de angiotensina, similar à ECA, foi encontrada na peçonha do peixe *T. nattereri* (Tenório et al., 2015) e *Scorpaena plumieri* (Tenório et al., 2016). O principal produto formado é Ang II, o que indica a presença de uma enzima conversora de angiotensina I, dipeptidil carboxipeptidase (Skeggs Jr et al., 1956). Além disso, as atividades conversoras foram completamente inibidas pelo captopril e EDTA, e, não por PMSF em ambas as peçonhas. As peçonhas não hidrolisaram os substratos cromogênicos de conversoras do tipo serinoproteases, quimase e elastase-II, N-succinil-AAAPF-pNA e N-Succinil-AAAPL-pNa, respectivamente (Tenório et al., 2015 e Tenório et al., 2016). A presença desta protease produtora de peptídeo vasoconstrictor nesta peçonha infere a importância da sua ação na fisiopatologia do empeçonhamento, uma vez que esta enzima é um dos elementos chaves na ativação da cascata de produção de peptídeos bioativos no organismo. O produto formado (AngII) desencadeia uma série de eventos quando ligado a seus receptores AT1 e AT2.

Quando associado com seu receptor AT1, AngII promove aumento na pressão sanguínea. Além disso, AngII tem papel essencial na ativação da resposta inflamatória, sendo considerado um peptídeo com forte efeito pró-inflamatório. Por ser um importante fator de crescimento celular, também está relacionado ao surgimento de hiperplasia, hipertrofia vascular e cardíaca que acompanha o estado hipertensivo (Santos et al., 2000; Rigatto et al., 2004). Nenhuma atividade em AngII foi observada pela peçonha do *T. nattereri* (Tenório et al., 2015) e *S. plumieri* (Tenório et al., 2016), possivelmente favorecendo uma acumulação local de AngII, o qual contribui para os efeitos vasoconstrictores e tromboembólicos apresentados no empeçonhamento (Lopes-Ferreira et al., 2002), consequentemente beneficiando a necrose.

Venenos animais têm uma tendência para inibir a conversora de angiotensina (Ferreira et al., 1970; Politi et al., 1985; Higuchi et al., 1999), mas as peçonhas de *S. plumieri* e *T. nattereri* mostraram o oposto: a presença de uma enzima conversora de angiotensina análoga à ECA. Enzimas como catepsina G (Rykl et al., 2006), tonina (Garcia et al., 1981), quimase (Urata et al., 1990), e elastase- 2 (Paula et al., 1998) são também capazes de degradar Ang I produzindo Ang II. Contudo, as referidas peçonhas apresentaram a conversão de Ang I para

AngII completamente cancelada pelo captopril e EDTA, indicando a presença de uma enzima conversora de angiotensina similar à ECA, uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de metal (Rice et al., 2004). A inibição das conversoras de Ang I em Ang II não foi realizada com PMSF, mas inteiramente com captopril (Tenório et al., 2015 e Tenório et al., 2016), comprovando a presença de uma enzima conversora similar à ECA (Rice et al., 2004), e não à quimase e elastase-2 que são serinoproteases conversoras de angiotensina (Paula et al., 1998; Urata et al., 1990).

A formação de Ang 1-7 é também destacada nas peçonhas de *T. nattereri* e *S. plumieri* (Tenório et al., 2015 e Tenório et al., 2016). Ang 1-7 pode ser gerado através da ação direta de uma endopeptidase em Ang I; exemplos de enzimas com tal atividade são a neprilidina (NEP) (Campbell et al., 1998), “Thimet” oligopeptidase (TOP) (Chappell et al., 1994), e prolil oligopeptidase (Welches et al., 1991). Ang 1-7 pode também ser formada através de Ang II pela ação da ECA-2 (Rice et al., 2004), Catepsina A (CATA) (Jackman et al., 2002), e prolilcarboxipeptidase (PRCP) (Ody et al., 1978).

Pode-se também observar na peçonha de *T. nattereri*, a ação da carboxipeptidase tipo A (ACP) desde que se tem a formação de Ang 1-9 através de Ang I (Pereira et al., 2012). Nenhuma formação de Ang 1-7 ocorreu a partir de Ang II, excluindo ações similares à ECA-2 (Rice et al., 2004), CATA (Jackman et al., 2002), ou PRCP (Ody et al., 1978) e CPA2 (Pereira et al., 2012). Ang 1-7 e Ang 1-9 são inibidores da ECA em concentrações na ordem de micromoles (Kokkonen et al., 1997). Ang 1-9 demonstra um maior efeito inibitório no domínio N em relação ao C quando Ang I é o substrato (Rice et al., 2004). Ang 1-7 é clivado pelo domínio N-ECA, indicando efeito inibidor somente no domínio C (Deddish et al., 1998). Ang 1-7 apresenta várias outras funções mediadas pelo receptor Mas, tais como vasodilatação, anti-proliferação e apoptose (Santos et al., 2003).

Da mesma forma para a ECA, a enzima com atividade conversora encontrada nas peçonhas destes peixes foi também capaz de degradar bradicinina (Tenório et al., 2015 e Tenório et al., 2016). O padrão de degradação de BK por essas peçonhas é muito similar ao padrão encontrado para a degradação de BK no plasma humano; isto ocorre devido a enzima conversora de angiotensina, ECA, uma cininase II, através da remoção de dois resíduos de aminoácidos de BK, gerando BK-(1-7), e posteriormente BK-(1-5) ou por uma carboxipeptidase N (Kuoppala et al., 2000). Carboxipeptidase N é uma cininase I que age pela

liberação do resíduo de arginina da região C-terminal da bradicinina, gerando des-Arg⁹-BK, ou BK-(1-8). Portanto, nós podemos inferir a presença de uma cininase I e uma cininase II na peçonha de *T. nattereri* considerando os produtos de degradação a partir de BK e Ang I. Natterinas é uma classe de proteínas com atividade cininogenase caracterizadas da peçonha de *T. nattereri*.

A via calicreína-cinina foi também implicada na ação inflamatória a partir da peçonha de *S. plumieri* em camundongos (Menezes et al., 2012). Embora o vasorrelaxamento seja a resposta à peçonha de peixes mais reportada na literatura (Muhuri et al., 2004; Church e Hodgson, 2001; Hopkins e Hodgson, 1998), Gomes et al., (2010) encontraram que a peçonha do *S. plumieri* produz vasoconstricção. Do mesmo modo, a peçonha de *Thalassophryne maculosa* induz uma contração arteriolar transiente e a peçonha de *Synanceja trachynis* (atualmente classificado como *S. horrida*) provoca contração em anéis coronários de porco (Church e Hodgson, 2000). Curiosamente, enquanto a peçonha de *T. maculosa* causa estase venular (Sosa-Rosales et al., 2005), a peçonha de *T. nattereri* causa estase arteriolar (Lopes-Ferreira et al., 2002). Dois pequenos peptídeos bioativos têm sido isolados do veneno da arraia *Potamotrygon orbignyi*. O primeiro, chamado Orpotrin, desencadeou efeitos vasoconstrictores no músculo cremaster de rato em condições fisiológicas, quando 20 µL a 1mM do peptídeo foi topicamente aplicado (Conceição et al., 2006). Skeie (1962) encontrou que a injeção do veneno de *T. draco* em camundongo levou a uma contração vascular marcante, resultando em uma necrose isquêmica e subsequente perda de pontas de orelha e cauda.

A presença da ECA em peçonhas de peixes enfatiza seu papel no processo de empeçonhamento e aumenta nossa compreensão sobre os processos fisiológicos gerais causados em decorrência do mesmo e nesse trabalho vemos o isolamento e a caracterização estrutural e biológica de uma ECA da peçonha do *T. nattereri*.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Isolar e caracterizar uma enzima com atividade conversora de angiotensina contida na peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* e investigar a reatividade vascular induzida por essa enzima em artéria mesentérica superior de ratos Wistar normotensos

3.2. Objetivos específicos

- Fracionar a peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* seguindo atividades conversoras de angiotensina específica;
- Identificar a enzima isolada por LC-MS/MS;
- Testar o perfil de inibição frente a inibidores específicos de diferentes enzimas conversoras;
- Comparar a estrutura da ECA isolada com as toxinas da peçonha do *T. nattereri*

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1. Extração da peçonha

Este procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo Nº 013/2014). Os espécimes foram coletados na Lagoa Mundaú em Maceió, Brasil, e transportados no gelo até à Universidade Federal de Alagoas. A peçonha foi extraída de espécimes frescos de *T. nattereri* por meio de pressão na base dos espinhos, usando 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, com a pinça hemostática manteve-se o peixe imobilizado, preso pela mandíbula, enquanto que com a pinça comum, procurou-se romper a bainha de peçonha, pinçando-se o espículo, repuxando a pele que o cobre em direção à sua base e provocando o perfuramento da bainha e expulsão da peçonha em um tubo já convenientemente posicionado. Após a extração, a peçonha foi centrifugada a 10000 g por 5 min à temperatura ambiente e o sobrenadante obtido foi chamado de fração solúvel da peçonha bruta. Esta foi imediatamente usada para ensaios de atividade processante de Angiotensina. A peçonha restante foi congelada a -4°C .

4.2. Quantificação protéica

Uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) com cinco concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 μg BSA/mL), com analitos em duplicata, foi previamente estabelecida. A concentração protéica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), com cada um dos tubos de reação contendo 190 μL da solução de Bradford e 10 μL de amostra e lidas em 595nm em um espectrofotômetro Flexstation usando o programa Soft Max Pro.

4.3. Ensaio enzimático de atividade conversora de angiotensina

A atividade conversora de angiotensina na peçonha do *T. nattereri* foi testada com o decapeptídeo Ang I. Foram usados em cada reação 30 μL de solução 1 mM de Ang I, 130 μL de solução tampão 50 mM tris-HCl pH 8,0 e 10 μL das frações da peçonha e deixadas em repouso por 90 h à temperatura ambiente (25°C). As reações foram paradas com 40 μL de uma solução 5% de ácido trifluoracético (TFA). Padrões para referência de AngI e AngII foram usados, sendo que em cada tubo de reação havia 30 μL de solução 1 mM do peptídeo e 140 μL

de solução tampão 50 mM tris-HCl pH 8. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o momento em que passaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa. Os peptídeos foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com àqueles de peptídeos cognatos sintéticos.

4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os produtos de hidrólise foram detectados através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa usando um equipamento Shimadzu SCL-6B junto a uma coluna C-18 (0,45×15cm). As fases móveis usadas foram soluções de acetonitrila a 5% e 60% (solução A e solução B, respectivamente). Ambas com 0,1% TFA. A eluição ocorreu com um gradiente de acetonitrila de 90% de solução A e 10% de solução B até 50% de solução A + 50% de solução B, o que dá um gradiente de aproximadamente 10% até 32% de acetonitrila, percorridos em 25 min com 0.1% de TFA, num fluxo de 1 mL/min, monitorado pela absorvância em 215 nm.

4.5. Purificação protéica

Para isolar e purificar uma enzima conversora de angiotensina da peçonha do *T. nattereri*, 150µL da peçonha foram diluídos em 4850 µL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8. O volume total da amostra (5 mL) foi injetado em um cromatógrafo líquido do tipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA pure M1 da GE, usando uma coluna de troca-iônica Hitrep CM-Sepharose de 56mL (28×3,14×0,64) eluída com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,75M de NaCl em 70 volumes de coluna. O volume de fração coletado foi de 4 mL a um fluxo de 0.5 mL por min a 25° C e monitorado a 280 nm. Ensaio de atividade da enzima conversora de angiotensina foi feito para todos os picos obtidos.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi desenvolvida de acordo com Laemmli (1970) usando o Sistema Mini-Protean 3 Eletroforese (Bio-Rad). Usou-se gel de poliacrilamida a 12% para separação, 3% para concentração numa corrida sob corrente constante de 85 V. Foram aplicados 1 µL de peçonha e 15µL (0,23µg de proteína) da fração da enzima isolada. As bandas proteicas foram coradas com Comassie Blue G-250. Os Padrões de peso molecular utilizados foram comprados da GE (Amersham™ Full-range Rainbow™) e as proteínas variavam de 12 a 25kDa.

4.7. Ensaio enzimático de inibição da enzima conversora de angiotensina

O ensaio de inibição da enzima conversora de angiotensina da peçonha do *T. nattereri* consistiu em 4µL da enzima purificada, 20µL de 1mM de Ang I, 20µL de 20µM de Captopril e 106µL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8. Em outro tubo havia 4µL da enzima purificada, 20µL de 1mM de Ang I, 20µL de 1mM de EDTA e 106µL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8. O tubo controle continha 4µL da enzima purificada, 20µL de 1mM de Ang I e 126µL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8. As reações duraram 90 h a 25°C e foram encerradas com 40µL de uma solução 5% de TFA.

4.8. Análise de espectrometria de massas e identificação da proteína

A banda protéica foi manualmente excisada do gel SDS-PAGE com uma lâmina de bisturi e foi então incubada em 200µL de 200 mM de bicarbonato de amônio/solução de acetonitrila (ACN:40:60) duas vezes a 37°C por 30 min. O gel foi seco por 30 min em uma centrífuga a vácuo, reidratado em 20 µL de tampão de digestão resfriado (20 µg/mL tripsina [sigma]) em 100 µM de HCl; 40 mM de bicarbonato de amônio em 9% de solução de acetonitrila por 60 min, e então incubado a 37°C na mesma solução por 16 h. Os peptídeos foram extraídos com 50% de acetonitrila/0.1% de ácido trifluoroacético e dessalinizados e concentrados usando “Ziptips” C18 (Millipore, Billerica, MA, USA). Espectrometria de massas (MS) foi realizada em um espectrômetro Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) de ionização/desorção à laser assistida por matriz e análise por tempo de voo (MALDI-TOF/TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Os peptídeos extraídos foram vistos em um AnchorChip 400/384 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) placa de microtitulação alvo (PMT), misturados com uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (0.5 µL), e deixado cristalizar à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas por MALDI-TOF/TOF. Os espectros MS e MS/MS foram obtidos no modo refletor com uma calibração externa, usando a mistura de peptídeos de calibração padrão II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Os dados do MS e MS/MS foram submetidos ao MASCOT (<http://www.matrixscience.com>, acesso em Junho, 2015). Os parâmetros de busca foram os seguintes: base de dados, NCBI não redundante; taxonomia, Eucariota; tipo de busca, *fingerprint* da massa do peptídeo combinada com MS/MS da busca do íon; sequência de aminoácidos; enzima, tripsina; modificações fixas, carbamido metilação (Cys); modificações

variáveis, oxidação (Met); valores de massa, monoisotópico; estado de carga do peptídeo, (1) máxima perda de clivagens, e (2) uma tolerância de massa peptídica de 0.05% Da (50 ppm).

4.9. Alinhamento de sequências

As sequências peptídicas obtidas no MS/MS da fração CM2 foram usadas para busca na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em Abril, 2016). O Alinhamento Múltiplo de Sequências foi feito pelo programa *Clustalw Omega*. Números de acesso das natterinas 1 a 4 e P depositadas são: Q66S25.1, Q66S21.1, Q66S17.1, Q66S13.1 e Q66S08.1, respectivamente.

4.10. Preparação da artéria mesentérica superior isolada de rato

Os animais utilizados foram ratos machos Wistar normotensos pesando entre 200 e 300g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da UFAL. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água *ad libitum*. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da UFAL (Protocolo Nº 53/2016). Os ratos foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia. Em seguida, através de uma incisão no abdômen do animal, foi retirada a artéria mesentérica superior.

Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo, e mantidos em cubas contendo 10 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte concentração em mM: NaCl, 158,3; KCl, 4,0; CaCl₂, 2,0; MgCl₂, 1,05; NaH₂PO₄, 0,42; NaHCO₃, 10,0 e glicose, 5,6, em pH 7,4, a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis (WT-E+; n = 5 ratos) foram inseridos em hastes metálicas suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (GM2, Gould, EUA) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Gould, EUA) para o registro das contrações isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,5g por um período de no mínimo 60 min. Durante este tempo, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 min para prevenir a interferência de metabólitos (Altura et al, 1970).

Anéis sem endotélio funcional foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso (WT-E-; n = 5 ratos). A presença ou ausência do endotélio funcional foi

verificada pela habilidade, medida em porcentagem (%), da Acetilcolina (ACh) (10 mM) em relaxar os anéis pré-contraídos com 10 mM de fenilefrina (Fen). Foram considerados com endotélio funcional, os anéis que apresentaram relaxamentos superiores a 70% sobre a pré-contracção com Fen. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio funcional (Furchgott; Zawadzki, 1980).

4.11. Avaliação do efeito da enzima isolada da peçonha de *T. nattereri* (fração CM2) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN

Após a verificação da integridade do endotélio funcional, uma nova contracção com Fen (10 μ M) foi induzida. Após atingir o platô, esperou-se um período de 40 minutos para a estabilização da contracção e foram adicionadas concentrações crescentes (10-500ng) da enzima isolada da peçonha de *T. nattereri* (fração CM2), de maneira cumulativa, tanto em anéis com endotélio como em anéis sem endotélio. A amostra foi dialisada três vezes com água deionizada para remoção dos sais do tampão de eluição antes da sua administração nos anéis.

4.12. Análises estatísticas

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foi utilizado o teste *t de Student* para amostras não pareadas. Foram consideradas diferenças significativas quando valor de “p” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

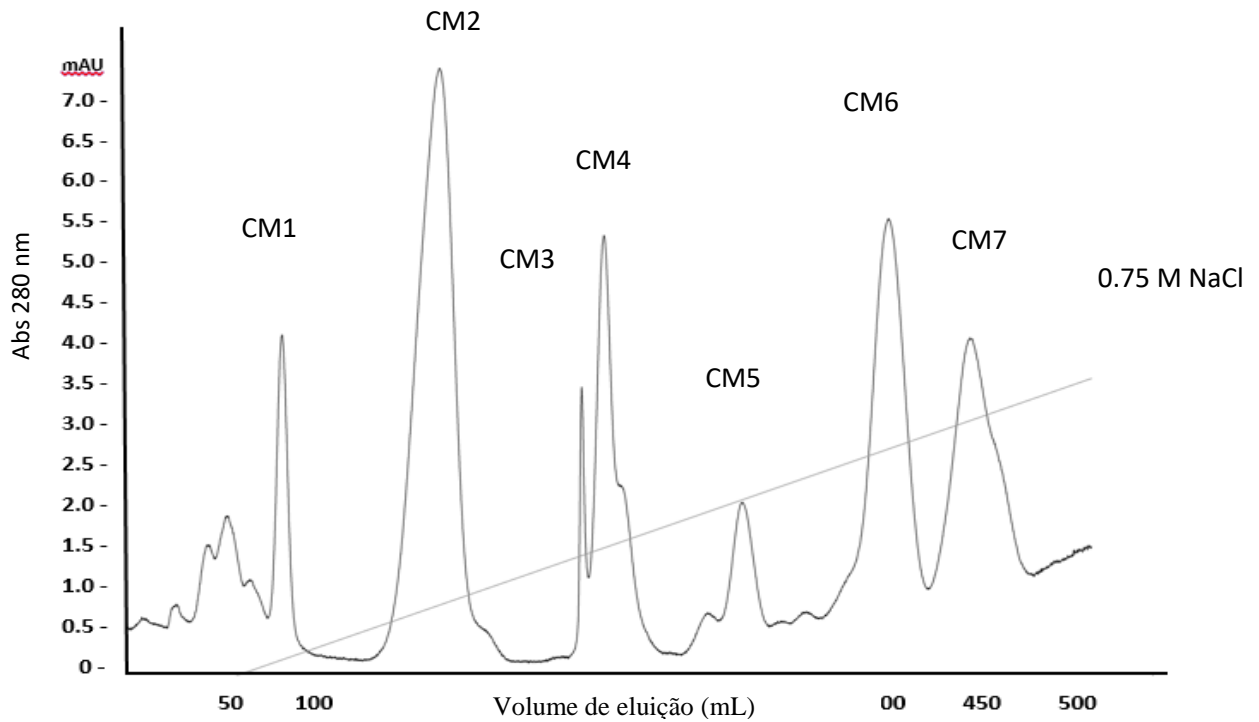
Para avaliar o efeito induzido pela enzima isolada da peçonha do *T. nattereri* com atividade similar à ECA, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o $E_{m\acute{a}x}$ (média percentual do efeito máximo induzido pela substância) e o pD2 (logaritmo negativo da concentração da droga que produz 50% do efeito máximo, $-\log CE_{50}$), que representam, respectivamente a eficácia e a potência farmacológica. A análise estatística e a plotagem dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 3.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação protéica e Sequenciamento da proteína purificada

O fracionamento da peçonha de *T. nattereri* em CM-Sepharose FF de 56 mL (28×3,14×0,64) mostrou 7 picos majoritários, como ilustrado na Figura 6. A fração CM2 apresentou a maior atividade conversora de angiotensina, convertendo Ang I a Ang II (Figura 7).

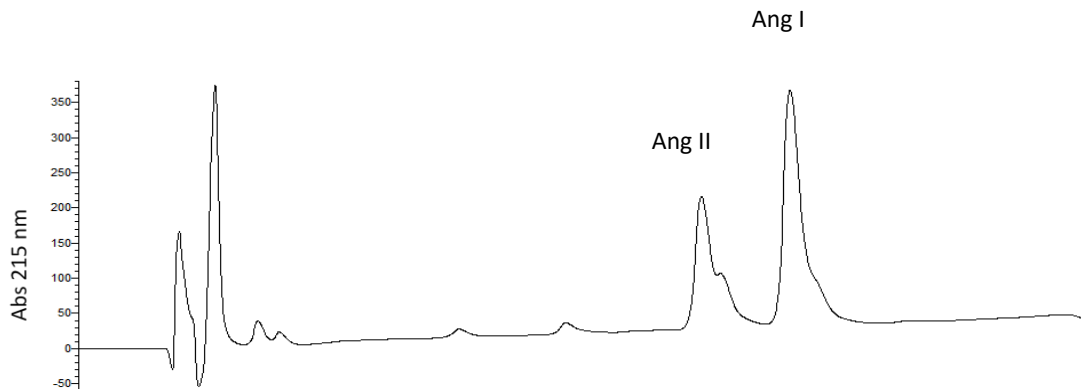
Ilustração 6 - Perfil Cromatográfico da peçonha do *Thalassophryne nattereri*



Espectro cromatográfico em coluna de troca-catiônica (Hitrep CMFF16/10 28×3,14×0,64 de 56 mL) da peçonha diluída em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8, em FPLC Akta Püre, com um gradiente linear de 0 a 0.75 M NaCl a um fluxo de 0.5 mL/min a 25° C e monitorado a 280 nm.

Fonte: Autoria própria, 2016.

Ilustração 7 - Perfil cromatográfico do ensaio de atividade enzimática



Cromatograma obtido através de HPLC mostrando os produtos gerados pela hidrólise de Ang I incubado com a fração CM2. A reação envolveu 30 μL de solução 1mM de Ang I, 140 μL da fração CM2 deixado reagir por 90 h à temperatura ambiente (25 °C).

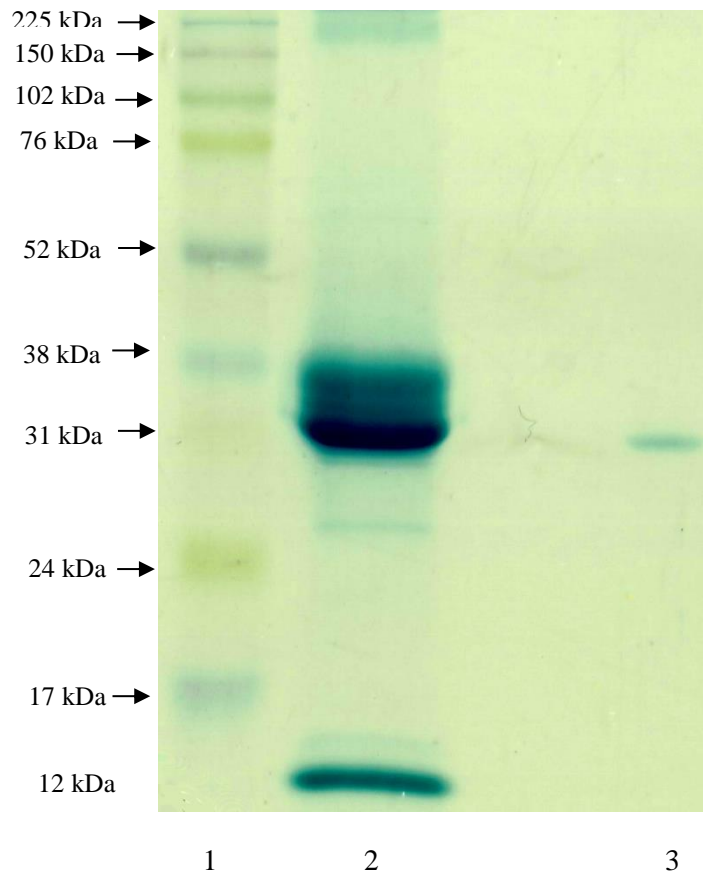
Fonte: Autoria própria, 2016.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes e redutoras a 85 V, revelou uma única banda para a CM2 (15 μL de fração), como mostra a Figura 8.

A enzima conversora de angiotensina da peçonha de *T. nattereri* apresenta uma massa molecular estimada em 30 kDa, um tamanho relacionado ao das Natterinas.

Natterinas são uma nova classe de proteínas com atividade proteolíticas caracterizadas da peçonha de *T. nattereri* e responsáveis pelos sinais e sintomas causados pelo ataque do peixe. As estruturas primárias destas toxinas foram obtidas por abordagem transcriptômica usando uma biblioteca de cDNA construída a partir da peçonha das glândulas do *T. nattereri*, e permitiu identificar cinco sequências relacionadas, chamadas de natterinas 1-4 e P. As seqüências completas de natterinas não mostraram qualquer semelhança significativa com caliceínas teciduais já descritas, cininogenases ou qualquer proteinase, sendo todas inteiramente novas (Magalhães, 2005).

Ilustração 8 - Perfil eletroforético da peçonha e fração CM2 isolada da peçonha do *Thalassophryne nattereri*



Eletroforese em SDS-PAGE dos padrões protéicos de massa molecular conhecidos (Linha 1), da peçonha bruta de *Thalassophryne nattereri* (Linha 2) e da fração CM2 da Cromatografia de Troca-iônica (Linha 3).

Fonte: Autoria própria, 2016.

A presença desta protease produtora de peptídeo vasoconstrictor nesta peçonha, infere a importância da sua ação uma vez que esta enzima é um dos elementos chave na ativação da cascata de produção de peptídeos bioativos em organismos. O produto formado (Ang II) desencadeia uma série de eventos quando associado a receptores AT1 e AT2. Quando associado com seu receptor AT1, Ang II promove um aumento da pressão sanguínea. Além disso, Ang II tem um papel essencial na ativação de respostas inflamatórias, sendo considerado um peptídeo com forte efeito pró-inflamatório. Por ser um importante fator de crescimento celular, está também relacionado ao surgimento de hiperplasia, hipertrofia vascular e cardíaca que acompanham o estado hipertensivo (Santos et al., 2000; Rigatto et al., 2004).

Tenório e colaboradores estudaram as atividades peptidásicas da peçonha de *T. nattereri* e observaram que a peçonha não tem influência sobre Ang II, o que torna este peptídeo ainda mais importante já que é formado, mas não é consumido (Tenório et al., 2015). Eles também observaram que outros peptídeos bioativos são formados por outras proteases possivelmente presentes.

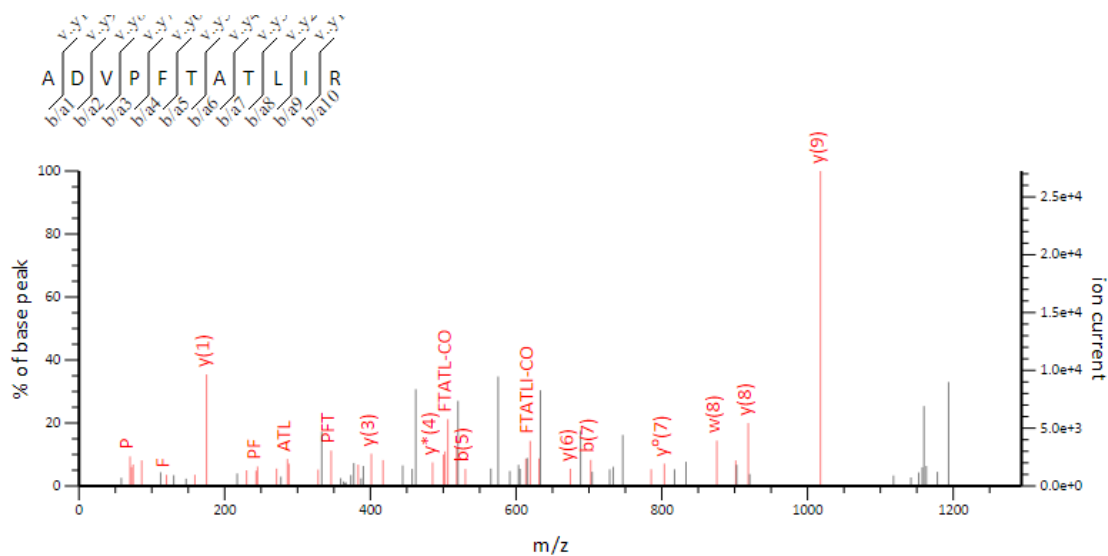
Gomes et al. (2010) observaram que a peçonha do peixe-escorpião em doses sub-letais produziu uma resposta hipertensiva intensa em ratos anestesiados. Atividades vaso-peptidásicas processantes de Ang I e Ang II também foram encontradas na peçonha e na secreção epidérmica do *S. plumieri*. O principal produto formado é Ang II seguido de Ang 1-7, quando Ang I é o substrato, para ambas as preparações. No entanto, somente na peçonha verificou-se a formação de Ang 1-7 a partir de Ang II, demonstrando atividade de carboxipeptidase (Tenório et al., 2016).

Dois fragmentos peptídicos gerados da hidrólise por tripsina (Figura 9A) foram sequenciados por MS/MS e utilizados para identificar a fração CM2 isolada da peçonha de *T. nattereri*. O peptídeo I (Figura 9B) foi identificado pelo Software Mascot; o peptídeo II (Figura 9C) foi identificado pelo sequenciamento manual (sequenciamento *de novo*). O sequenciamento exclusivo do MS/MS identificou que a ECA isolada na fração CM2 é a natterina 1, revelando esta proteína como a responsável pela conversão de angiotensina na peçonha de *T. nattereri*.

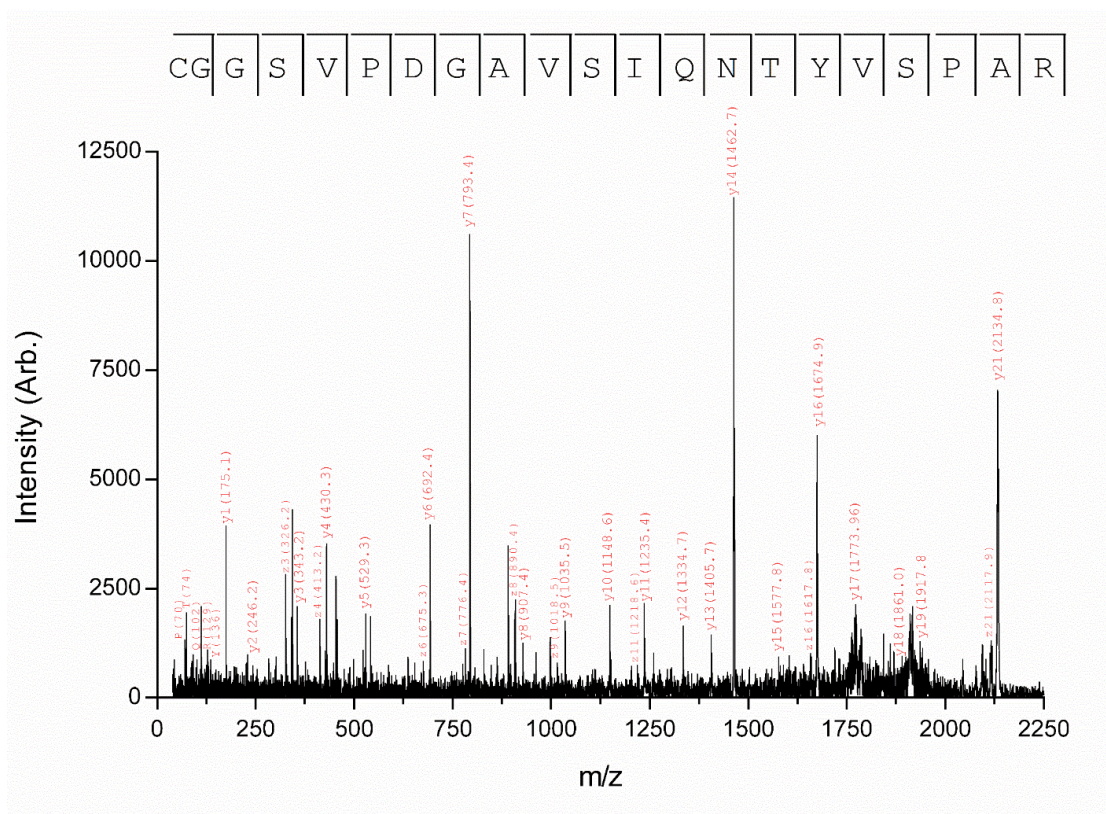
Ilustração 9 - Sequenciamento da proteína Natterina-1

1	MIPSVLLVTL	LLLSWTSAEK	DLKVRVARST	NDETNLHWVK	<u>CGGSVPDGAV</u>	A
51	<u>SIQNTYVSPA</u>	<u>R</u> TEYVCKSNC	EAGYYSTKDS	KCHYPFGRVE	QTTSVCEILV	
101	NRDNFELLEW	KEGYAGSLPA	NAVSTCKTNR	IYVGKGAYGL	GKIEPAHHCL	
151	YYGWNGAETW	TKTYQALTVN	KDVIEQTMKD	VKYQTEGVTV	IQGKPEVMRK	
201	STVNNKQCKE	VTKTVTLSKD	ISTEERWDVT	NSVTFGVTTT	VTAGIPDVAS	
251	ASLAVSMEAR	RDFAHGASKT	ESQSYMVTVS	VPVPPQSCT	VSMVAQVNKA	
301	<u>DVPFTATLIR</u>	TYRGGKKTQT	TTKGVYRTTQ	VAETHADVEQ	CTIIGDEKDC	
351	PKASK					

B



C



As sequências em **negrito** e sublinhadas foram usadas na identificação da enzima conversora de angiotensina (CM2) (A); Espectro MALDI-TOF-TOF dos fragmentos peptídicos trípticos gerados da fração CM2, empregando os peptídeos destacados para identificação da toxina: Identificação automática do peptídeo 1 (m/z:1203.8) da fração CM2 por MS/MS (B); Sequenciamento *de novo* do peptídeo 2 (m/z:2134.8) da fração CM2 por MS/MS (C).

Fonte: Autoria própria, 2016.

Os peptídeos da fração CM2 obtidos pela espectrometria de massas, e usados para identificar a proteína, foram alinhados com as sequências das outras natterinas (Figuras 10A e

B). O alinhamento múltiplo de sequências, realizado pelo aplicativo *Clustalw Omega* mostrou total homologia de identidade entre os peptídeos da fração CM2 e os aminoácidos alinhados da natterina-1. A natterina-2 mostrou somente um aminoácido diferente para ambos os peptídeos, mas com propriedades similares entre os aminoácidos. Natterinas 3, 4 e P mostraram baixas similaridades para os peptídeos sequenciados da fração CM2.

Peptídeos internos das natterinas 1 a 3 foram os majoritários quando o veneno foi submetido a espectrometria de massa/2DGE (Lopes-Ferreira et al., 2014). Este resultado permite inferir que a ECA (natterina 1) do veneno de *T. nattereri*, é uma das toxinas predominantes, o que reforça a sua importância no processo de empoçamento.

Safavi-Hemami et al. (2013), utilizando análise por espectrometria de massa para os venenos de dois caramujos *Conus*, *Conus purpurascens* e *Conus ermineus*, demonstraram a presença da enzima conversora de angiotensina-1 (ECA-1) e enzima conversora da endotelina-1 (ECE-1), metaloproteases que ativam potentes peptídeos vasoconstritores. A atividade da ECA foi confirmada no veneno da *C. purpurascens* e foi significativamente reduzida em veneno pré-incubado com o inibidor da ECA, captopril. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) demonstrou que estas enzimas são expressas nas glândulas de veneno de outras espécies de caracóis *Conus*.

Lopes-Ferreira et al. (2004), encontraram atividades semelhantes a calicreína tecidual na peçonha de *T. nattereri*, as quais são as principais responsáveis pelo edema e nocicepção observadas. A liberação de cininas pode explicar o edema e a nocicepção já que são mediadores de inflamação que aumentam a permeabilidade vascular e estimula os receptores da dor. As natterinas ainda conseguem degradar colágeno tipo I e IV, sugerindo que estes componentes da matriz são susceptíveis às natterinas (Komegae et al., 2011).

A

Ilustração 10 - Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos das Natterinas

Peptide 1	----ADVPFTATLIR-----
Natterin-1	QVNKADVFPFTATLIRYRGGKKTQTTTKGVYRRTQVAETHADVEQCTIIGDEKDCPKASK *****
Peptide 1	ADVPFTATLIR-----
Natterin-2	ADIPFTATLIRTYRGGKKTQTTTKGVYRTIQVAETHADVEQCTIIGDAKDCPNASSTITT *:*:*****
Peptide 1	-----ADVPFTATLIR-----
Natterin-3	HYCPVTMVATKYTADIPFTGKMTRTYRNGQKRRTTSITGTYRAIQVGEIRADVQRCSEIAG *:*:***.:*:
Peptide 1	-----ADVPFTATLIR-----
Natterin-4	SHGTSKTESTSHSLSVSATIPPNSSCSITMEGCTFKANIPFTGRLTRKYSNGKVTSSSVK *:*:***. * *
Peptide 1	-----ADVPFTATLIR-----
Natterin-P	MKLLVLLVTLVLSWTS AEDLGDQEILENNEDNNHESELGEPAAQHTDDETSQLGQALIP : :**
Peptide 2	-----CGGSVPDGAVSIQNTYVSPAR--
Natterin-1	SVLLVTLVLLLSWTS AEDLKV RVARSTNDET NLHWKCGGSVPDGAVSIQNTYVSPARTE *****
Peptide 2	-----CGGSVPDGAVSIQNTYVSPAR--
Natterin-2	SVLLVTLVLLLSWTS AEDLKV RVARSTNDET NLHWKCGGSVPDGAVSIRNTYVSPARTE *****:*****
Peptide 2	CGGSVPDGAVSIQNTYVSPAR-----
Natterin-3	GQGAVPDGAVSIWNGEEKRTDYVCSGCGSSGFYSTKTGANCHYAYGETEKTCSGFSILVN *:*:***** * . :
Peptide 2	-----CGGSVPDGAVSIQNTYVSPAR-----
Natterin-4	TIRVARAYEFSSKSNLEWVRWNGHIPSNVAVKISNTYVGREDYVCRVGCEAGYYTPKKGPS * :* . ** :* . *****
Peptide 2	-----CGG----SVPDGAVSIQNTYVSPAR--
Natterin-P	LLVTLVLSWTS AEDLGDQEILENNEDNNHESELGEPAAQHTDDETSQLGQALIPRCRKM * . * : . : : : : *

B

Os peptídeos sequenciados da fração CM2 por MS/MS alinhados com todas as natterinas (A e B). Os símbolos representam: (*) homologia entre todos os aminoácidos na sequência indicada, (:) similaridade dos aminoácidos alinhados nesta sequência, (.) baixa similaridade dos aminoácidos alinhados nesta sequência, (-) nenhuma similaridade nesta sequência.

Fonte: Autoria própria, 2016.

Lopes-Ferreira et al. (2002), submeteram a peçonha de *T. nattereri* e as natterinas (Ferreira et al., 2014) à bioensaios mostrando seus principais efeitos: nocicepção, edema, mionecrose, contração arteriolar e estase venular. Análises de microscopia intravital da microcirculação do músculo cremaster revelaram efeitos sobre plaquetas e células endoteliais.

Estase foi observada concomitantemente com a presença de trombos em vênulas e constrições transitórias em arteríolas, todos os quais causando uma deficiência no fluxo sanguíneo. Alterações significativas nas paredes dos vasos ocorreram poucos minutos após a administração da peçonha, com aumento da espessura e deposição de fibrina (Lopes-Ferreira et al., 2014). A ação constrictora observada nas arteríolas pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, à ECA presente na peçonha, agora identificada como natterina-1. Portanto, a enzima isolada e purificada da peçonha de *T. nattereri*, indica um efeito fisiológico diferente dos demais venenos estudados, produzindo um peptídeo vasoconstrictor e não inibidor da ECA.

Ensaio de inibição da Natterina-1

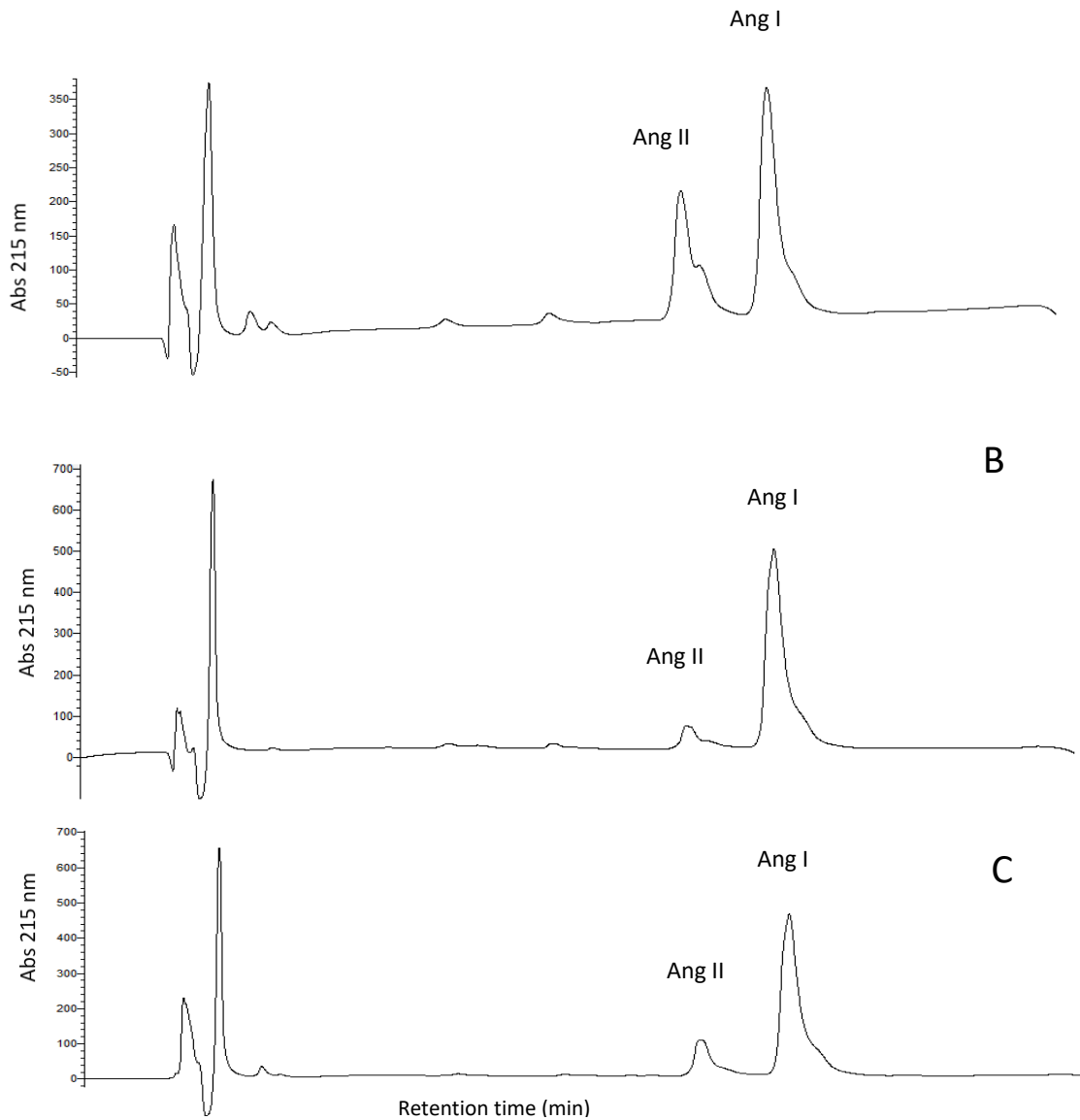
Alguns inibidores de protease foram utilizados por Lopes-Ferreira e colaboradores (2004), para verificar a natureza da enzima formadora de cininas encontrada na peçonha *T. nattereri*. Inibidores para serinoproteases e para aspartil e cisteína-peptidase também não reduziram a atividade enzimática. Agentes como EDTA e Orto-fenantrolina inibiram a hidrólise de peptídeos derivados do cininogênio, inferindo que atividade do tipo caliceína da peçonha de *T. nattereri*, poderia ser atribuída a metaloproteases.

A proteína isolada neste estudo mostrou ser inibida pelo Captopril e EDTA (Figuras 11B e C) sendo caracterizada como uma enzima conversora de angiotensina clássica, pela atividade conversora apresentada *in vitro* e pelo perfil de inibição, sensível ao Captopril e EDTA. Apesar de tal evidência, o peso molecular não se aproxima ao da ECA humana.

A atividade conversora de Ang I em Ang II observada na peçonha e no muco do *S. plumieri* inibida pelo Captopril e EDTA, indicou a presença de uma enzima similar à ECA. EDTA, mas não Captopril, foi capaz de inibir a formação de Ang 1-7 a partir de Ang II inferindo a presença de uma enzima similar à ECA-2 na peçonha do *S. plumieri* (Tenório et al., 2016).

Na presença de EDTA, aproximadamente 70% da atividade da enzima no veneno de *C. purpurascens* foi mantida, sugerindo que o local de ligação do metal pode não ser totalmente sensível ao quelante. Em tal estudo, a análise de sequências revelou que das isoformas da ECA identificadas, somente uma contém o motivo de ligação ao zinco HEXXH (isoforma ECA-1b) (Safavi-Hemami et al., 2013).

Ilustração 11 - Perfil cromatográfico de inibição da enzima conversora isolada da peçonha de *Thalassophryne nattereri*



Cromatogramas obtidos através de HPLC mostrando os produtos gerados pela hidrólise de Ang I incubados com a fração CM2. A reação envolveu 30 μL de solução 1mM de Ang I 1, 140 μL da fração CM2 deixado reagir por 90 h à temperatura ambiente (25 °C) (A), com captopril (B), e EDTA (C). As reações foram interrompidas com 40 μL de uma solução de ácido trifluoroacético 5% (TFA). A eluição foi feita usando um gradiente de acetonitrila 10–32% com 0.1% TFA em uma coluna de HPLC fase reversa (C18, 0,45 \times 15cm) com absorvância a 215 nm; os produtos foram identificados com padrões (pela comparação do tempo de retenção deles com os dos padrões).

Fonte: Autoria própria, 2016.

Em 1949, Rocha e Silva descreveram a formação de cininas utilizando o veneno de *Bothrops jararaca*. Desde então, um grande número de publicações científicas tem descrito

toxinas em venenos animais com repercussão na área médica. A maioria dos estudos, no entanto, está relacionada com o efeito hipotensor da bradicinina.

Ferreira e colaboradores foram os primeiros a isolar do veneno da cobra brasileira (*Bothrops jararaca*) pequenos peptídeos que exibiam uma forte atividade inibitória da ECA, os peptídeos potenciadores da bradicinina. As seqüências de aminoácidos destes inibidores foram determinadas, concluindo tratar-se de peptídeos contendo de 5 a 13 resíduos de aminoácidos com a seqüência Ala-Pro ou Pro-Pro no grupo C-terminal (Ferreira et al., 1970; Ondetti et al., 1971). Cushman e Cheung (1973), estudaram a inibição peptidolítica da ECA do pulmão de coelho por meio de 7 peptídeos sintéticos semelhantes aos peptídeos encontrados no veneno de *B. jararaca* e concluíram que o mais potente inibidor pode ser clivado e inativado quando incubado com a ECA na ausência de outros substratos e com o ativador Cl^- . A inibição por estes peptídeos é do tipo competitiva e os inibidores se ligam à enzima da mesma maneira que esta se liga ao substrato.

Inibidores naturais da enzima ECA (IECA) causam efeito hipotensor e são, portanto, considerados como modelos moleculares para a criação de novas drogas anti-hipertensivas específicas com menor efeito colateral.

Este é o primeiro estudo a mostrar o isolamento e a caracterização de uma ECA em peçonhas de peixes. A identificação desta protease produtora de peptídeo vasoativo na peçonha de *T. nattereri* destaca seu papel no processo de empeçonhamento e melhora a nossa compreensão para os processos fisiológicos gerais desencadeados.

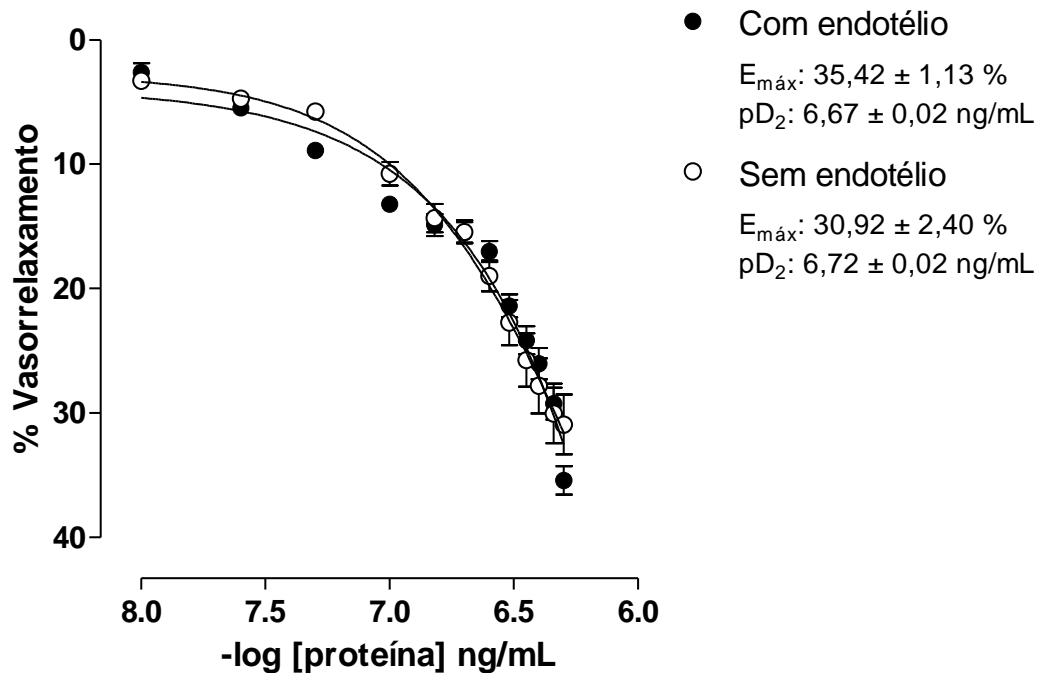
Avaliação do efeito da enzima isolada da peçonha de *T. nattereri* (fração CM2) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN.

Em anéis de artéria mesentérica superior de ratos com endotélio intacto, pré-contraídos com Fen, concentrações crescentes da enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha de *T. nattereri* (10-500ng) foram capazes de promover vasorrelaxamento de maneira dependente de concentração ($Emax = 35,42 \pm 1,13\%$). Após remoção do endotélio, o efeito vasorrelaxante não foi alterado significativamente ($Emax = 30,92 \pm 2,40\%$). Do mesmo modo, a potência entre os anéis com o endotélio funcional ($pD2 = 6,67 \pm 0,02$ ng/mL) e sem o endotélio ($pD2 = 6,72 \pm 0,02$ ng/mL) não foram significativamente diferentes (Gráfico 1).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de foi de aproximadamente 5 minutos.

Gomes et al. (2010) ao investigar os efeitos da peçonha de *S. plumieri* na pressão sanguínea arterial de ratos anestesiados, encontraram uma resposta bifásica caracterizada por um aumento inicial da pressão arterial média de maneira dose-dependente, seguida de uma pronunciada queda quando uma concentração acima de 338 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi usada, levando a morte do animal depois de poucos minutos. Os autores sugerem que o efeito hipotensivo talvez envolva receptores muscarínicos ou a síntese de óxido nítrico nas mediações da resposta.

Ilustração 12 - Curva concentração-resposta da enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri*



Doses crescentes da enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* (10 – 500 ng/mL) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, pré-contraídos com fenilefrina, com e sem endotélio funcional promovendo um vasorrelaxamento.

Fonte: Autoria própria, 2017.

Para o experimento realizado neste trabalho sugere-se como possíveis mecanismos para o vasorrelaxamento: a formação de Ang II a partir da ECA isolada da peçonha de *T. nattereri* e sua ligação ao receptor AT2 ou a participação desta enzima na remoção do estímulo contrátil ou ainda uma ação que estimule a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente, o

processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (Webb, 2003).

A peçonha liofilizada de *S. trachynis* (20 $\mu\text{g/mL}$) causou relaxamento dependente de endotélio em aorta de rato. Em contraste, artérias coronárias de porco sofreram contrações. Quando a peçonha fresca foi utilizada, foi verificada uma resposta bifásica (isto é, um relaxamento inicial seguido de contração em aortas de rato (Church e Hodgson, 2000).

Para os efeitos cardiovasculares da peçonha do peixe soldado, *Gymnapistes marmoratus*, foi verificado um relaxamento dose-dependente em aortas com endotélio intacto, mas nenhuma resposta em aortas sem endotélio. Esse efeito relaxante foi significativamente inibido com inibidores da óxido nítrico sintase e não foi revertido com atropina (Hopkins e Hodgson, 1998).

Em ratos anestesiados, a peçonha de *G. marmoratus* causou uma resposta bifásica consistindo de uma diminuição inicial seguida de um aumento na pressão arterial média. A peçonha de *G. marmoratus* parece estimular a liberação de óxido nítrico das células endoteliais para produzir relaxamento no músculo liso vascular e contribui para a resposta hipotensora produzida nos ratos anestesiados. A resposta hipotensora também pode ser explicada, segundo os autores, pelo menos parcialmente, por eicosanóides vasodilatadores (Hopkins e Hodgson, 1998).

A peçonha e as natterinas de *T. nattereri* aplicados em diferentes concentrações causam constricção arteriolar na microvasculatura do músculo cremaster de ratos. Uma redução de até 25% no diâmetro do vaso e contrações transientes foram relatadas (Lopes-Ferreira et al., 2002; Ferreira et al., 2014). O efeito de vasorrelaxamento encontrado no presente estudo pela ECA de *T. nattereri*, mostra um efeito antagônico quanto aos efeitos vasculares da peçonha e das toxinas do peixe. Estudos posteriores utilizando inibidores da óxido nítrico sintase e inibidores de AT2 como Ditrifluoracetato (PD123319) permitirão maiores esclarecimentos para explicar o mecanismo que conduz a tal resultado.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a peçonha de *T. nattereri* contém uma enzima metaloprotease conversora de angiotensina, chamada Natterina-1, pertencente à família das natterinas. Esta descoberta ajuda a esclarecer alguns dos sintomas observados no empeçonhamento das vítimas assim como beneficia investigações e pode indicar novas formas de terapia. Além disso, este é o primeiro estudo a isolar a presença de ECA em peçonhas de peixes, o que representa uma relevante contribuição para uma melhor compreensão do processo fisiológico de empeçonhamento, abrindo caminhos para posteriores pesquisas com peçonhas de peixes. A enzima isolada é inibida por captopril e EDTA e não por PMSF, por isso se enquadra como uma metaloprotease, assim como é a ECA humana. A enzima conversora de angiotensina isolada da peçonha de *T. nattereri* foi capaz de promover vasorrelaxamento de maneira dose-dependente em anéis de artéria mesentérica superior de ratos com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com Fen.

REFERÊNCIAS

1. Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Riordan, J.F., Ehlers, M.R.W. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 891-902, 2003.
2. Agoudemos, M.M, Greene, A.S. Localization of the renin–angiotensin system components to the skeletal muscle microcirculation. **Microcirculation**, v. 2, n. 8, p. 627-36, 2005.
3. Akif, M., Georgiadis, D., Mahajan, A., Dive, V., Sturrock, E.D., Isaac, R.E., Acharya, K.R. High Resolution Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Angiotensin-Converting Enzyme in Complex with Novel Inhibitors and Antihypertensive Drugs. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 502-517, 2010.
4. Altura, B.M.; Altura, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 16, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
5. Araújo, M.C., Melo, R.L., Cesari, M.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Carmona, A.K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8519-25, 2000.
6. Balyasnikova, I.V., Karran, E.H., Albrecht II, R.F., Danilov, S.M. Epitopespecific antibody induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 3, p. 585-95, 2002.
7. Barbaro, K.C., Lira, M.S., Malta, M.B., Soares, S.L., Garrone Neto, D., Cardoso, J.L.C., Santoro, M.L. Haddad Jr, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**; v. 50, n. 5, p. 676-687, 2007.
8. Bem-Ari, E.T., Garrison, J.C. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. **American Journal of Physiology-endocrinology and metabolism**, v. 255, n. 1, p. E70- E79, 1988.
9. Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D.N., Luft, F.C., Ganten, D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of Molecular Medicine**, v. 79, n. 2-3, p. 76-102, 2001.

10. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
11. Bujak-Gizycka, B., Olszanecki, R., Suski, M., Madej, J., Stachowicz, A., Korbut, R. Angiotensinogen metabolism in rat aorta: robust formation of proangiotensin-12. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 679-82, 2010.
12. Buenning, P., Riordan, J.F. Activation of Angiotensin Converting Enzyme by Monovalent Anions. **Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 110-116, 1983.
13. Burnier, M., Brunner, H.R. Angiotensin II receptor antagonists. **The Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 637-45, 2000.
14. Camargo, A.C.M., Ianzer, D., Guerreiro, J.R., Serrano, S.M.T. Bradykinin- potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516-523, 2012.
15. Campbell, D.J., Anastasopoulos, F., Duncan, A.M., James, G.M., Kladis, A., Briscoe, T.A. Effects of neutral endopeptidase inhibition and combined angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition on angiotensin and bradykinin peptides in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 2, p. 567-577, 1998.
16. Carrijo, L.C., Andrich, F., de Lima, M.E., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Figueiredo, S.G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**, v. 45, n.7, p. 843-850, 2005.
17. Cassoli, J.S., Verano-Braga, T., Oliveira, J. S., Montandon, G.G., Cologna, C.T., Peigneur, S., Pimenta, A. M. de C., Kjeldsen, F., Roepstorff, P., Tytgat, J., de Lima, M.E. The proteomic profile of *Stichodactyla duerdeni* secretion reveals the presence of a novel O-linked glycopeptide. **Journal of Proteomics**, v. 87, p. 89-102, 2013.
18. Cat, A.N.D., Touyz, R.M. A new look at the renin-angiotensin system-Focusing on the vascular system (Review). **Peptides**; v. 32, n. 10, p. 2141-2150, 2011.
19. Chappell, M.C., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B. Ferrario, C.M. Conversion of angiotensin I to angiotensin-(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. **Journal of Vascular Medicine and Biology**, v. 5, p. 129-129, 1994.
20. Chen, H.J., Li, D.Y., Saldeen, T., Phillips, M.I., Mehta, J.L. Attenuation of tissue P-selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT(1) receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 2, p. 474-79, 2001.

21. Cheng, Z.J., Vaskonen, T., Tikkanen, I., Nurminen, K., Ruskoaho, H., Vapaatalo, H., Müller, D., Park, J.K., Luft, F.C., Mervaala, E.M.A. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 433-39, 2001.
22. Cheng, Z.J., Finckenberg, P., Louhelainen, M., Merasto, S., Tikkanen, I., Vapaatalo, H., Mervaala, E.M.A. Cardiovascular and renal effects of cyclooxygenase inhibition in transgenic rats harboring mouse renin-2 gene (TGR[mREN2]27). **European Journal of Pharmacology**, v. 461, n. 2-3, p. 159-69, 2003.
23. Cheng, Z.J., Vapaatalo, H., Mervaala, E. Angiotensin II and vascular inflammation (Review). **Medical science monitor**, v. 11, n. 6, p. RA194- RA205, 2005.
24. Cheung, H.-S., Wang, F.-L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., Cushman, D.W. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 2, p. 401-407, 1980.
25. Cushman D.W., Cheung, H.S. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 293, n. 2, p. 451-63, 1973.
26. Cushman, D.W., Ondetti, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.
27. Church, J.E., Hodgson, W.C. Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 3, p. 391–407, 2000.
28. Church, J.E., Hodgson, W.C. Stonefish (*Synanceia spp.*) antivenom neutralises the in vitro and in vivo cardiovascular activity of soldiers-fish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 319-324, 2001.
29. Church, J.E., Hodgson, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.
30. Coates, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 769-773, 2003.
31. Coelho, M.M., Oliveira, C.R., Pajolla, G.P., Calixto, J.B., Pelá, I.R. Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 2, p. 296-302, 1997.
32. Conceição, K. Konno, K. Melo, R.L.; Marques, E.E. Hiruma-Lima, C.A. Lima, C. Richardson, M. Pimenta, D.C. Lopes-Ferreira, M. Orpotrin: A novel

- vasoconstrictorpeptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. **Peptides**, v. 27, n. 12, p. 3039–3046, 2006.
33. Corradi, H.R., Schwager, S.L.U., Nchinda, A.T., Sturrock, E.D., Acharya, K.R. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 3, p. 964-974, 2006.
 34. Corradi, H.R., Chitapi, I., Sewell, B.T., Georgiadis, D., Dive, V., Sturrock, E.D., Acharya, K.R. The structure of testis angiotensin-converting enzyme in complex with the C domain-specific inhibitor RXPA380. **Biochemistry**, v. 46, n. 18, p. 5473-5478, 2007.
 35. Cummins, P.M. A new addition to the renin–angiotensin peptide family: proAngiotensin-12 (PA12). **Cardiovascular Reserach**, v. 82, n. 1, p. 7-8, 2009.
 36. Danser, A.H. Local renin–angiotensin systems: the unanswered questions. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 759-768, 2003.
 37. Danser, A.H., Deinum, J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1069-76, 2005.
 38. Deddish, P.A., Marcic, B., Jackman, H.L., Wang, H.Z., Skidgel, R.A., Erdös, E.G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, n. 4, p. 912-917, 1998.
 39. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1- E9, 2000.
 40. Duan, P. Li, S. You, G. Angiotensin II inhibits activity of human organic anion transporter 3 through activation of protein kinase Ca: Accelerating endocytosis of the transporter. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, n. 1-3, p. 49-55, 2010.
 41. Dubreuil, P., Fulcrand, P., Rodriguez, M., Fulcrand, H., Laur, J., Martinez, J. Novel activity of angiotensin-converting enzyme. Hydrolysis of cholecystokinin and gastrin analogues with release of the amidated C-terminal dipeptide. **Biochemical Journal**, v. 262, n. 1, p. 125-30, 1989.
 42. Dzau, V.J. Vascular wall renin–angiotensin pathway in control of the circulation: a hypothesis. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 4, p. 31-6, 1984 a.

43. Dzau, V.J. Vascular renin–angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p. S377-82, 1984b.
44. Dzau, V.J. Vascular renin–angiotensin system and vascular protection. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, p. S1-9, 1993. (Suppl. 5).
45. Epelman, S., Tang, W.H., Chen, S.Y., Van, L.F., Francis, G.S., Sem, S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin–angiotensin–aldosterone system. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 9, p.750-4, 2008.
46. Esther, C.R Jr., Howard, T.E., Marino, E.M., Goddard, J.M., Capecchi, M.R., Bernstein, K.E. Mice Lacking Angiotensin- Converting Enzyme Have Low Blood Pressure, Renal Pathology and Reduced Fertility. **Laboratory Investigation; a Journal of technical methods and Pathology**, v. 74, n. 5, p. 953-965, 1996.
47. Facó, P.E., Bezerra, G.P., Barbosa, P.S.F., Martins, A.M.C., Guimarães, J.A., Lopes-Ferreira, M., Monteiro, H.S.A. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (Niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 479-482, 2005.
48. Fagyas, M., Uri, K., Siket, I.M., Fulop, G.A., Csato, V., Darago, A. Boczan, J., Banyai, E., Szentkiralyi, I.E., Maros, T.M., Szerafin, T., Edes, I., Papp, Z., Toth, A. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-12, 2014.
49. Ferrario, C.M., Chappell, M.C. What’s new in the renin-angiotensin system? Novel angiotensin peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 61, n. 21, p. 2720-2727, 2004.
50. Ferreira, S.H. The bradykinin potentiation factor (BPF) present in the venom of from *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 163-9, 1965.
51. Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2593, 1970.
52. Ferreira, P.M., Souza Dos Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J. Angiotensin-(3-7) pressor effect at the rostral ventrolateral medulla. **Regulatory Peptides**, v. 141, n. 1-3, p. 168-74, 2007.

53. Ferreira, M.J., Lima, C., Lopes-Ferreira, M. Anti-inflammatory effect of Natterins major toxins from the *Thalassophryne nattereri* fish venom is dependent on TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway. **Toxicon**, v. 87, p. 54-67, 2014.
54. Fonseca, L.A., Lopes-Ferreira, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquin). **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 75, n. 4, p. 435-43, 2000.
55. Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C.R. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 483-511, 2009.
56. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, 1980.
57. Fyhrquist, F. Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224-36, 2008.
58. 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**, v. 3, n. 3, p. 101-106, 1981.
59. Garnier, P., Goudey-Perrière, F., Breton, P., Dewulf, C., Petek, F., Perrère, C. Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synanseja verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal hypotensive and cytolytic factor. **Toxicon**, v. 33, n. 2, p. 143-155, 1995.
60. Gembardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H.P., Siems, W.E., Walther, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1270-7, 2005.
61. Gibbons, G.H., Dzau, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 20, p. 1431-38, 1994.
62. Gohlke, P., Linz, W., Scholkens, B.A., Kuwer, I., Bartenbach, S., Schnell, A., Unger, T. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves cardiac function. Role of bradykinin. **Hypertension**, v. 23, n. 4, p. 411-18, 1994.
63. Gomes, R.A.S., Hial, V., Carmona, A.K., Lopes, I.C.R. Characterization of human pericardial fluid angiotensin converting enzyme activity. **Journal of Hypertension**, v. 22, p. S-70, 2004.

64. Gomes, H.L., Andrich, F., Mauad, H., Sampaio, K.N., de Lima, M.E. Figueiredo, S.G., Moysés, M.R. Cardiovascular effects of scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) venom. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 580-589, 2010.
65. Grady, E.F. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 3, p. 921-33, 1991.
66. Guang, C., Phillips, R.D., Jiang, B., Milani, F. Three key proteases-angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin-within and beyond the renin-angiotensin system (Review). **Archives of Cardiovascular Disease**, v. 105, n. 6-7, p. 373-385, 2012.
67. Haddad-Júnior, V., Pardal, P.P.O., Cardoso, J.L.C., Martins, I.A. The Venomous Toadfish *Thalassophryne nattereri* (Niquim or Miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará state) and Aracaju (Sergipe state), Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 45, n. 4, p. 221-223, 2003.
68. Haddad-Júnior, V., Garrone Neto, D., Paula Neto, J.B., Portella de Luna Marques, F., Barbaro, K.C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 804 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, v. 43, n. 3, p. 287-294, 2004.
69. Hattori, M.A., Del Ben, G.L., Carmona, A.K., Casarini, D.E. Angiotensin I-converting enzyme isoforms (High and low molecular weight) in urine of premature and full-term infants. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1284-1290, 2000.
70. 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**, v. 44, n. 1-2, p. 129-135, 1999.
71. Hollenberg, N.K., Fisher, N.D., Price, D.A. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 387-92, 1998.
72. Hooper, N.M., Turner, A.J. An ACE structure. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 3, p. 155-7, 2003.
73. Hopkins, B.J., Hodgson, W.C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 973-983, 1998.
74. Hubert, C., Houot, A.M., Corvol, P., Soubrier, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 23, p.15377-83, 1991.

75. Imanishi, T., Ikejima H., Tsujioka, H., Kuroi, A., Kobayashi, K., Muragaki, Y., Mochizuki, S., Goto, M., Yoshida, K., Akasaka, T. Addition of eplerenone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor effectively improves nitric oxide bioavailability. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 734-41, 2008.
76. Iwata, M., Cowling, R.T., Gurantz, D., Moore, C., Zhang, S., Yuan, J.X., Greenberg, B.H. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. H2356-63, 2005.
77. Iwata, M., Cowling, R.T., Yeo, S.J., Greenberg, B. Targeting the ACE2-Ang-(1-7)-pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 51, n. 4, p. 542-547, 2011.
78. Jackman, H.L., Massad, M.G., Sekosan, M., Tan, N.F., Brovokovych, V., Marcic, B.M., Eerdos, E.G. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. **Hypertension**, v. 39, n. 5, p. 976-981, 2002.
79. Jaspard, E., Wei, L., Alhenc-Gelas, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9496-503, 1993.
80. Junot, C., Gonzales, M.F., Ezan, E., Cotton, J., Vazeux, G., Michaud, A., Azizi, M., Vassiliou, S., Yiotakis, A., Corvol, P., Dive, V. RXP 407, a Selective Inhibitor of the N-Domain of Angiotensin I Converting Enzyme, Blocks in vivo the Degradation of Hemoregulatory Peptide Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with No Effect on Angiotensin I Hydrolysis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 606-611, 2001.
81. Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A., Yukimura, T., Miura, K., Iwao, H. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. **Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1252-9, 1995.
82. Kim, H.M., Shin, D.R., Yoo, O.J., Lee, H., Lee, J.O. Crystal Structure of Drosophila Angiotensin I-Converting Enzyme Bound to Captopril and Lisinopril. **FEBS Letters**, v. 538, n. 1-3, p. 65-70, 2003.
83. Kirchhoff, K.N., Klingerlhöfer, I., Dahse, H-M., Morlock, G., Wilke, T. Maturity-related changes in venom toxicity of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*. **Toxicon**, v. 92, p. 97-101, 2014.

84. Khoo, H.E. Bioactive proteins from stonefish venom. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 9, p. 802-806, 2002.
85. Kokkonen, J.O., Saarinen, J., Kovanen, P.T. Regulation of local angiotensin II formation in the human heart in the presence of interstitial fluid: inhibition of chymase by protease inhibitors of interstitial fluid and of angiotensin-converting enzyme by Ang(1-9) formed by heart carboxypeptidase A-like activity. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1455-1463, 1997.
86. Komegae, E.N., Ramos, A.D., Oliveira, A.K., Serrano, S.M.de T., Lopes-Ferreira, M., Lima, C. Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: Role of natterins and natterectin in the disruption of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. **Toxicon**, v. 58, n. 6-7, p. 509-517, 2011.
87. Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C.F., Heringer-Walther, S., Sexton, P.M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H.P., Walther, T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1806-13, 2005.
88. Kregel, J.H., John, S.W.M., Langenbach, L.L., Hodgins, J.B., Hagaman, J.R., Bachman, E.S., Jennette, J.C., O'Brien, D.A., Smithies, O. Male-Female Differences in Fertility and Blood Pressure. **Nature**, v. 375, n. 6527, p. 146-148, 1995.
89. Kuba, K., Imai, Y., Ohto-Nakanishi, T., Penninger, J.M. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 119-28, 2010.
90. Kundu, P., Venkitachalam, S., Vidya, T. Why So Toxic? Venom Evolution in Animals. **Resonance**, v. 20, n. 7, p. 617-627, 2015.
91. Kuoppala, A., Lindstedt, K.A., Saarinen, J., Kovanen, P.T., Kokkonen, J.O. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 4, p. H1069-H1074, 2000.
92. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
93. Leung, M.K., Le, S., Houston, S., Stefano, G.B. Degradation of Met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 367-78, 1992.

94. Lew, R.A., Mustafa, T., Ye, S., McDowall, S.G., Chai, S.Y., Albiston, A.L. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 2, p. 344-50, 2003.
95. Lew, R.A. The zinc metallopeptidase family: new faces, new functions. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, n. 5, p. 407-14, 2004.
96. Lewis, R.J., Garcia, M.L., Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.
97. Lima, C., Clissa, P.B., Piran-Soares, A.A., Tanjoni, I., Moura-da-Silva, A.M., Lopes-Ferreira, M. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 499-507, 2003.
98. Liu, X., Fernandez, A., Wouters, M.A., Heyberger, S., Husain, A. Arg(1098) is Critical for the Chloride Dependence of Human Angiotensin I-Converting C-Domain Catalytic Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33518-33525, 2001.
99. Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K.C., Cardoso, D.F., Moura-da-Silva, A.M., Mota, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 405-410, 1998.
100. Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Mota, I., Takehara, H.A. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (Niquim) fish venom by an experimental Antivenom. Short communication. **Toxicon**, v. 38, n. 8, p. 1149-1156, 2000.
101. Lopes-Ferreira, M., Núñez, J., Rucavado, A., Farsky, S.H., Lomonte, B., Angulo, Y., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (Niquim) fish venom in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 1, p. 55-64, 2001.
102. Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Piran-Soares, A.A., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Farsky, S.H. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: A model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1141-1147, 2002.
103. Lopes-Ferreira, M., Emim, J.A., Oliveira, V., Puzer, L., Cezari, M.H., Araújo M.da S., Juliano, L., Lapa, A.J., Souccar, C., Moura-da-Silva, A.M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 2151-2157, 2004.

- 104.Lopes-Ferreira, M., Magalhães, G.S., Fernandez, J.H., Junqueira-de-Azevedo Ide L., Le Ho P., Lima, C., Valente, R.H., Moura-da Silva, A.M. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v. 93, n. 6, p. 971-980, 2011.
- 105.Lopes-Ferreira, M., Grund, L.Z., Lima, C. *Thalassophryne nattereri* fish venom: from the envenoming to the understanding of the immune system (Review). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 35-46, 2014.
- 106.Lund, L., Bak, A., Friis, G.J., Hovgaard, L., Christrup, L.L. The enzymatic degradation and transport of leucine-enkephalin and 4-imidazolidinone enkephalin prodrugs at the blood-brain barrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, n. 1-2, p. 97-101, 1998.
- 107.Magalhães, G.S., Lopes-Ferreira, M., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Spencer, P.J., Araújo, M.S., Portaro, F.C., Ma, L., Valente, R.H., Juliano, L., Fox, J.W., Ho, P.L. Moura-da-Silva, A.M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 687-699, 2005.
- 108.Magalhães, G.S, Junqueira-de Azevedo, I.L, Lopes-Ferreira, M., Lorenzini, D., Ho, P.L, Moura-da Silva, A.M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, v. 88, n. 6, p. 693-699, 2006a
- 109.Magalhães, K.W., Lima, C., Piran-Soares, A.A., Marques, E.E., Hiruma-Lima, C.A., Lopes-Ferreira, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon orbignyi*. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006b.
- 110.Marceau, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology**, v. 30, n.1, p. 1-26, 1995.
- 111.Marques, M.E.C., Tenório, H. de A., Dos Santos, C.W.V, Dos Santos, D.M., De Lima, M.E., Pereira, H.J. Angiotensin converting enzyme of *Thalassophryne nattereri* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 980-986, 2016.
- 112.Mecca, A.P., Regenhardt, R.W., O'Connor, T.E., Joseph, J.P., Raizada, M.K., Katovich, M.J., Sumners, C. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 10, p. 1084-1096, 2011.

113. Menezes, T.N., Carnielli, J.B., Gomes, H.L., Pereira, F.E., Lemos, E.M., Bissoli, N.S., Lopes-Ferreira, M., Andrich, F., Figueiredo, S.G. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 4-11, 2012.
114. Mervaala, E.M., Muller, D.N., Park, J.K., Schmidt, F., Löhn, M., Breu, V., Dragun, D., Ganten, D., Haller, H., Luft, F.C. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 389-95, 1999.
115. Mervaala, E.M., Muller, D.N., Schmidt, F., Park, J.K., Gross, V., Bader, M., Breu, V., Ganten, D., Haller, H., Luft, F.C. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. **Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 587-94, 2000.
116. Muhuri, D., Karmakar, S., Dasgupta, S.C., Nagchaudhuri, A.K., Gomes, A. Pharmacological studies on the venomous spotted butterflyfish (*Scatophagus argus Linn*) sting extract on experimental animals. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 5, p. 461-467, 2004.
117. Murray, B.A., FitzGerald, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 8, p. 773-791, 2007.
118. Naqvi, N., Liu, K., Graham, R.M., Husain, A. Molecular basis of exopeptidase activity in the C-terminal domain of human angiotensin I-converting enzyme: insights into the origins of its exopeptidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6669-75, 2005.
119. Neves, R.R.S., Tenório, H.A., Pereira, H.J.V. Epidemiologic Profile of Accidents Involving *Thalassophryne nattereri* in Alagoas. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 8, n. 373, p. 1-3, 2018.
120. Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., Sraer, J.D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 11, p. 1417-27, 2002.
121. Nguyen, G., Contrepas, A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. **Current Opinion in pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-32, 2008.
122. Oba, R., Igarashi, A., Kamata, M., Nagata, K., Takano, S., Nakagawa, H. The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 733-40, 2005.
123. Ocaranza, M.P., Lavandero, S., Jalil, J.E., Moya, J., Pinto, M., Novoa, U., Apablaza, F., González, L., Hernández, C., Varas, M., López, R., Godoy, I., Verdejo, H., Chiong, M.

- Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 1054-64, 2010.
- 124.Odya, C.E., Marinkovic, D.V., Hammon, K.J., Stewart, T.A., Erdos, E.G. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 17, p. 5927-5931, 1978.
- 125.Oliver, J.A., Sciacca, R.R. Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation of peripheral vascular tone in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 4, p. 1247-51, 1984.
- 126.Ondetti, M.A., Williams, N.J., Sabo F., E., Pluscec, J., Weaver, E.R., Kocy, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, n. 22, p. 4033-4039, 1971.
- 127.Padia, S.H., Kemp, B.A., Howell, N.L., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Carey R.M. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor mediated natriuresis in rats. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 460-5, 2008.
- 128.Paul, M., Wagner, J., Dzau, V.J. Gene expression of the renin–angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 5, p. 2058-64, 1993.
- 129.Paula, C.A., Sousa, M.V., Salgado, M.C., Oliveira, E.B. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzimology**, v. 1388, p. 227-238, 1998.
- 130.Pareja-Santos, A., Saraiva, T.C., Costa, E.P., Santos, M.F., Zorn, T.T., Oliveira-Souza, V.M., Lopes-Ferreira, M., Lima, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 1, p.34-43, 2009.
- 131.Parkin, E.T., Turner, A.J., Hooper, N.M. Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. **Protein and Peptide Letter**, v. 11, n. 5, p. 423-32, 2004.
- 132.Pedroso, C.M., Jared, C., Charvet-Almeida, P., Almeida, M.P., Garrone Neto, D., Lira, M.S., Haddad Jr, V., Barbaro, K.C., Antoniazzi, M.M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 988-697, 2007.

133. Peiró, C., Vallejo, S., Gembardt, F., Azcutia, V., Heringer-Walther, S., Rodríguez-Manás L., Schultheiss, H.P., Sánchez-Ferrer, C.F., Walther, T. Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 12, p. 2421–5, 2007.
134. Pereira, H.J.V., Souza, L.L., Costa-Neto, C. M., Salgado, M.C.O., Oliveira, E.B. Carboxypeptidases A1 and A2 from the perfusate of rat mesenteric arterial bed differentially process angiotensin peptides. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 67-76, 2012.
135. Petrie, M.C., Padmanabhan, N., McDonald, J.E., Hillier, C., Connell, J.M.C., McMurray, J.J.V. Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 4, p. 1056-61, 2001.
136. Politi, V., De Luca, G., Di Stazio, G., Schinina, E., Bossa, F. A new peptide from *Crotalus atrox* snake venom. **Peptides**, v. 6, p. 343-346, 1985. (Suppl. 3).
137. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993.
138. Regoli, D., Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological Reviews**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 1980.
139. Riordan, J.F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. **Genome Biology**, v. 4, n. 8, p. 225, 2003.
140. Rice, G.I., Thomas, D.A., Grant, P.J., Turner, A.J., Hooper, N.M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, v. 383, n. 1, p. 45-51, 2004.
141. Rigatto, K.V., Böhlke, M., Irigoyen, M.C. Sistema Renina Angiotensina: da fisiologia ao tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, p. 1-5, 2004.
142. Rocha e Silva M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G. Bradykynin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of physiology Legacy-Content**, v. 156, n. 2, p. 256-261, 1949.
143. Rousseau, A., Michaud, A., Chauvet, M.T., Lenfant, M., Corvol, P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal

- active site of human angiotensin converting enzyme. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 270, n. 8, p.3656-61, 1995.
- 144.Rykl, J., Thiemann, J., Kurzawski, S., Pohl, T., Gobom, J., Zidek, W., Schlüter, H. Renal cathepsin G and angiotensin II generation. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 9, p. 1797-807, 2006.
- 145.Safavi-Hemami, H., Möller, C., Marí, F., Purcell, A.W. High molecular weight components of the injected venom of fish-hunting cone snails target the vascular system. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 97-105, 2013.
- 146.Sampaio, W.O., Henrique de Castro, C., Santos, R.A., Schiffrin E.L., Touyz, R.M. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, v. 50, n. 6, p. 1093-1098, 2007a.
- 147.Sampaio, W.O., Souza dos Santos, R.A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L.T., Schiffrin, E.L., Touyz, R.M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-192, 2007b.
- 148.Santos, R.A.S. dos, Fagundes-Moura, C.R., Silva, A.C.S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 227-236, 2000.
- 149.Santos, R.A.S., Simões e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R., Walther, T. Angiotensin 1-7 is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.
- 150.Schaeffer, R.C.Jr., Carlson, R.W., Russell, F.E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**, v. 9, n. 1, p. 69-78, 1971.
- 151.Schoolwerth, A.C., Sica, D.A., Ballermann, B.J., Wilcox, C.S. Renal considerations in angiotensin converting enzyme inhibitor therapy: a statement for healthcare professionals from the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and the Council for High Blood Pressure Research of the American Heart Association. **Circulation**, v. 104, n. 16, p. 1985-91, 2001.
- 152.Shahid, M. The angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7) axis: the other side of the renin-angiotensin system. **Experimental physiology**, v. 96, n. 10, p. 987-988, 2011.

153. Shapiro, R., Holmquist, B., Riordan, J.F. Anion Activation of Angiotensin Converting Enzyme: Dependence on Nature of Substrate. **Biochemistry**, v. 22, n. 16, p. 3850-3857, 1983.
154. Shi, L., Mao, C., Xu, Z., Zhang, L. Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 9-10, p. 332-3, 2010.
155. Shimizu, A., Yamagata, T., Tatsuno, H., Esato, M., Ueyama, T., Hayano, T., Oomura, M., Tamura, K., Matsuzaki, M. Radio-frequency catheter ablation therapy in elderly patients with supraventricular tachycardia. **Nihon Ronen Igakkai Zasshi. Japanese Journal of Geriatrics**, v. 35, n. 6, p. 451-57, 1998.
156. Sivieri Jr, D.O., Bispo-da-Silva L.B., Oliveira, E.B., Resende, A.C., Salgado, M.C.O. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 110-5, 2007.
157. Skeggs Jr, L.T., Kahn, J.R., Shumway, N.P. The preparation and function of the angiotensin I converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 3, p. 295-299, 1956.
158. Skeie, E. Toxin of the Weeverfish (*Trachinus draco*). **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 107-120, 1962.
159. Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R., Erdös, E.G. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. **Peptides**, v. 5, n. 4, p. 769-76, 1984.
160. Skidgel, R.A., Erdos E.G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1025-9, 1985.
161. Sosa-Rosales, J.I. Piran-Soares, A.A. Farsky, S.H. Takehara, H.A. Lima, C. Lopes-Ferreira, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**, v. 45, n. 2, p. 155-161, 2005.
162. Swales, J.D., Samani, N.J. Vascular RAA system. **Journal of Human Hypertension**, v. 7, p. S3-S6, 1993. Suppl.2.
163. Takai, S., Kim, S., Sakonjo, H., Miyazaki, M. Mechanisms of angiotensin II type 1 receptor blocker for anti-atherosclerotic effect in monkeys fed a high-cholesterol diet. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 2, p. 361-69, 2003.

164. Tamura, S., Yamakawa, M., Shiomi, K. Purification, characterization and cDNA cloning of two nattering-like toxins from the skin secretion of oriental catfish *Plotosus lineatus*. **Toxicon**, v. 58, n. 5, p. 430-438, 2011.
165. Tenório, H. de A., Marques, M.E.da C., Machado, S.S., Pereira, H.J.V. Angiotensin processing activities in the venom of *Thalassophryne nattereri*. **Toxicon**, v. 98, p. 49-53, 2015.
166. Tenório, H. de A., Costa, R.B., Marques, M.E.C., Victor dos Santos, C.W., Gomes, F.S., Pereira, H.J.V. Angiotensins processing activities in the venom and epidermic mucus of *Scorpaena plumieri*. **Toxicon**, v. 119, p. 92-98, 2016.
167. Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-43, 2000.
168. Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K.S., Bumpus, F.M., Husain, A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22348-22357, 1990.
169. Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 357-366, 2004.
170. Villarreal, F.J., Kim, N.N., Ungab, G.D., Printz, M.P., Dillmann, W.H. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. **Circulation**, v. 88, n. 6, p. 2849-61, 1993.
171. Yang, R., Walther, T., Gembardt, F., Smolders, I., Vanderheyden, P., Albiston, A.L., Chai, S.Y., Dupont, A.G. Renal vasoconstrictor and pressor responses to angiotensin IV in mice are AT1a-receptor mediated. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 3, p. 487-94, 2010.
172. Wang, H.X., Zhang, Q.F., Zeng, X.J., Wang, W., Tang, C.S., Zhang, L.K. Effects of angiotensin III on protein, DNA, and collagen synthesis of neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in vitro. **Journal of Cardiovascular and Pharmacology Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 393-402, 2010.
173. Webb, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

174. Wei L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Clauser, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002-9008, 1991.
175. Welches, W.R., Santos, R.A.S., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Greene, L.J., Ferrario, C.M. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. **Journal of Hypertension**, v. 9, n. 7, p. 631-638, 1991.
176. Wolf, G., Wenzel, U.O. Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. **Hipertension**, v. 43, n. 4, n.7, p. 693-98, 2004.
177. Xu, P., Sriramula, S., Lazartigues, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comporative. Physiology*, v. 300, n. 4, p. R804-R817, 2011.
178. Zhang, C., Wu, S., Xu, D. Catalytic Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme and Effects of the Chloride Ion. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 22, p. 6635-6645, 2013.
179. Ziegman, R., Alewood, P. Bioactive Components in Fish Venoms. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1497-1531, 2015.
180. Zisman, L.S., Keller, R.S., Weaver, B., Lin, Q., Speth, R., Bristow, M.R., Canver, C.C. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1707-12, 2003.