

ANDERSON DANIEL RAMOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE TOXINAS
PRESENTES NA PEÇONHA E NO MUCO DO BAGRE *Cathorops spixii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mônica Lopes Ferreira.

São Paulo

2009

RESUMO

RAMOS, A. D. **Caracterização bioquímica e biológica de toxinas presentes na peçonha e no muco do bague *Cathorops spixii***. 2009. 94 f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Dos peixes peçonhentos encontrados no Brasil os bagres destacam-se pelo número de acidentes que provocam. Seu aparato peçonhento é formado por um ferrão na porção distal de cada nadadeira peitoral e da dorsal. Possuem além da peçonha encontrada em glândulas localizadas nas nadadeiras, uma secreção epidérmica protéica, denominada muco. Devido a essas duas substâncias participarem do envenenamento, o objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquímica e biologicamente os componentes tóxicos (peptídeos e proteínas) presentes nessas duas secreções. Os peixes foram coletados na Baía de Paranaguá, Estado do Paraná, Brasil. Obtivemos uma média protéica de 3,1 mg/mL (peçonha) e 1,4 mg/mL (muco). O perfil eletroforético da peçonha e do muco apresentou poucas bandas protéicas. As amostras apresentaram bandas que variaram de 111,1 a 12,4 kDa. Com o fracionamento obtivemos 11 frações para peçonha e 13 para o muco. Enquanto o muco apresentou um número maior de frações peptídicas a peçonha apresentou frações protéicas de maior intensidade. Análise por espectrometria de massas mostrou que apenas duas frações do muco aparentam estar puras com massa em torno de 1500 Da. Com relação às atividades biológicas avaliadas as frações peptídicas induziram aumento no número de leucócitos rolantes, estase venular, hemorragia e alterações no diâmetro arteriolar. Com relação a atividade antimicrobiana, duas frações obtidas da peçonha foram ativas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungo ao passo que duas frações do muco mostraram-se ativas apenas para a bactéria Gram-negativa. A análise das frações protéicas por eletroforese mostrou diferenças nos componentes presentes nas frações protéicas obtidas da peçonha dos componentes presentes nas frações obtidas do muco. Verificamos que uma fração da peçonha e outra do muco apresentavam apenas uma única banda, onde a da peçonha possui 65,1 kDa e a do muco 62,5 kDa. As demais frações apresentaram mais de uma banda cada. Todas

as frações protéicas obtidas da peçonha ou do muco induziram aumento no número de leucócitos rolantes. Na fração Fp6-peçonha obtivemos uma única banda de 65,1 kDa que foi purificada e caracterizada. A seqüência obtida por degradação de Edman apresentou homologia com *warm acclimation protein* (Wap65) uma glicoproteína do plasma inicialmente identificada em peixes. Verificamos por microscopia intravital que esta proteína causa aumento dos leucócitos rolantes assim como a presença de leucócitos aderidos ao endotélio, o que demonstra sua ação inflamatória. Nossos resultados indicam uma diferença notável entre os componentes protéicos e peptídicos do muco e da peçonha do bagre *C. spixii*. Enquanto as frações protéicas induzem atividade inflamatória, as de baixa massa molecular causam estase venular, contração arteriolar e hemorragia e apresentam atividade antimicrobiana. Finalmente, conseguimos isolar e caracterizar bioquímica e biologicamente a proteína Wap65 da peçonha deste peixe.

Palavras-chave: Venenos. Toxinas. Peixes venenosos. Bagre Marinho. Muco. Wap65.

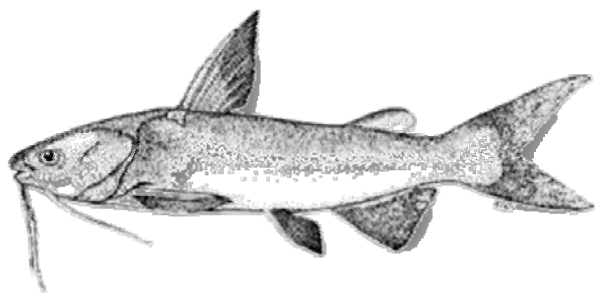
ABSTRACT

RAMOS, A. D. **Biochemical and biological characterization of toxins in the venom and mucus of the catfish *Cathorops spixii***. 2009. 94 p. Master Thesis (Biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2009.

Of the venomous fish found in Brazil, catfish noteworthy for the number of accidents they cause. His venom apparatus consists of a venomous sting in the distal portion of each pectoral and dorsal fin. They have also of the venom glands located in the fins, an epidermal protein secretion called mucus. Because of these two substances involved in poisoning, the aim of this study was to characterize the biochemical and biologically toxic compounds (peptides and proteins) present in these two secretions. Fish were collected in Paranaguá Bay, Paraná State, Brazil. We obtained an average protein intake of 3,1 mg / mL (poison) and 1,4 mg / mL (mucus). The electrophoretic profile of the venom and mucus showed few protein bands. The samples showed bands between 111,1 and 12,4 kDa. With the fractionation, we obtained 11 fractions for venom and 13 for mucus. While the mucus showed a greater number of peptide fractions, venom protein fractions showed greater intensity. Analysis by mass spectrometry showed that only two fractions of mucus appeared to be pure with a mass around 1500 Da. Regarding the biological activities, evaluated peptide fractions induced an increase in the number of rolling leukocytes, venular stasis, hemorrhage and changes in arteriolar diameter. With respect to antimicrobial activity, two fractions obtained from the venom were active for Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungus while the two fractions of mucus were active only for Gram-negative bacteria. The analysis of protein fractions by electrophoresis showed differences in the components present in the protein fractions obtained from the venom of the components present in fractions obtained from the mucus. We note that a fraction of the venom and other from the mucus showed only one band, where the venom has 65,1 kDa, the mucus appears to have 62,5 kDa. The other fractions showed more than one band each. All protein fractions obtained from the venom or mucus induced increase in leukocyte rolling. In the fraction Fp6-venom we obtained a

single band of 65,1 kDa that was purified and characterized. The sequence obtained by Edman degradation showed homology with warm acclimation protein (Wap65), a plasma glycoprotein first identified in fish. We verified by intravital microscopy that this protein causes increased leukocyte rolling as well as the presence of leukocytes adhered to the endothelium, which demonstrates its inflammatory action. Our results indicate a notable difference between the peptide and protein components of venom and mucus of the catfish *C. spixii*. While the protein fractions induce inflammatory activity, the low molecular cause venular stasis, arteriolar contraction and bleeding and have antimicrobial activity. Finally, we isolate and characterize biochemical and biologically protein Wap65 from the venom of this fish.

Keywords: Venoms. Toxins. Venomous fishes. Marine Catfish. Mucus. Wap65.



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Esses animais produzem um número enorme de metabólitos cujas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas, como alcalóides, esteróides, peptídeos e proteínas. Constituem também uma rica fonte de agentes bioquímicos altamente ativos o que aumenta ainda mais a relevância das pesquisas nessa área. Trabalhos realizados com toxinas oriundas de animais aquáticos demonstram que elas representam uma vasta fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas (OLIVEIRA et al., 1990; NUIJEN et al., 1999; RINEHART, 2000; CVETKOVIC, 2002; VAN-KESTEREN et al., 2002).

O Brasil com uma extensa linha costeira (aproximadamente 7.400 Km) apresenta ampla variação de fauna, compreendendo animais de águas temperadas e tropicais. Essa diversidade propicia a existência de grande número de animais potencialmente perigosos e associado a fatores como o grande afluxo de banhistas às praias, ao incremento à pesca comercial e esportiva, mergulho autônomo e pesca submarina, favorece a ocorrência de muitos acidentes em humanos, sendo grande parte destes provocados por peixes peçonhentos. As potentes toxinas presentes nesses animais colocam em risco a saúde principalmente de banhistas e pescadores, devido aos quadros patológicos que provocam nas situações de envenenamento. Dessa maneira, tornam-se necessários estudos nesta área que desvendem a ação dessas peçonhas e sua natureza bioquímica.

Os peixes peçonhentos apresentam glândulas especializadas em produzir substâncias tóxicas e um aparelho inoculador da mesma, podendo ser traumático, nos casos dos ferimentos causados por acúleos, rostros, dentes e esporões (SCHVARTSMAN, 1992). Todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil (HADDAD JR., 2003). Possuem importância médica pelos acidentes que provocam em humanos, uma vez que mantêm a vítima afastada do trabalho por semanas ou meses, além de acarretar importantes seqüelas.

Os peixes peçonhentos que mais causam acidentes no Brasil são os popularmente chamados de arraia (HADDAD JR., 2000), peixe-escorpião (FIGUEIREDO et al., 1978; 1980; HADDAD JR. et al., 2003), niquim (ALMEIDA et al., 1989; AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000) e bagre (HADDAD Jr., 2000).

As arraias pertencem à ordem Rajiformes e podem ser marinhas ou fluviais. Possuem um longo apêndice caudal semelhante a um chicote onde estão localizados de um a quatro ferrões mineralizados serrilhados, recobertos por glândulas de veneno (HALSTEAD, 1970). Podem acidentar banhistas por serem pisadas ou pescadores quando estes as manipulam presas em anzóis ou em redes de pesca. O envenenamento causa imediatamente intensa dor, edema e em alguns casos hemorragia e necrose (SUTHERLAND, 1983; EDMONDS, 1989; HADDAD JR. et al., 2004). Dentre as espécies de arraias brasileiras destacam-se as do gênero *Potamotrygon* por causarem grande número de acidentes na região Norte. Haddad Jr. e colaboradores (2004) descreveram que a peçonha de *Potamotrygon falkneri* apresenta um perfil eletroforético com bandas protéicas de 12 a 130 kDa. Por eletroforese com substratos específicos, os autores detectaram na peçonha atividades gelatinolítica, caseinolítica e hialuronidásica e as correlacionaram às proteínas de 80, 100 e 84 kDa, respectivamente. A caracterização das principais atividades tóxicas de outras duas arraias brasileiras *Potamotrygon cf scobina* e *Potamotrygon gr orbigny* foi descrita por Magalhães e colaboradores (2006). Demonstrou-se que a injeção das peçonhas na pata de camundongos induz significativa atividade edematogênica e nociceptiva de forma dose-dependente. Utilizando a técnica de microscopia intravital observou-se que as peçonhas destas arraias induzem aumento no número de leucócitos rolantes e aderidos na parede de vênulas pós-capilares da microcirculação de cremaster de camundongos. Além disso, essas peçonhas apresentam atividade necrosante de pouca intensidade e somente em altas concentrações (100 µg/dorso). Baixos níveis de atividade proteolítica foram detectados e as peçonhas não induzem hemorragia. Análise de SDS-poliacrilamida mostrou um perfil eletroforético semelhante entre as peçonhas das duas espécies, exceto pela presença de duas bandas exclusivas na peçonha de *P. gr orbigny*, uma de 66,2 e outra de 25 kDa (MAGALHÃES et al., 2006). Em 2006

Conceição e colaboradores determinaram a seqüência de um peptídeo denominado Orpotrin na peçonha da arraia *P. gr. orbigny* com atividade vasoconstritora em arteríolas. Nesta mesma arraia foi encontrado o peptídeo denominado Porflan, cuja seqüência foi determinada e sua ação inflamatória caracterizada (CONCEIÇÃO et al., 2009).

Os peixes-escorpião, pertencentes à família Scorpaenidae, são freqüentemente encontrados na costa brasileira entre rochas e recifes de corais e em baixas profundidades. No Brasil, as espécies mais encontradas são *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião preto) e *Scorpaena brasiliensis* (peixe-escorpião vermelho). São igualmente conhecidos como mamangava, mamangá ou beatriz. Os espinhos estão distribuídos ao longo da nadadeira dorsal (13), 3 anais e 2 pélvicos, todos contendo individualmente pequenas glândulas produtoras de veneno. Os sinais do envenenamento provocado por esta espécie em humanos incluem dor intensa, edema, necrose localizada e alterações sistêmicas como dificuldade respiratória, hipotensão, arritmia, bradicardia, e em casos mais graves paralisia e convulsões (FIGUEIREDO et al., 1978; 1980; HADDAD JR. et al., 2003). Estudo publicado em 2005 por CARRIJO e colaboradores mostrou que camundongos injetados com doses sub-letais da peçonha de *S. plumieri* (LD₅₀ 0,28 mg/Kg) apresentam perda de controle dos movimentos, hipersalivação, convulsões e arritmias respiratória e cardíaca. O efeito cardiovascular foi avaliado e em baixas doses (0,04 mg/Kg) a peçonha foi capaz de induzir abrupta queda na pressão arterial e diminuição na freqüência respiratória. Induziu ainda atividade hemorrágica, hemolítica e proteolítica em camundongos. Boletini-Santos e colaboradores verificaram recentemente (2008) que a peçonha de *S. plumieri* é capaz de induzir resposta sistêmica causando um dano pulmonar agudo em camundongos, caracterizado por extravasamento protéico do espaço vascular para o alveolar e infiltrado de leucócitos (neutrófilos e macrófagos), presença de citocinas e quimiocinas (IL-6, KC e MCP-1) como também de proteinases com atividade gelatinolítica (MMP-2 e MMP-9). Neste estudo, a lesão pulmonar aguda foi induzida pela peçonha tanto pela via intraperitoneal quanto pela via intraplantar. Além disso, foi descrito um complexo padrão eletroforético da

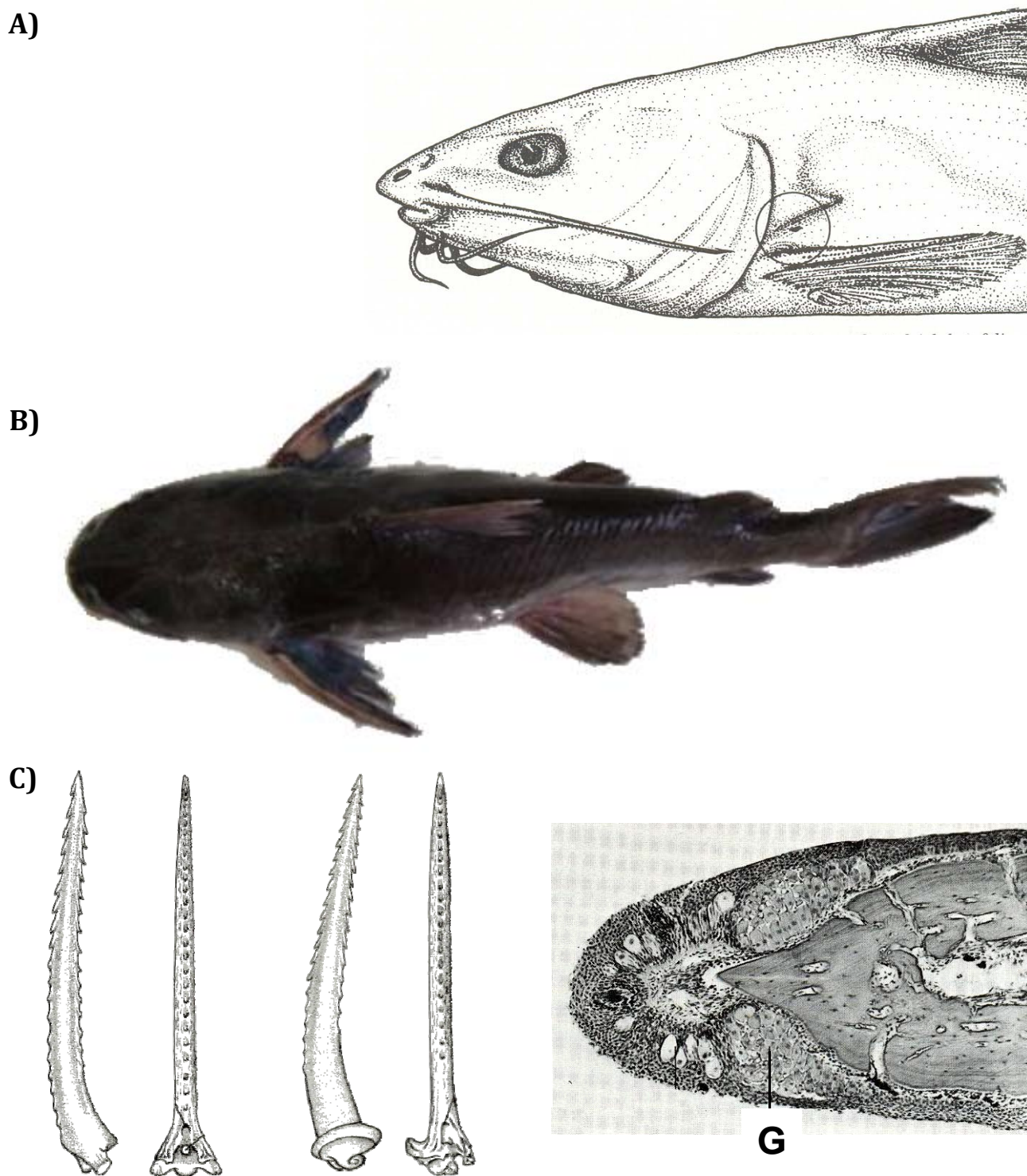
peçonha em SDS-acrilamida, que apresenta nove bandas majoritárias que variam entre 25 e 116 KDa.

Os niquins pertencem à família Batrachoididae, são divididos em 15 espécies, das quais 4 são encontradas no Brasil: *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazonica*. Entretanto, os únicos relatos de acidentes referem-se à espécie *T. nattereri*. Este é encontrado ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, principalmente no encontro de águas marinhas e fluviais. São popularmente chamados de niquim, miquim ou niquim-de-lama. Dos peixes peçonhentos possui o mais completo aparelho inoculador de peçonha, consistindo de quatro espinhos, dois localizados na região dorsal e dois nas laterais. Todos os espinhos são canaliculados e possuem comunicação com glândulas produtoras de toxinas presente na base dos espinhos. Funcionam como arma de defesa e no momento em que o peixe se sente agredido, tocado ou pisado se eriçam e penetram funcionando como uma agulha injetando a peçonha no tecido do agressor ou da vítima humana como os pés e as mãos (FRÓES, 1932, 1933). Os acidentes provocados pelo *T. nattereri* se caracterizam pela intensa dor, edema e necrose (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000). Estudos realizados com a peçonha de *T. nattereri* em camundongos mostram que baixas doses são suficientes para induzir efeitos locais de dor e edema. A peçonha não induz atividade hemorrágica, fosfolipásica A2 ou coagulante (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Além disso, a peçonha é capaz de alterar a fisiologia renal de ratos interferindo principalmente em parâmetros vasculares (FACÓ et al., 2003). A análise histopatológica da lesão induzida pela peçonha no músculo gastrocnêmio de camundongos mostrou aparecimento de mionecrose precoce e de difícil regeneração, trombos e poucas células fagocitárias (LOPES-FERREIRA et al., 2001). A análise por microscopia intravital mostrou que a peçonha induz estase do fluxo sanguíneo nas vênulas pós-capilares e em capilares e vasoconstrição das arteríolas. De modo interessante, a estase venular ocorrida não está associada à ação do veneno sobre fatores solúveis da coagulação, pois testes *in vitro* mostram que a peçonha não é capaz de induzir coagulação do sangue total, do plasma rico ou agir sobre plaquetas (LOPES-FERREIRA et al., 2002). Com relação à ação inflamatória foi verificado que após a injeção da peçonha no coxim plantar de camundongos

ocorre a liberação de importantes citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 na lesão, porém acompanhada de uma pobre migração celular. Foi ainda verificado que a peçonha afeta a viabilidade de células mononucleares da linhagem J774A1 em cultura (LIMA et al., 2003). Também foi verificado que a nocicepção e o edema causados pelo veneno podem ser mediados por toxinas com atividade cininogenásica (LOPES-FERREIRA et al., 2004). Além disso, a peçonha promove resposta imune específica com diferenciação de linfócitos T de ambos os tipos (Th1 e Th2) com grande produção de IL-5 e IFN- γ , promovendo a síntese de anticorpos veneno específicos IgG1 e IgG2a e IgE total (GRUND et al., 2006). As toxinas da peçonha de *T. nattereri* vêm sendo obtidas através da utilização de técnicas cromatográficas seguida da caracterização de suas seqüências através da abordagem de química de proteínas (isolamento e seqüenciamento de peptídeos internos e N-terminal) e de biologia molecular (transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas). Utilizando as abordagens acima descritas foram descobertas as seguintes toxinas: Família Natterinas (N1, MM 35,8 kDa e pI 8,18; N2, MM 38,1 kDa e pI 8,76 e N3, MM 35,0 kDa e pI 6,70) e Nattectina (MM 15,0 kDa e pI 9,73). A Nattectina apresenta homologia com proteínas lectina do tipo C enquanto as Natterinas que são as toxinas majoritárias não apresentam homologia com proteínas encontradas nos bancos de dados (MAGALHÃES et al., 2005), possuindo atividade cininogenásica, nociceptiva e edematogênica (MAGALHÃES et al., 2005).

Os bagres destacam-se por causar um grande número de acidentes, uma vez que são encontrados em toda costa brasileira sendo mais abundantes nas regiões Sudeste e Sul (REIS, 1986). Estão divididos em 31 famílias das quais duas são marinhas, Plotosidae e Ariidae (BURGESS, 1989; KOBAYAGAWA, 1991; MOYLE, 1996). São peixes de couro e vivem em locais rasos e de fundo lodoso. O aparato peçonhento do bagre inclui um único ferrão (levemente serrilhado) na porção distal de cada nadadeira peitoral e da dorsal e apresentam três diferentes peçonhas (Figura 1) (HALSTED et al., 1953). A peçonha do ferrão encontrada no epitélio glandular que o reveste; a peçonha glandular encontrada nas glândulas localizadas na base dos espinhos laterais; e o muco (ictiocrinotoxina) que consiste de um material protéico e gelatinoso produzido por células elaboradoras de

proteínas denominadas “células-club” (THULESIUS et al., 1983). As “células-club” estão presentes em abundância nos bagres e produzem toxinas que são liberadas posteriormente para a superfície da pele (Al-HASSAN et al., 1987). A importância do seu conteúdo não está bem definida, embora algumas funções de proteção para o peixe tenham sido sugeridas, como a existência de ferormônios específicos que atuam como substâncias de alarme, quando são ameaçados ou feridos.



Halstead et al., 1953.

Figura 1. Exemplar de *Cathorops spixii* e diagrama mostrando as diferentes peçonhas encontradas nos bagres. Em A, figura mostrando a localização da glândula axilar. Em B foto do animal e em C, figura mostrando os espinhos dorsal e peitoral respectivamente e corte transversal do espinho apontando a localização da glândula de veneno (G).

Estudos importantes foram realizados com peçonhas dos bagres indianos *Heteropneustes fossilis*, *Plotosus canius* e *Plotosus lineatus* e do bagre *Arius thalassinus* encontrado no Golfo Árabe. Com relação as peçonhas desses animais, pesquisadores verificaram que as de *H. fossilis*, *P. canius* e *A. thalassinus* induzem respostas contráteis em preparações de músculo liso (DATTA et al., 1982; AUDDY et al., 1994; THULESIUS et al., 1983). Além disso, a peçonha do bagre *H. fossilis* produz um aumento inotrópico em corações de sapos e porcos da Índia (DATTA et al., 1982), enquanto a toxina letal, denominada Toxina-PC de *P. canius* causa parada no batimento do coração de porcos da Índia (AUDDY e GOMES, 1996). Vale ressaltar que a peçonha do bagre *H. fossilis* também produz uma importante resposta hipotensiva (DATTA et al., 1982) ao contrário da peçonha de *P. canius* que produz resposta hipertensiva *in vivo* (AUDDY et al., 1994). Sintomas neurotóxicos foram induzidos pela peçonha de *P. lineatus* quando administrada intraperitonealmente em camundongos (FAHIM et al., 1996). A atividade hemolítica foi detectada nos venenos de *P. canius* e *H. fossilis*, enquanto a peçonha do bagre *P. lineatus* mostrou-se citotóxica para células tumorais de Ehrlich (FAHIM et al., 1996).

Importantes estudos também foram realizados com o muco do bagre *A. thalassinus*. Quando este animal se sente ameaçado, sua secreção apresenta fosfolipídeos e glicolipídeos. Como esta secreção é composta principalmente de glicoproteínas, acredita-se que seja elaborada para defesa, não contra predadores, mas contra lesões (AL-HASSAN et al., 1986b). Quando frações solúveis desta peçonha foram injetadas por via intravenosa em coelhos, observou-se morte dos animais, além de agregação de plaquetas e síntese de prostanoídes (AL-HASSAN et al., 1985a, 1987). Também foi comprovado que estas secreções são compostas por fatores vasoativadores (THULESIUS et al., 1983; AL-HASSAN et al., 1986a), hemolítico (AL-LAHHAM et al., 1987), hemaglutinante (AL-HASSAN et al., 1986b), e um ativador de fosfolipase A (AL-HASSAN et al., 1987). Thulesius e colaboradores (1983) analisando a secreção da pele de *A. thalassinus* encontraram altas concentrações de proteínas, limitada quantidade de lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, com atividades enzimáticas, incluindo fosfatase alcalina e esterases. A secreção do muco apresentou ainda, isoprostanos, substâncias que contribuem

para o fechamento e aceleração na cura de feridas em animais de laboratório e de úlceras diabéticas (AL-HASSAN et al., 1998; AL-HASSAN, 1990; AL-BOW et al., 1997).

No muco outro aspecto muito importante e que tem sido alvo de muitas pesquisas são os peptídeos antimicrobianos. Estes têm sido encontrados no muco de peixes peçonhentos ou não. Uma vez que os peixes estão em contato íntimo com uma rica micro biota e que não possuem resposta imune específica presume-se que usem seu sistema imune inato como linha de defesa contra a invasão microbiana (ELLIS, 2001). O muco funciona como uma barreira física e química, inibindo a colonização de potenciais microorganismos infecciosos e invasão de parasitas metazoários (ALEXANDER e INGRAM, 1992; KAATTARI e PIGANELLI, 1996; ELLIS, 1982). A principal vantagem dos peptídeos antibacterianos como fatores da imunidade inata são que eles podem funcionar sem alta especificidade ou memória. Peptídeos antibacterianos são prontamente sintetizados a baixo custo metabólico, estocados em larga quantidade e prontamente disponíveis após uma infecção (OREN e SHAI, 1996). A maioria dos peptídeos antimicrobianos é produzida como pré-proteínas codificadas pelo gene e são processadas por vias definidas para sua forma peptídica ativa (EPAND e VOGEL, 1999). Entretanto, um grande número de peptídeos antimicrobianos foi descoberto como sendo derivado por proteólise de grandes proteínas com outras funções conhecidas como a lactoferrina (ULVATNE e VORLAND, 2001), proteína ribossomal L1 (PUTSEP et al., 1999) e histona H2A (KIM et al., 2000; CHO et al., 2002).

Uma variedade de toxinas já foi isolada de peçonhas de peixes, entre elas podemos citar a dracotoxina (CHATWALL e DREYER, 1992), trachinina (PERRIERE et al., 1988), toxina-PC (AUDDY e GOMES, 1996), stonustoxina (POH et al., 1991) e trachynilisina (COLASANTE et al., 1996). Generalizando, essas toxinas possuem toda a atividade letal e geralmente a maioria das outras atividades biológicas de cada peçonha. Assim, ao contrário dos venenos de muitos animais terrestres, venenos de peixes parecem possuir apenas um pequeno número de toxinas (CHURCH e HODGSON, 2002). Nos bagres, uma fração tóxica da secreção epidérmica do bagre *Arius thalassinus* foi isolada. Caracteriza-se por ser uma

proteína com peso molecular de aproximadamente 39 Kda e PI de 5,45. A toxina purificada tem uma dose letal de 0,045 mg/Kg em coelhos (THOMSON et al., 1998). Análises comparativas com a dose letal da toxina bruta que é aproximadamente 1,5 mg/Kg (AL-HASSAN et al., 1985b), indicam que essa toxina é 30 vezes mais potente que a toxina bruta (THOMSON et al., 1998).

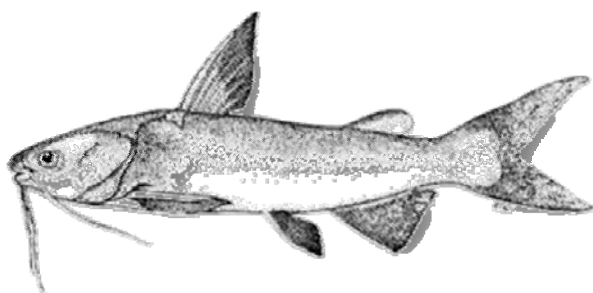
Embora os bagres sejam encontrados em toda extensão da costa brasileira e causem muitos acidentes (HADDAD JR. e MARTINS, 2006), poucos trabalhos existem sobre as peçonhas ou o muco encontrado nesses animais. Dentre os bagres encontrados no Brasil destaca-se o *Cathorops spixii* (Figura 1). São peixes costeiros, de fundo e águas que raramente ultrapassam trinta metros, comuns em fundos de areia ou lodo. Apresenta uma distribuição Atlântico Sul Ocidental, restrita ao sudeste e sul do Brasil (MENEZES et al., 2003). Estes animais causam grande parte dos acidentes relatados. Os acidentes ocorrem principalmente quando pescadores manuseiam redes de pesca e quando banhistas pisam em um exemplar morto descartado na praia. A peçonha é introduzida pelo peixe através dos espinhos das nadadeiras e causa um ferimento puntiforme. Os sintomas apresentados são eritema, edema, dor, sudorese fria, mal-estar, febre, náuseas, vômitos, agitação psicomotora, podendo ocorrer infecção secundária (HADDAD JR. et al., 1999, 2006).

Os trabalhos realizados até o momento referem-se principalmente a biologia reprodutiva (SILVA, 1996; SILVA et al., 1998), variação espacial e temporal (AZEVEDO et al., 1999), hábitos alimentares (REYNA-KURTZ, 2003), distribuição e reprodução (MELO e TEIXEIRA, 1992). Entretanto trabalhos realizados pelo nosso grupo com o *Cathorops spixii* mostraram que a peçonha e o muco induzem nocicepção e edema em camundongos (MONDIN et al., 2007). Além disso, Junqueira e colaboradores (2007) mostraram que a peçonha e o muco deste bagre são capazes de induzir resposta imune inata e desencadear a resposta imune específica em camundongos. Respostas estas reguladas pela presença de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, de mediadores lipídicos (Leucotrieno e Prostaglandina), da citocina IL-6 e das quimiocinas KC e MCP-1. Induzem a síntese de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a, o que sugere que a peçonha e o

muco são capazes de induzir uma resposta imune específica mista, com diferenciação de clones de linfócitos dos tipos Th1 e Th2 (JUNQUEIRA, 2006).

Uma vez que os resultados obtidos demonstram a existência de uma mistura complexa na peçonha e no muco do *C. spixii* com funções tóxicas sobre camundongos, reprodutível do envenenamento em humanos, decidimos continuar os estudos com esta espécie buscando a caracterização de suas toxinas, presentes na peçonha do ferrão e no muco. Decidimos avaliar a ação das toxinas encontradas na microcirculação de cremaster de camundongos, uma vez o processo inflamatório inicia-se na microcirculação. Além do papel fisiológico, os vasos da microcirculação participam ativamente de processos patológicos, pois respondem a estímulos nocivos ou a substâncias endógenas com alterações morfológicas e funcionais características. Distúrbios nos diversos mecanismos empregados para a manutenção fisiológica acarretam a gênese de diversos quadros patológicos, principalmente a hipertensão, distúrbios hemostáticos e resposta inflamatória. Ademais, uma vez que a literatura mostra uma grande quantidade de peptídeos antimicrobianos encontrados em mucos de peixes resolvemos também investigar a existência de peptídeos com essa função.

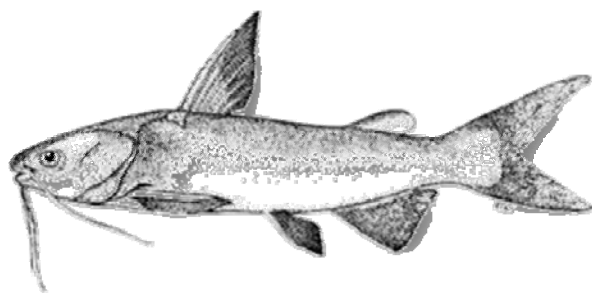
Acreditamos que os resultados obtidos contribuem para o esclarecimento das propriedades biológicas da peçonha e do muco dos peixes peçonhentos, como também fornecem subsídios para o desenvolvimento de tratamentos específicos e adequados para os envenenamentos provocados por eles.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Os peptídeos e as proteínas encontradas na peçonha ou no muco apresentam diferenças nas atividades;
2. Importantes frações peptídicas foram detectadas com ação antimicrobiana e antifúngica e estas têm potencial para se tornarem importante ferramenta biológica;
3. Os danos teciduais observados no envenenamento podem ser decorrentes da ação de peptídeos enquanto o processo inflamatório é decorrente principalmente da ação das proteínas presentes na peçonha e no muco de *C. spixii*;
4. A peçonha de *C. spixii* possui uma proteína denominada WAP65 com ação pró-inflamatória.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AL-BOW, H. A.; AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; THULESIUS, O.; ELKHAWAD, A. Multiple vasoactive factors in epidermal secretions of the arabian gulf catfish, *Arius bilineatus* (valenciennes). **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 28, n. 5, p. 737-744, 1997.

AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; CRIDDLE, K. R.; SUMMERS, B.; CRIDDLE, R. S. Catfish epidermal secretions in response to threat or injury: a novel defense response. **Marine Biology**, v. 88, p. 117, 1985a.

AL-HASSAN, J. M.; ALI, M.; THOMSON, M.; FATIMA, T.; GUBLER, C. J. Toxic effects of the soluble skin secretion from the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell) on plasma and liver enzyme levels. **Toxicol.**, v. 23, p. 532, 1985b.

AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; ALI, M.; FAYAD, S.; ELKHAWAD, A.; THULESIUS, O.; CRIDDLE, R. S. Vasoconstrictor components in the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell) proteinaceous skin secretion. **Toxicol.**, v. 24, n. 10, p. 1009-1014, 1986a.

AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; SUMMERS, B.; CRIDDLE, R. S. Purification and properties of a hemagglutination factor from Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*) epidermal secretion. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 85, p. 31-39, 1986b.

AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; ALI, M.; CRIDDLE, R. S. Toxic and pharmacologically active secretions from the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell). **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 6, p. 1-43, 1987.

AL-HASSAN, J. M. Diabetic ulcer healing preparations from the skin of the Arabian Gulf catfish (*Arius bilineatus*): a novel and effective treatment. **Int. J. Tissue React.**, v. 12, n. 2, p. 121-135, 1990.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AL-HASSAN, J. M.; ALI M.; THOMSON M.; PACE-ASCIAC C. R. Detection of 8-epi prostaglandin F₂alpha in an extract of epidermal secretion of the catfish from the Arabian Gulf. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 59, n. 5, p. 325-328, 1998.

AL-LAHHAM, A.; AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; CRIDDLE, R. S. A hemolytic protein secreted from epidermal cells of the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87, p. 321-327, 1987.

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Non-cellular non-specific defense mechanisms of fish. **Ann. Rev. Fish Dis.**, v. 2, p. 249-279, 1992.

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registros de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, v. 2, n. 1, p. 49-51, 1989.

ALIZA, D.; ISMAIL, I. S.; KUAH, M. K.; SHU-CHIEN, A. C.; MUHAMMAD, T. S. T. Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 34, p. 129-138, 2008.

ALTRUDA, F.; POLI, V.; RESTAGNO, G.; ARGOS, P.; CORTESE, R.; SILENGO, L. The primary structure of human hemopexin deduced from cDNA sequence: evidence for internal, repeating homology. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, p. 3841-3859, 1985.

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

AUDDY, B.; GOMES, A. Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. Occurrence of lethal protein toxin (toxin-PC). **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 225-229, 1996.

AUSTIN, B.; MCINTOSH, D. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **J. Fish Dis.**, v. 11, p. 275-277, 1988.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Revista da Escola de Ciências Médicas de Alagoas**, v. 5, p. 35-36, 1992.

AZEVEDO, M. C. C.; ARAÚJO, F. G.; CRUZ-FILHO, A. G. Variação espacial e temporal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Rev. Brás. Biol.**, v. 59, p. 443-454, 1999.

BIANCHI, E.; BENDER, J. R.; BLASI, F.; PARDI, R. Through and beyond the wall: late steps in leukocyte transendothelial migration. **Immunol. Today**, v. 18, p. 586-591, 1997.

BOLETINI-SANTOS, D.; KOMEAGAE, E. N.; FIGUEIREDO, S. G.; HADDAD, V. JR.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 585-596, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIN, S. D. Introduction: the microcirculation. In: BRAIN, S. D. (Ed.). **Immunopharmacology of the microcirculation**. London: Academic Press, 1994. p. 1-7.

BULET, P.; DIMARCQ, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VANDORSSELAER, A.; HOFFMANN, J. A. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 14893-14897, 1993.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 169-184, 2004.

BURGESS, W. E. **An atlas of freshwater and marine catfishes**. New Jersey: TFH publications, 1989.

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, p. 60, 1996.

CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; FIGUEREIDO, S. G. Biological properties of the venom from the Scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**, v. 45, p. 843-850, 2005.

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

CHO, J. H.; PARK, I. Y.; KIM, H. S.; LEE, W. T.; KIM, M. S.; KIM, S. C. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 429-431, 2002.

CHOI, C. Y.; AN, K. W.; CHOI, Y. K.; JO, P. G.; MIN, B. H. Expression of warm temperature acclimation-related protein 65-kDa (Wap65) mRNA, and physiological changes with increasing water temperature in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. **J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.**, v. 309, n. 4, p. 206-214, 2008.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.

CID, M. C.; KLEINMAN, H. K.; GRANT, D. S.; SCHNAPER, H. W.; FAUCI, A. S.; HOFFMAN, G. S. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 17-25, 1994.

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

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R. S., V. KUMAR, AND T. COLLINS (Ed.). **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 50-88.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*. **Peptides**, v. 27, n. 12, p. 3039-3046, 2006.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNMANDEZ, J. H. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* venom. **Peptides**, 2009. In press.

CVETKOVIC, R. S.; FIGGIT, D. P.; PLOSKER, G. L. ET-743. **Drugs**, v. 62, p. 1185-1192, 2002.

DATTA, A.; GOMES, A.; SARANGI, B.; KAR, P. K.; LAHIRI, S. C. Pharmacodynamic actions of crude venom of the Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. **India J. Med. Res.**, v. 76, p. 892-897, 1982.

DELANGHE, J. R.; LANGLOIS, M. R. Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. **Clin. Chim. Acta**, v. 12, n. 1-2, p. 13-23, 2001.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

EDMONDS, C. **Dangerous marine creatures**. New South Wales: Reed Books, 1989.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A. V.; BULET, P. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 29537-29544, 1996.

ELLIS, A. E. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In: ROBERTS, R. J. (Ed.). **Microbial Diseases of Fish**. London: Academic Press, 1982. p. 1-30.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, p. 827-839, 2001.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1462, p. 11-28, 1999.

FACÓ, P. E.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; NOBRE, A. C.; BEZERRA, G. P.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 509-514, 2003.

FAHIM, F. A.; MADY, E. A.; AHMED, S. M.; ZAKI, M. A. Biochemical studies on the effect of *Plotosus lineatus* crude venom (*in vivo*) and its effects on EAC-cells (*in vitro*). **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 343-355, 1996.

FENG, L. Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. **Immunol. Res.**, v. 21, p. 203-210, 2000.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Brasil – II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1978.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Brasil – III. Teleostei (2)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1980.

FRÓES, H. P. Sur un poisson toxiphore brésilien: le “niquim” *Thalassophryne maculosa*. **Rev. Sud. Am. Me. Chl.**, v. 3, p. 871-878, 1932.

FRÓES, H. P. Peixes toxíforos do Brasil. **Bahia Med.**, v. 4, p. 69-75, 1933.

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. Bras. Dermatol.**, v. 7, n. 4, p. 435-443, 2000.

FOUZ, B.; DEVESA, S.; GRAVNINGEN, K.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Antibacterial action of the mucus of turbot. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.**, v. 10, p. 56-59, 1990.

FOXMAN, E. F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1349-1360, 1997.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leuk. Biol.**, v. 55, n. 5, p. 662-675.

GRINDE, B.; JOLLES, J.; JOLLES, P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Eur. J. Biochem.**, v. 173, p. 269-273, 1988.

GRUND, L. Z.; SOUZA, V. M. O.; MAURO-FAQUIM, E. L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 499-508, 2006.

HADDAD JR., V. **Avaliação epidemiológica, clínica e terapêutica de acidentes provocados por animais peçonhentos marinhos na região sudeste do Brasil.** Ph. D. Thesis (Doutorado em Medicina – Dermatologia) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

HADDAD JR., V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de diagnóstico e tratamento de acidentes.** São Paulo: ROCA, 2000.

HADDAD JR., V.; MARTINS I. A.; MAKYAMA, H. M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 79-83, 2003.

HADDAD JR., V.; GARRONE NETO, D.; PAULA NETO, J. B.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based in 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom.. **Toxicon**, v. 43, n. 3, p. 287-294, 2004.

HADDAD JR., V.; LASTORIA, J. C. Acidentes por mandijubas (mandis-amarelos): aspectos clínicos e terapêuticos. **Diagn. Tratamento**, v. 10, n. 3, p. 132-133, 2005.

HADDAD JR., V.; MARTINS, I. A. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 838-843, 2006.

HALSTEAD, B. W.; KUNINOBU, C.; HEBARD, H. Catfish tings and the venom apparatus of the mexican catfish *Galeichthys felis* (Linnaues). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 4, p. 297-314, 1953.

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world.** Washington: U.S. Governement Printing Office, 1970. v. 3.

HIRAYAMA, M.; NAKANIWA, M.; IKEDA, D.; HIRAZAWA, N.; OTAKA, T.; MITSUBOSHI, T.; SHIRASU, K.; WATABE, S. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 29, p. 211-224, 2003.

HIRAYAMA, M.; KOBIYAMA, A.; KINOSHITA, S.; WATABE, S. The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. **J. Exp. Biol.**, v. 207, n. 8, p. 1387-1398, 2004.

HJELMELAND, K.; CHRISITE, M.; RAA, J. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. **J. Fish Biol.**, v. 23, p. 13-22, 1983.

JUNQUEIRA, M. E. P.; MONDIN, A. C.; DE MAGALHÃES LOPES, C. A.; LOPES-FERREIRA, M. Eletrophoretical charactetization and inducion of edema and nociception by the skin venom of the *Genidens genidens*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, SYMPOSIUM OF THE PAN AMERICAN SECTION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2004, Angra dos

Reis. **Abstracts...** Brasil: VII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, VIII Symposium of the Pan American Society on Toxinology, 2004. p. 114, v. 1.

JUNQUEIRA, M. E. P. **Resposta imune induzida pelas peçonhas do bagre *Cathorops spixii***. Ph. D. Thesis (Doutorado em Doenças Tóxicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Botucatu, 2006.

JUNQUEIRA, M. E.; GRUND, L. Z.; ORII, N. M.; SARAIVA, T. C.; DE MAGALHÃES LOPES, C. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 909-919, 2007.

KAATTARI, S. L.; PIGANELLI, J. D. The specific immune system: humoral defense. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment**. San Diego: Academic press, 1996. p. 207-254.

KEANE, M. P.; STRIETER, R. M. Chemokine signaling in inflammation. **Crit. Care Med.**, v. 28, p. N13-N26, 2000.

KIM, H. S.; YOON, H.; MINN, I.; PARK, C. B.; LEE, W. T.; ZASLOFF, M.; KIM, S. C. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3268-3274, 2000.

KIKUCHI, K.; WATABE, S.; SUZUKI, Y.; AIDA, K.; NAKAJIMA, H. The 65-kDa cytosolic protein associated with warm temperature acclimation in goldfish, *Carassius auratus*. **J. Comp. Physiol. B**, v. 163, p. 349–354, 1993.

KIKUCHI, K.; YAMASHITA, M.; WATABE, S.; AIDA, K. The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17087–17092, 1995.

KIKUCHI, K.; WATABE, S.; AIDA, K. The Wap65 gene expression of goldfish (*Carassius auratus*) in association with warm water temperature as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 17, p. 423–432, 1997.

KIKUCHI, K.; WATABE, S.; AIDA, K. Isolation of a 65-kDa protein from white muscle of warm temperature-acclimated goldfish (*Carassius auratus*). **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 120, p. 385–391, 1998.

KINOSHITA, S.; ITOI, S.; WATABE, S. cDNA cloning and characterization of the warm-temperature-acclimation-associated protein Wap65 from carp *Cyprinus carpio*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 24, p. 125–134, 2001.

KOBAYAGAWA, M. **The World of Catfishes**. New Jersey: TFH publications, 1991.

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

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

LOMONTE, B.; LUNGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle; an intravital. **Toxicon**, v. 32, p. 41-55, 1994.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A. S.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *T. nattereri* fish venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1304, 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; NÚÑEZ, N.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J.M. Necrosis induced by *thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in murine skeletal muscle: a novel tool to study muscle degeneration and regeneration. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 55-64, 2001.

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

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

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

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

MELO, S. C.; TEIXEIRA, R. L. Distribuição, reprodução e alimentação de *Cathorops spixii* e *Arius rugispinis* (Pisces, ARIIDAE) do complexo Mandaú/Manguaba, Maceió-Al. **Rev. Bra. Biol.**, v. 52, p. 169-180, 1992.

MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L.; MOURA, R. L. **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2003.

MORGAN, W. T.; MUSTER, P.; TATUM, F.; KAO, S. M.; ALAM, J.; SMITH, A. Identification of the histidine residues of hemopexin that coordinate with heme-iron and of a receptor-binding region. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 6256-6262, 1993.

MOYLE, P. B. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 3rd ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996.

NAGASHIMA, Y.; SENDO, A.; SHIMAKURA, K.; KOBAYASHI, T.; KIMURA; FUJII, T. Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes. **J. Fish Biol.**, v. 58, p. 1761-1765, 2001.

NAKANIWA, M.; HIRAYAMA, M.; SHIMIZU, A.; SASAKI, T.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; WATABE, S. Genomic sequences encoding two types of medaka hemopexin-like protein Wap65, and their gene expression profiles in embryos. **J. Exp. Biol.**, v. 208, p. 1915–1925, 2005.

NELSON, J. P.; LUCAS, G. L. Peripheral neuropathy caused by catfish pectoral spine. **South Med. J.**, v. 63, n. 8, p. 981-982, 1970.

NIKKILA, H.; GITLIN, J. D.; MULLER-EBERHARD, U. Rat hemopexin. Molecular cloning, primary structural characterization, and analysis of gene expression. **Biochemistry**, v. 30, p. 823–829, 1991.

NUIJEN, B.; BOUMA, M.; HENRAR, R.; MANADA, C.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derive depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. **Anticancer Drugs**, v. 10, p. 879-886, 1999.

OLIVEIRA, B. M.; RIVIER, J.; CRAIG C.; CECILIA, A. R.; CORPUZ, G. P.; ABOGADIE, F.; MENA E. E.; WOODWARD, S. R.; HILLYARD, D. R.; CRUZ, L. J. Diversity of *Conus* neuropeptides. **Science**, v. 249, p. 257-263, 1990.

OREN, Z.; SHAI, Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 303-310, 1996.

PEATMAN, E.; BAOPRASERTKUL, P.; TERHUNE, J.; XU, P.; NANDI, S.; KUCUKTAS, H.; LI, P.; WANG, S.; SOMRIDHIVEJ, B.; DUNHAM, R.; LIU, Z. J. Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 31, p. 1183–1196, 2007.

PEATMAN, E.; TERHUNE, J.; BAOPRASERTKUL, P.; XU, P.; NANDI, S.; WANG, S.; SOMRIDHIVEJ, B.; KUCUKTAS, H.; LI, P.; DUNHAM, R.; LIU, Z. J. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 553–566, 2008.

PERRIERE, C.; GOUDEY-PERRIERE, F.; PETEK, F. Purification of a lethal fraction from the venom of the weever fish *Trachinus vipera*. **Toxicon**, v. 26, p. 1222-1227, 1988.

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

PUTSEP, K.; BRANDEN, C. I.; BOMAN, H. G.; NORMARK, S. Antibacterial peptide from *H. pylori*. **Nature**, v. 398, p. 671-672, 1999.

REIS, E. G. A pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Documentos Técnicos**, v. 5, p. 1-22, 1986.

REYNA-KURTZ, M. J. Hábitos alimentares de *Cathorops spixii* (Ariidae – Siluriformes) na região de Ubatuba, SP (Brasil). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 15., 2003, São Paulo. **Abstracts...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 2003.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Med. Res. Rev.**, v. 20, p. 1-27, 2000.

SARMAŞIK, A. Antimicrobial peptides: a potential therapeutic alternative for the treatment of fish diseases. **Turk. J. Biol.**, v. 26, p. 201-207, 2002.

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2nd ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

SHA, Z.; XU, P.; TAKANO, T.; LIU, H.; TERHUNE, J.; LIU, Z. The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 5, p. 1458-1469, 2008.

SHEPHARD, K. L. Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 11, p. 403-417, 1993.

SHIGEMATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D. C.; KORTHUIS, R. J. Bradykinin prevents postischemic leukocyte adhesion and emigration and attenuates microvascular barrier disruption. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 1Pt2, p. H161-H171, 1999.

SHIMIZU, Y.; NEWMAN, W.; GOPAL, T. V.; HORGAN, K. J.; GRABER, N.; BEALL, L. D.; VAN SEVENTER, G. A.; SHAW, S. Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. **J. Cell Biol.**, v. 113, n. 5, p. 1203-1212, 1991.

SILVA, J. P. **Aspectos da biologia reprodutiva de *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829) das ilhas Pai Matos (25' graus 'n - 47' graus 'w) - região estuarino-lagunar de Cananéia.** 90 p. Master Thesis (Mestrado em Oceanografia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SILVA, J. P.; PAIVA-FILHO, A. M.; REIS, N. S. Caracterização macro e microscópica dos ovários do bagre amarelo, *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 46, p. 171-185, 1998.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

SUTHERLAND, S. **Australian Animal Toxins.** Melbourne, New York: Oxford University Press, 1983.

THOMSON, M.; AL-HASSAN, J. M.; FAYAD, S.; AL-SALEH, J.; ALI, M. Purification of a toxic factor from Arabian Gulf catfish epidermal secretions. **Toxicon**, v. 36, p. 859-866, 1998.

THULESIUS, O.; AL-HASSAN, J. M.; CRIDDLE, R. S.; THOMSON, M. Vascular responses elicited by venom of the Arabian catfish (*Arius thalassinus*). **Gen. Pharmacol.**, v. 14, p. 129-132, 1983.

TOLOSANO, E.; ALTRUDA, F. Hemopexin: structure, function, and regulation. **DNA Cell Biol.**, v. 21, n. 4, p. 297-306, 2002.

ULVATNE, H.; VORLAND, L. H. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 507-511, 2001.

VAN KESTEREN, C.; TWELVES, C.; BOWMAN, A.; HOEKMAN, K.; LOPEZ-JAZARO JIMENO, J.; GUZMÁN, C.; MATHOT, R. A.; SIMPSON, A.; VERMORKEN J. B.; SMYTL, J.; SCHELLENS, J. H.; HILLEBRAND, M. J.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacology of the novel marine-derived anticancer agent ecteinascidin 743 administered as a 1- and 3-h infusion in a phase I study. **Anticancer Drugs**, v. 13, p. 381-393, 2002.

WATABE, S.; KIKUCHI, K.; AIDA, K. Cold- and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic protein in goldfish and carp. **Nippon Suisan Gakkai**, v. 59, p. 151-156, 1993.

YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998.

ZWEIFACH, B. W. Perspectives in microcirculation. In: KALEY, G.; ALTURA, B. M. (Ed.). **Microcirculation**. Baltimore: University park Press, 1977.