

Marcos Emerson Pinheiro Junqueira

**Resposta Imune induzida pelas Peçonhas do
Bagre *Cathorops agassizii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para Obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes

**Botucatu – SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Junqueira, Marcos Emerson Pinheiro.

Resposta imune induzida pelas peçonhas do bagre *Cathorops agassilii* /
Marcos Emerson Pinheiro Junqueira. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
de Botucatu, 2006

Orientador: Carlos Alberto de Magalhães Lopes

Assunto CAPES: 40101037

1. Resposta imune - Estudos experimentais 2. Imunologia

CDD 574.29

Palavras-chave: Bagre; Ferrão; Imunologia; Muco; Peçonha



BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022-3882-5455

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

DESCRIÇÃO DA ESPECIALIDADE/ÁREA DE CONHECIMENTO E LINHA DE PESQUISA DOS MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DO(A) ALUNO(A) MARCOS EMERSON PINHEIRO JUNQUEIRA

Titular 01 (Orientador): <ul style="list-style-type: none">✓ Prof. Titular Carlos Alberto de Magalhães Lopes
Titular 02 <ul style="list-style-type: none">✓ Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira✓ Área de Conhecimento: Ciências Biológicas✓ Especialidade: Imunologia✓ Linha(s) de Pesquisa(s) em que atua: Imunogenética
Titular 03: <ul style="list-style-type: none">✓ Prof. Dr. Vidal Haddad Junior✓ Área de Conhecimento: Medicina✓ Especialidade: Dermatologia✓ Linha(s) de Pesquisa(s) em que atua: Imunopatologia
Titular 04: <ul style="list-style-type: none">✓ Profa. Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira✓ Área de Conhecimento: Ciências Biológicas✓ Especialidade: Imunologia✓ Linha(s) de Pesquisa(s) em que atua: Imunologia Aplicada
Titular 05: <ul style="list-style-type: none">✓ Prof. Dr. Itamar Alves Martins✓ Área de Conhecimento: Ciências Biológicas✓ Especialidade: Zoologia✓ Linha(s) de Pesquisa(s) em que atua: Zoologia de Peixes

"E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo ir buscá-las,
na verdade, eu decidi triunfar...

Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.

Decidi ver em cada deserto a possibilidade de encontrar um oásis.

Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.

Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia descobri que meu único rival não era somente as minhas limitações e que enfrentá-las era a única forma de superá-las.

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos do passado e passei a ser a minha própria e tênue luz deste presente.

Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez, nunca seria.

Naquele dia, deixei de me importar com quem ganha ou perde, hoje só me importa saber melhor o que devo fazer.

Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.

Aprendi que o melhor triunfo que posso ter é ter o direito de chamar alguém de
Amigo.

Aprendi que de nada serve ser luz se não se vai iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para se fazer realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar....

Agora simplesmente durmo para sonhar."

Walt Disney

...por que a vida e por que a consciência da vida? Se alguma inteligência externa ao Universo chegasse e, deparando-se com uma infinidade de imensas centelhas de gás em combustão e corpos sólidos e gasosos flutuando no aparente vazio, ouvisse, de outra e também estranha inteligência, a informação de que em certo tempo um daqueles corpos seria povoado de vida, naturalmente indagaria: para quê?

Karl Popper

Dedicatória

Ana Maria, Marília e Ana Paula

Eu sabia que tu existias...
Os astros mo diziam... eu sentia!
O vento segredou-me os murmúrios da tua alma...
Trouxe-me o perfume da tua essência florida de sonhos
belos.

Ah... como eles eram tão iguais aos meus!
Quando olhava a lua, ela sorria com o teu sorriso,
Ela murmurava-me os teus suspiros...

Observava as estrelas e via o teu brilho!
Ouvia-te na sinfonia das ondas
E a minha alma dançava a valsa do amor encantado.

Os meus olhos cantavam as mais belas baladas
Que só tu ouvias.

Sentia os teus braços envolverem-me
Com a maciez dos teus carinhos de seda.

Sentia a brisa de o teu mar tocar a minha face de veludo.
Ah como eu te procurei....

Neste infinito que nos sussurrava os nossos mistérios!
Agora entendi os enigmas do tempo!

Caminhei soberano dos meus desejos,
Dos meus anseios,
E vislumbrei o teu majestoso castelo!

Vi que me esperavas sentada no lugar onde ousavas sonhar
comigo...
Onde esperavas ver cumprida
A profecia do nosso destino.

Encontrei-te,
Reconheci-te,
Amar-te-ei até à eternidade!

Dedico Ainda:

**Aos meus queridos Pais, Mário e Cleusy e
Meus irmãos.**

**Volto a dizer-Tes: vocês não souberam
ensinar-me tudo, mas apenas ajudaram a
encontrar-me por mim mesmo. É por isso
que eu Os amo.**

**Meu eterno agradecimento.
MUITO OBRIGADO.**

Agradecimento Especial

Prof. Dr. Carlos Alberto de
Magalhães Lopes, mais que
Orientador, Amigo. Através
do exemplo, minha conduta
Científica se concretiza.
Não me esqueço, "Só os grandes
Corações sabem quanta glória
Há em ser bom"
Sófocles.

Agradecimento Especial

Dr^a Mônica Lopes-Ferreira

Dr^a Carla Lima

Quanta beleza há em dividir; vocês
não deram o peixe, ensinaram-me a
pescar. Deram o melhor de vocês, acreditando
formar novos pensadores para um mundo mais
justo. Espero não decepcioná-las. Como apreciador
do trabalho que desenvolvem, tenho esperança
de vê-las com mais sucesso ainda, só pra dizer a todos
que: UM DIA EU TRABALHEI NESTA EQUIPE.
De coração, MUITO OBRIGADO.

CUITELINHO

**Cheguei na beira do porto
Onde as onda se espaia
As garça dá meia volta
E senta na beira da praia
E o cuitelinho não gosta
Que o botão de rosa caia, ai, ai
Ai quando eu vim
da minha terra
Despedi da parentáia
Eu entrei no Mato Grosso
Dei em terras paraguaia
Lá tinha revolução
Enfrentei fortes batáia, ai, ai
A tua saudade corta
Como aço de naváia
O coração fica aflito
Bate uma, a outra faia
E os óio se enche d'água
Que até a vista se atrapáia, ai...**

Aos grandes Amigos(as) que fiz e que estiveram presentes neste Sonho, fica a minha Gratidão. Não posso nomeá-los. Se esquecer um só nome, deixo todos pra trás. Por isso, amigos do Instituto Butantan, do Instituto de Biociências, da Unesp de Botucatu e, qualquer um, que no momento que eu precisei estava ao meu lado auxiliando ou simplesmente sorrindo, fica perpetuado minha alegria e minha saudade.

A todos vocês AMIGOS
MUITO OBRIGADO!

TABELA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
CC	Quimiocina da subfamília que atua sobre monócitos
CD44	Molécula de adesão de células T
CK	Creatino-kinase
CXC	Quimiocina da subfamília que atua sobre neutrófilos
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
IFN-γ	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Isotipo de Imunoglobulina G
IgG2a	Isotipo de Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-13	Interleucina 13
KC	Interleucina 8 homólogo murino
LCT B4	Leucotrieno B4
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1alpha

Tabela de Abreviaturas

NK	Célula Natural Killer
PGD E2	Prostaglandina E2
TBX	Tromboxanas
TCR	Receptor de antígeno do Linfócito T
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - alfa

Tabela de Abreviaturas

IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
CXC	Quimiocina da subfamília que atua sobre neutrófilos
CC	Quimiocina da subfamília que atua sobre monócitos
IL-8	Interleucina 8
KC	Interleucina 8 homólogo murino
NK	Célula Natural Killer
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1alpha
CD44	Molécula de adesão de células T
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
APC	Células apresentadoras de antígeno
TCR	receptor de antígeno
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Isotipo de Imunoglobulina G
IgG2a	Isotipo de Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IFN-γ	Interferon
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

Tabela de Abreviaturas

IL-13	Interleucina 13
LCT B4	Leucotrieno B4
PGD E2	Prostaglandina
TBX	Tromboxanas
TCR	Receptor de antígeno do Linfócito T
CK	Creatino-kinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotografia mostrando a localização das peçonhas do Muco e do Ferrão do peixe bagre	Paginas 24
Figura 2- Eletroforese das peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C.agassizii</i>	26
Figura 3- Permeabilidade vascular induzida pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C.agassizii</i>	28
Figura 4- Edema induzido pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C.agassizii</i>	29
Figura 5- Fotografias mostrando "rolling" de leucócitos após a aplicação tópica das peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C.agassizii</i> no músculo cremaster de camundongos analisadas através de microscopia intravital	31
Figura 6- Ativação de leucócitos após a aplicação tópica das peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i> no músculo cremaster de camundongos analisada através de microscopia intravital	32
Figura 7- Fotografias mostrando a transmigração de leucócitos após a aplicação tópica das peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i> no músculo cremaster de camundongos analisadas através de microscopia intravital	34
Figura 8- Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 2 horas após a injeção das peçonhas de <i>C.agassizii</i>	35

Figura 9- Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 24 horas após a injeção das peçonhas de <i>C.agassizii</i>	36
Figura 10- Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 48 horas após a injeção das peçonhas de <i>C.agassizii</i>	37
Figura 11- Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 7 dias após a injeção das peçonhas de <i>C.agassizii</i>	38
Figura 12- Produção de leucócitos induzida pelas peçonhas (do Muco ou do Ferrão) de <i>C.agassizii</i>	40
Figura 13- Determinação dos níveis da citocina IL-6 induzida pelas peçonhas de <i>C.agassizii</i>	42
Figura 14- Determinação dos níveis de quimiocina KC induzida pelas peçonhas de <i>C.agassizii</i>	43
Figura 15- Determinação dos níveis de quimiocina MCP-1 induzida pelas peçonhas de <i>C.agassizii</i>	44
Figura 16- Produção de anticorpos IgM e IgG anti-peçonha do Muco	46
Figura 17- Produção de anticorpos IgM e IgG anti-peçonha do Ferrão	47
Figura 18- Produção de anticorpos anti-IgG1 e IgG2a	48
Figura 19- Eletroforese e "Immunoblotting" da peçonha do Muco e do Ferrão de <i>C.agassizii</i>	51

- Figura 20-** Eletroforese e “Immunoblotting” de diferentes peçonhas de peixes revelados com os soros anti-peçonhas do Muco ou do Ferrão de *C.agassizii* 53

TABELAS

- Tabela 1-** Reatividade antigênica cruzada entre os anticorpos presentes nos soros produzidos em resposta a imunização com as peçonhas do Muco e do Ferrão de *C.agassizii* 50
- Tabela 2-** Reatividade antigênica cruzada entre os anticorpos presentes nos soros produzidos em resposta a imunização com as peçonhas do Muco e do Ferrão de *C.agassizii* e as peçonhas de outros peixes peçonhentos 52

RESUMO

A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Constituem-se de uma rica fonte de agentes bioquímicos altamente ativos o que aumenta ainda mais a relevância das pesquisas nessa área. Nossos estudos objetivaram caracterizar as respostas imune inata e específica induzidas pelas peçonhas do muco e do ferrão do bagre *Cathorops agassizii*. A coleta dos espécimes foi realizada no complexo Baía-Estuário de Santos e São Vicente, localizado no litoral sul do Estado de São Paulo. As peçonhas (do Muco e do Ferrão) apresentaram perfil eletroforético similar entre si. Induzida a inflamação aguda em um modelo experimental murino, as peçonhas apresentaram igualmente a capacidade de induzir aumento da permeabilidade vascular e também edema de pata. A detecção de Leucotrieno B4 e Prostaglandina E2 no lavado da cavidade peritoneal dos camundongos injetados, com ambas as peçonhas, corroboram esta hipótese. Nossos resultados através da microscopia intravital mostraram que as peçonhas induzem um grande número de leucócitos rolantes nas vênulas pós-capilares com focos de extravasamento leucocitário, principalmente de neutrófilos seguido pelo influxo de macrófagos. Além disso, a peçonha do Ferrão induziu uma resolução mais rápida do influxo leucocitário ao contrário da peçonha do Muco que manteve o infiltrado macrofágico por até 7 dias. De maneira interessante, somente a citocina IL-6 foi detectada no lavado peritoneal induzida principalmente pela peçonha do Muco e as quimiocinas KC e MCP-1,

por ambas as peçonhas, expressando naquele momento, a participação destes mediadores no recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio da lesão. As peçonhas foram eficazes ao induzir uma produção primária e secundária de anticorpos das classes IgM e IgG anti-venenos. Observamos ainda, uma especificidade dos anticorpos produzidos para os componentes das próprias peçonhas e também uma reatividade antigênica cruzada entre elas.

PALAVRA-CHAVE: Bagre, imunologia, peçonha, ferrão, Muco.

SUMMARY

The production of toxins by aquatic animals is an important strategy that guarantees its survival in a competitive ecosystem. They constitute a rich source of highly active biochemical agents which increases the relevance of researches in the area. Our studies aimed to characterize the innate and specific immune responses induced by poisons of the mucus and sting of the catfish *Cathorops agassizii*. The collection of specimens was accomplished in the complex Bay-Estuary System of Santos and Sao Vicente located in the south coast of the São Paulo State. Poisons of the Mucus and Sting presented similarities in their electrophoretical profiles. In basis of an Induced process of inflammation throughout an experimental murine model, both poisons equally showed the capacity to increase the vascular permeability and also paw edema. The Leucotrien B₄'S and Prostaglandine E₂ detection in washings of mice peritoneal cavity injected with both poisons corroborates this hypothesis. Our results through an intravital microscopy procedure also showed that the poisons induced a great number of rolling leukocytes in the post-capillary venules with focus on the leukocyte overflow mainly neutrophiles followed by macrophage influx. Besides, the sting poison Sting induced a faster resolution of the leukocyte influx, as well as, the Mucus poison unlike maintained a macrophage infiltrated for up to 7 days. In an interesting way, only the cytokine IL-6 was detected in peritoneal washings induced mainly by the Mucus poison although Quimiokinins KC and MCP-1 were for both poisons, expressing on that moment the participation of these mediators in the neutrophile and macrophage recruitment for the lesion site. The poisons were also effective in the induction of a primary and secondary production of IgM and IgG classes of antibodies. In this research we still observed a specificity of the antibodies produced for the components of the own poisons and also a crossed antigenic reactivity among them.

KEY WORD: Catfish, sting poison, mucus poison, immune response.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. Objetivos e Objetivos específicos	12
3. Material e Métodos	13
3.1. Animais	13
3.2. Coleta dos peixes para obtenção das peçonhas	13
3.3. Determinação da concentração protéica das peçonhas	14
3.4. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)	14
3.5. Avaliação da permeabilidade vascular	14
3.6. Avaliação da atividade edematogênica	15
3.7. Avaliação do rolamento leucócitos através da microscopia Intravital	16
3.8. Avaliação da migração celular	17
3.9. Dosagem dos níveis de mediadores lipídicos	18
3.10. Detecção de citocinas e quimiocinas	18
3.11. Protocolo de imunização dos animais com as peçonhas do muco e do ferrão de <i>Cathorops agassizii</i>	19
3.12. Determinação dos níveis dos anticorpos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a anti-peçonhas	20
3.13. Avaliação da reatividade antigênica cruzada	21
3.14. Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1. Obtenção das peçonhas de <i>C. agassizii</i>	23
4.2. Caracterização bioquímica das peçonhas do Muco e do Ferrão do bagre <i>C. agassizii</i>	25
4.3. Indução do aumento da permeabilidade vascular e do Edema pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	27

4.4.	Avaliação do rolamento e extravasamento de leucócitos Induzido pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	30
4.5.	Cinética da migração celular induzida pelas peçonhas Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	33
4.6.	Mediadores lipídicos induzidos pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	40
4.7.	Citocinas inflamatórias e quimiocinas induzidas pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	42
4.8.	Produção de anticorpos anti-peçonhas do Muco e do Ferrão de <i>C. agassizii</i>	46
4.9.	Verificação da reatividade antigênica cruzada entre peçonhas de peixes peçonhentos	50
5.	Discussão	54
6.	Conclusões	62
7.	Referências Bibliográficas	63

1. Introdução

Em todos os níveis da escala filogenética, os seres vivos apresentam comportamentos de ataque e defesa que incluem a produção de substâncias repelentes, paralisantes ou com outras ações biológicas. Estas substâncias na maioria das vezes apresentam uma grande variedade de toxinas que são responsáveis pela sintomatologia observada nos envenenamentos e pelas complexas relações ecológicas existentes entre os organismos.

Historicamente, o estudo de venenos de animais vem sendo realizado no sentido de compreender suas ações deletérias em humanos possibilitando o desenvolvimento de tratamentos para os envenenamentos que provocam. Recentemente, estudos têm demonstrado nesses venenos a presença de substâncias com potencial terapêutico ou ferramentas bioquímicas e/ou farmacológicas. Embora o estudo de venenos animais esteja voltado, principalmente, para o de animais terrestres (cobras, aranhas e escorpiões), nos últimos anos, venenos de animais aquáticos passaram a ser estudados.

Os animais aquáticos capazes de provocar acidentes em seres humanos, reunidos em função e gravidade dos acidentes, são poríferos, cnidários, vermes, moluscos, equinodermos, crustáceos e peixes ⁽¹⁾.

A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Assim, para se defender ou defender seu território, estes 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 com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelos venenos de animais terrestres ⁽²⁾. Constituem também uma rica fonte de agentes bioquímicos altamente ativos o que aumenta ainda mais a relevância das pesquisas nessa área. Dessa maneira, trabalhos realizados com toxinas oriundas de animais aquáticos ficaram demonstrados que elas representam uma vasta fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾.

O Brasil apresenta uma extensa linha costeira (aproximadamente 7.400 Km) com ampla variação da fauna, compreendendo animais de águas temperadas e tropicais. Essa diversidade propicia a existência de um grande número de animais potencialmente perigosos quando associados aos fatores como, o grande afluxo de banhistas às praias, ao incremento à pesca comercial e esportiva, além de outras atividades, como mergulho autônomo e pesca submarina, o que favorece a ocorrência de muitos acidentes em humanos, sendo grande parte destes, provocados por peixes peçonhentos.

Peixes constituem quase a metade do número de vertebrados da Terra⁽⁸⁾, sendo aproximadamente 22.000 espécies. Destas, mais de 200 são espécies de peixes marinhos peçonhentos ⁽⁹⁾.

Os peixes venenosos possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos ou obtém suas toxinas por meio da cadeia trófica, alimentando-se de organismos venenosos primários como fitoplânctons ⁽¹⁰⁾.

Ao serem ingeridos, por possuírem toxinas na pele, músculos, vísceras e gônadas (como nos acidentes causados por peixes da família *Tetrodontidae*, popularmente conhecido por Baiacu) esses peixes tornam-se venenosos para quem se alimenta deles.

Os peixes peçonhentos apresentam glândulas especializadas em produzir substâncias tóxicas e um aparelho para inocular esta peçonha, que pode ser traumático, nos casos dos ferimentos causados por acúleos, rostros, dentes e esporões ⁽¹¹⁾. Alguns são considerados animais passivos, quando a peçonha é utilizada para autodefesa, nestes animais o aparelho inoculador pode apresentar-se incompleto ou ausente.

Normalmente, a secreção cutânea da mucosa dos peixes, serve como lubrificante na locomoção e desempenha importante papel na formação de cardumes, reconhecimento de indivíduos e até na migração de determinadas espécies ⁽¹²⁾. Além disso, secreções cutâneas com outras atividades biológicas já são conhecidas em famílias de peixes, tais como Ostracidae, Grammistidae, Soleidae e Siluridae, agindo como defesa química contra predadores ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾, porém, muitas espécies são capazes de secretar substâncias pela pele (ictiocrinotoxinas), que se acredita serem capazes de repelir ou incapacitar outros animais marinhos e até possuírem propriedades antibióticas ⁽¹⁵⁾.

Embora, apenas algumas espécies de peixes peçonhentos sejam capazes de causarem mortalidade no homem, muitas outras podem produzir envenenamentos severos, geralmente associados à dor considerável,

desproporcional ao tamanho da lesão. Haddad Jr ⁽¹⁾ relata que em alguns casos, podem ser observados outros sintomas como manifestações locais de eritema, edema e que em outros podem acometer todo o membro ferido. Nos casos graves segue-se linfangite, reação ganglionar, abscedação e necrose dos tecidos. O ferimento, muitas vezes demora a cicatrizar, pela ação do veneno e/ou agravado por infecção bacteriana secundária. Em casos raros, pode haver necessidade de amputações. Manifestações sistêmicas podem ocorrer como fraqueza, sudorese, náuseas, vômitos, vertigens, hipotensão arterial, choque e até óbito.

Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil ⁽¹⁶⁾. Estes possuem importância médica, pelos acidentes que provocam em humanos, uma vez que são incapacitantes e mantêm a vítima afastada do trabalho por semanas ou meses, além de acarretarem importantes seqüelas, pela ausência de uma terapia cientificamente comprovada. Haddad Jr. ⁽¹⁾, relata que os animais que mais causam acidentes são popularmente conhecidos como: arraias, peixes escorpião, niquins e bagres.

As arraias pertencem à ordem Rajiforme, sendo encontradas em águas doces, marinhas ou salobras. Têm o hábito bentônico (habitam o fundo) e quando em repouso ficam enterradas. Possuem um apêndice caudal semelhante a um chicote no qual estão localizados de um a três ou até mais ferrões. A peçonha está presente no epitélio glandular da bainha tegumentar que recobre o ferrão. Acarretam acidentes caracterizados por dor local,

eritema, edema com posterior aparecimento de necrose, náuseas, hipertensão arterial, sudorese, paralisia muscular. Haddad Jr e colaboradores⁽¹⁷⁾ descreveram que o veneno da arraia fluvial *Potamotrygon falkneri* apresenta um perfil eletroforético com bandas proteínas entre 12 e 130 kDa, sendo que as atividades gelatinolítica, caseinolítica e hialuronidásica são detectadas em componentes com 80, 100 e 84 kDa, respectivamente. Os autores atribuíram a presença destas enzimas aos sintomas clínicos descritos no envenenamento. Estudo recente realizado por Magalhães e colaboradores⁽¹⁸⁾ demonstrou características bioquímicas e biológicas semelhantes entre as peçonhas das arraias *Potamotrygon cf scobina* e *Potamotrygon gr orbygnyi*. Estas peçonhas induziram edema e nocicepção significativos em camundongos. Apresentaram ainda, termolabilidade e aumento do recrutamento de leucócitos em vênula pós-capilares. Além disso, induziram necrose, não provocaram hemorragia e apresentaram baixa atividade proteolítica.

Os peixes-escorpião, pertencentes à família Scorpaenidae, são freqüentemente encontrados na costa brasileira, entre rochas e baixas profundidades. As espécies mais encontradas são o *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião preto) e o *Scorpaena brasiliensis* (peixe-escorpião vermelho). Os raios são distribuídos ao longo da nadadeira dorsal, na qual estão localizadas pequenas glândulas produtoras de veneno. O quadro clínico do envenenamento é caracterizado por dor intensa, edema, necrose local e alterações sistêmicas que incluem dificuldades respiratórias, hipotensão,

arritmia, bradicardia, febre e em casos mais graves paralisias e convulsões⁽¹⁶⁾. Carrijo e colaboradores⁽¹⁹⁾ demonstraram que o veneno de *S. plumieri*, quando injetado por via intraperitoneal, induz sintomas sistêmicos como paralisia, convulsões e respiração acelerada. A análise da peçonha por eletroforese mostrou proteínas de 15 a 30 kDa com presença de atividade gelatinolítica. Boletini-Santos e colaboradores⁽²⁰⁾ mostram pela primeira vez que a peçonha de *S. plumieri* é capaz de induzir dano pulmonar agudo caracterizado por extravasamento protéico do espaço vascular para o alveolar acompanhado pela infiltração de macrófagos, secreção de citocinas inflamatórias, além da indução de proteinases no pulmão com atividade gelatinolítica.

Os niquins pertencem à ordem Batrachoidiformes e família Batrachoididae e no Brasil a espécie mais encontrada é o *Thalassophryne nattereri*. Habitam águas marinhas e fluviais, vivem entre rochedos ou plantas. Possuem o mais completo aparelho inoculador de peçonha, formado por quatro ferrões canaliculados, estando dois localizados no dorso e dois laterais, cada um dos quais localizados acima das nadadeiras peitorais, todos em comunicação direta com as glândulas veneníferas. Os ferrões canaliculados funcionam como uma agulha injetando o veneno no tecido do agressor ou da vítima humana^{(21) (22)}.

O envenenamento causado pelo *T. nattereri* acarreta importantes sintomas clínicos locais, caracterizados principalmente por dor, edema e necrose de difícil cicatrização. Os acidentes ocorrem freqüentemente na

região Norte e Nordeste do país ^{(23) (24) (25) (26) (16)}. As vítimas, na maioria das vezes, são pescadores que se acidentam quando os peixes se encontram presos às redes de pesca, redes de currais ou quando na coleta de mariscos.

Experimentalmente, foi verificado que baixas concentrações da peçonha, induzem reação inflamatória local, com dor e edema, semelhante à descrita em humanos ^{(27) (28)}, independente da presença das atividades hemorrágica e fosfolipásica A₂ na peçonha ⁽²⁹⁾. A análise histopatológica da lesão tecidual, provocada pela peçonha, detectou a presença de edema, mionecrose, hiperemia e/ou congestão nas veias e vênulas, presença de trombos, pouco infiltrado celular e um comprometimento de regeneração tecidual até 28 dias. O nível de creatino-kinase (CK) no plasma se mostra aumentado nas primeiras horas após o envenenamento, enquanto a massa muscular total e a quantidade de CK no músculo gastrocnêmio se mostraram drasticamente reduzidas. O exame ultra-estrutural mostrou rompimento da membrana plasmática, edema mitocondrial e proeminente desorganização miofibrilar, inclusive com desaparecimento da linha Z ⁽³⁰⁾.

Por microscopia intravital, podemos observar que a peçonha provoca uma intensa coagulação intravascular, com estase do fluxo sanguíneo nas vênulas pós-capilares e em capilares ⁽³¹⁾. Além disso, foi constatado que após a injeção do veneno no coxim plantar de camundongos, houve a liberação de importantes citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, acompanhadas por uma resposta inflamatória celular inadequada⁽³²⁾. De maneira interessante, Lopes-Ferreira e colaboradores ⁽³³⁾ demonstraram que somente

inibidores de calicreína tecidual e plasmática reduzem a nocicepção e edema induzidos pelo veneno. A participação do sistema calicreína-cininogênio-cinina foi confirmada uma vez que a peçonha promoveu a clivagem de substratos sintéticos derivados do cininogênio humano liberando calidina (Lys-BK), apresentando, portanto, uma atividade cininogenásica. Paralelamente, trabalhos realizados demonstraram a importância dos anticorpos anti-peçonha de *T. nattereri* produzidos em coelhos ou eqüinos na neutralização de importantes atividades tóxicas desta peçonha ⁽²⁵⁾ ⁽³⁴⁾.

Recentemente Magalhães e colaboradores ⁽¹⁸⁾ identificaram grupos de toxinas no veneno de *T. nattereri*: a família Natterinas, constituída por 5 toxinas, as Natterinas 1, 2, 3, 4 e P, que apresentam homologia entre si, mas não com proteínas existentes em banco de dados e a Nattectina, apresentando homologia com lectinas tipo C. As Natterinas possuem atividade cininogenásica e a estrutura primária dessas proteínas foi obtida através da técnica do transcriptoma, usando uma biblioteca de cDNA construída com a glândula da peçonha de *T. nattereri* associada a química de proteínas. Além disso, foi demonstrado que esta toxina é responsável pela nocicepção e o edema induzidos pela peçonha.

Os bagres marinhos pertencem à família Ariidae, são peixes de couro e vivem em locais rasos e de fundo lodoso. Dos peixes peçonhentos do Brasil são os que provocam o maior número de acidentes, já que estão distribuídos por toda a costa brasileira e por serem abundantes nas regiões Sudeste e Sul ⁽¹⁾ ⁽³⁵⁾. São encontrados em ecossistemas marinhos, de águas salobras e

água doce. Em geral, procuram à desembocadura dos rios e regiões lagunares na época de desova. Apresentam longos e robustos ferrões serrilhados à frente da porção de raios moles, expressando um ferrão na nadadeira dorsal e um ferrão em cada nadadeira peitoral. Estes aparatos peçonhentos constituem-se de estruturas ósseas bastante rígidas, envoltas por uma membrana tegumentar e por um muco produzido por células glandulares dessa membrana ⁽³⁶⁾.

O aparato peçonhento do bagre inclui um único ferrão serrilhado na porção distal de cada nadadeira apresentando três diferentes peçonhas. A **peçonha do ferrão** é encontrada no epitélio glandular que o reveste; a **peçonha glandular** encontrada nas glândulas localizadas na base dos espinhos laterais e a **peçonha do muco** (ictiocrinotoxina) que consiste de um material protéico e gelatinoso produzido por células elaboradoras de proteínas denominadas "células-club" ⁽³⁷⁾.

A importância do seu conteúdo citoplasmático não está bem definida, embora algumas funções de proteção para o peixe tenham sido sugeridas, como a existência de feromônios específicos que atuam como substâncias de alarme, quando são ameaçados ou feridos. Quando o bagre *Arius thalassinus* se sente ameaçado, esta secreção apresenta fosfolipídeos, lipídeos neutros e glicolipídeos. Como esta secreção é composta principalmente de glicoproteínas, acredita-se que seja elaborada para defesa, não contra predadores, mas contra lesões ⁽³⁸⁾.

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 prostanóides ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾. Também foi comprovado que estas secreções são compostas por fatores vasoativadores ⁽³⁷⁾; fator hemolítico ⁽³⁸⁾; hemaglutinante ⁽⁴¹⁾ ⁽³⁸⁾ e um ativador de fosfolipase A ⁽³⁹⁾. Segundo Kizer ⁽⁴²⁾, esta peçonha contém ainda, fatores vasoconstritores e necrosantes. Thulesius e cols. ⁽³⁷⁾ analisando a secreção da pele de *A. thalassinus* encontrou altas concentrações de proteínas, limitada quantidade de lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, com atividades enzimáticas, incluindo fosfatase alcalina e esterases.

A peçonha do muco apresenta ainda, isoprostanos, substância que contribui para o fechamento e aceleração na cura de feridas em animais de laboratório ⁽⁴³⁾ e de úlceras diabéticas ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾. Fahim et al ⁽⁴⁶⁾, demonstram atividade anti-tumoral. A peçonha glandular apresenta enzimas líticas e diversos fatores com ação sobre o sangue, que assim como a peçonha do muco, possui atividades bioquímicas e farmacológicas que podem ser facilmente relacionadas com os efeitos fisiológicos observados no acidente. Essas enzimas incluem esterases, fosfatases, fatores hemolíticos que causam contração de músculo liso em artéria umbilical e induzem resposta depressora *in vivo* e fatores vasoconstritores. Ao contrário das outras duas, a peçonha da glândula parece ser termoestável ⁽³⁷⁾.

Comum entre as espécies de bagres, *Cathorops agassizii* é facilmente encontrado no litoral sudeste-sul do Estado de São Paulo, por conseguinte,

presume-se que causem grande parte dos acidentes relatados. Estes ocorrem principalmente quando pescadores manuseiam redes de pesca e quando banhistas pisam em um exemplar morto descartado na praia. Os acidentes provocados pelo bagre são caracterizados por ferimentos puntiformes ou lacerados, eritema, edema, dor, irradiação da dor para a raiz do membro, sudorese, mal-estar, febre, náusea, vômito, agitação psicomotora e infecção secundária ⁽¹⁾.

Considerando o número e o tipo de acidente provocado por bagres no Brasil, nenhum estudo de envenenamento experimental usando as peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*, em modelo animal, foi documentado. Nossos resultados poderão contribuir para o esclarecimento das propriedades biológicas das peçonhas deste bagre e também fornecer subsídios para o desenvolvimento de tratamentos específicos e adequados.

2. Objetivo

Caracterização das respostas imune inata e específica induzidas pelas peçonhas do muco e do ferrão do bagre *Cathorops agassizii*.

Objetivos Específicos

- a) Caracterização bioquímica das peçonhas através do perfil eletroforético;
- b) Determinação em camundongos da permeabilidade vascular e edema, induzidos pelas peçonhas;
- c) Avaliação do rolamento de leucócitos pelas peçonhas analisadas por microscopia intravital;
- d) Avaliação da migração celular induzida pelas peçonhas na cavidade peritoneal de camundongos;
- e) Verificação da presença de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) pelas peçonhas;
- f) Verificação da indução de quimiocinas (KC e MCP-1);
- g) Avaliação da produção de anticorpos anti-peçonhas das classes IgM e IgG e das subclasses IgG1 e IgG2a;
- h) Verificação da reatividade antigênica cruzada entre as peçonhas (do ferrão e do muco) e frente a peçonhas de outros peixes.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Aprovado pela CEEA, sob o Protocolo nº. 377, aos 07 de Abril de 2.004.

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 20 e 22 g, cedidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia com água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais foram mantidos em gaiolas com isolador nas condições de umidade, luminosidade e temperatura ideais.

3.2. Coleta dos peixes para obtenção das peçonhas

A coleta dos espécimes de *Cathorops agassizii* foi realizada no complexo Baía-Estuário de Santos e São Vicente localizado no litoral Sul do Estado de São Paulo. Foram realizadas saídas de barco com pescadores da região e a coleta foi feita de forma individual com caniço e anzol. A identificação das espécies foi realizada empregando-se chave de identificação publicada por Figueiredo *et alii* ⁽³⁶⁾. O material coletado foi submetido à refrigeração imediata em caixas térmicas com gelo, para o transporte até o Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan onde foi processado.

3.3. Determinação da concentração protéica das peçonhas

Após processamento das peçonhas a concentração protéica foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford ⁽⁴⁷⁾ usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST. Louis, MO, USA).

3.4. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

As proteínas presentes nas peçonhas (do muco e do ferrão) de *C. agassizii* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de SDS (SDS-PAGE), conforme Laemmli ⁽⁴⁸⁾. Alíquotas (30 µg de proteína) foram diluídas em 20 µL de tampão de amostra (Tris-HCL pH 6,8, SDS 10%, glicerol, EDTA e azul de bromofenol), aquecidos a 100 °C por 5 min e posteriormente, 15 µL da solução foram aplicados em gel de poliacrilamida (12%). Foi aplicada a voltagem de 180 V, corrente de 20 mA por 1 h e 30min para a separação das proteínas. A coloração foi feita com Comassie Blue. Como padrão de massa molecular foram utilizados Fosforilase B (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20,1 kDa) e Lactalbumina (14,4 kDa).

3.5. Avaliação da permeabilidade vascular

As alterações da permeabilidade vascular foram avaliadas através do extravasamento do corante azul de Evans (AE), na cavidade peritoneal dos camundongos ($n = 5$), 2 horas após a injeção intraperitoneal (i.p) de 12,5;

25; 50 ou 100 µg das peçonhas (do muco ou do ferrão) ou solução fisiológica apirogênica. Os animais receberam injeção intravenosa (i.v.), no plexo oftálmico, do corante azul de Evans (20 mg/Kg) 20 minutos antes de cada tempo de avaliação da permeabilidade vascular. Decorrido os intervalos de tempo determinados, os animais foram eutanasiados e exsangüinados, a cavidade peritoneal foi lavada com tampão fosfato salina (Phosphate Buffer Saline – PBS) pH 7.2 e o líquido de lavagem foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. A concentração de azul de Evans no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria a 620 nm ⁽⁴⁹⁾. Os resultados foram expressos em µg AE/mL e a concentração de AE foi estimada a partir de uma curva padrão de concentração conhecida. Os resultados foram expressos como a média de dois diferentes experimentos adicionada do desvio-padrão.

3.6. Avaliação da atividade edematogênica

Para avaliação da atividade edematogênica grupos de camundongos ($n = 5$) receberam injeção intradérmica no coxim plantar de uma das patas traseiras com diferentes doses das peçonhas (12.5; 25; 50 ou 100 µg de proteína em 30 µL de PBS estéril) e na pata oposta receberam apenas 30 µL de PBS estéril (controle). O edema foi avaliado utilizando-se um paquímetro (Mitutoyo) para a medida da espessura em milímetros. A diferença entre a medida do edema da pata experimental e a medida da pata controle foi realizada no período de 2 horas após a inoculação ⁽³²⁾. Os resultados foram

expressos como a média de dois diferentes experimentos adicionada do desvio-padrão.

3.7. Avaliação do rolamento leucócitos através da microscopia intravital

A técnica de microscopia intravital foi realizada como descrita por Lomonte e colaboradores ⁽⁵⁰⁾. Camundongos ($n = 3$ /por grupo) foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol, 50 mg/Kg) e mantidos sobre placa com temperatura controlada (37° C), em seguida sofreram manipulação cirúrgica na bolsa escrotal para exposição do músculo cremaster, que foi fixado ao redor de uma área transparente da placa. Esta foi posicionada sobre o *charriot* do microscópio óptico para possibilitar visualização *in vivo* da microcirculação local. As preparações foram mantidas úmidas e aquecidas por irrigação com PBS (0.15 M). Para as peçonhas do muco e do ferrão foram utilizadas doses de 25 µg de proteína contida em 20 µL que foi aplicado topicamente no músculo cremaster. Foi registrado o aspecto da vênula pós-capilar antes e após a aplicação das peçonhas. Os ensaios tiveram duração de 30 minutos e a cada 10 minutos foi registrado o rolamento dos leucócitos durante 1 minuto. Foram realizadas fotografias mostrando a transmigração dos leucócitos com a máquina TK-C600, JVC incorporada a um microscópio (Axioskope, Carl-Zeiss). As imagens da microcirculação foram transmitidas a um microprocessador para análises.

3.8. Avaliação da migração celular

Diferentes grupos de camundongos ($n= 6-8$) foram injetados via intraperitoneal com 100 μg das peçonhas do muco e do ferrão, diluídos em 0,5 mL de PBS estéril, enquanto o grupo-controle ($n = 5$) foi injetado apenas com 0,5 mL de PBS estéril. O recolhimento da suspensão celular da cavidade peritoneal ocorreu em diferentes tempos (2, 24, 48 horas e 7 dias) pós administração das amostras. Em cada período, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico, para contagem de células sendo, em seguida, eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital sódico. A cavidade peritoneal foi lavada com PBS + EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) por uma seringa inserida na região inguinal, massageando o abdômen do animal por cerca de 2 minutos. O líquido foi recolhido por uma seringa introduzida na região látero-lateral do abdômen, sendo a operação repetida 3 vezes. O material retirado foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi reservado para análises futuras e o botão celular foi ressuspenso em PBS + 0,1% BSA (*bovine serum albumin*). A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer e para a contagem diferencial, uma alíquota da suspensão celular foi colocada em lâmina e submetida à centrifugação em centrífuga CITOSPIN, coradas com Giemsa e examinadas ao microscópio óptico, contando num total de 300 células. Para obter o número absoluto de cada população celular no líquido da cavidade peritoneal, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células

encontradas no volume recolhido. Os resultados foram expressos como a média acrescida do erro-padrão por milímetro da suspensão celular.

3.9. Dosagem dos níveis de mediadores lipídicos

Para dosagem dos mediadores lipídicos leucotrieno B4 e prostaglandina E2 foram utilizados Kits de ELISA de competição (Cayman Chemical, USA) e as determinações seguiram as recomendações do fabricante.

3.10. Detecção de citocinas e quimiocinas

Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 100 μ L do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato pH 9,5 (IL-1 β , IL-6 e KC) ou tampão fosfato pH 6,5 (TNF- α e MCP-1), incubadas por 18 horas à 4°C e bloqueadas com 200 μ L/poço de PBS+5% gelatina, por 90 minutos. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST e, em seguida, adicionados 100 μ L/poço de PBST + 0,1% de BSA nas duas primeiras fileiras, onde foi diluído, na razão de 1:2, os padrões das citocinas e quimiocina recombinantes. Nas fileiras seguintes, as amostras foram distribuídas e diluídas. As placas foram, então, incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas com PBST e 100 μ L/poço do segundo anticorpo biotilado (IL-1 β , IL-6, TNF- α e KC) diluído em PBST + 0,1% BSA foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Para a quimiocina MCP-1, foram adicionados 100 μ L/poço do

segundo anticorpo marcado com peroxidase e depois de 1 h de incubação a placa foi revelada. Para as citocinas, mais 4 lavagens com PBST foram feitas e 100 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase diluído em PBST + 0,1% BSA foram adicionados às placas e incubadas por mais 1 hora. Novo ciclo de lavagens foi feito e a reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço de TMB/H₂O₂. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. A quantidade das diversas citocinas e das quimiocinas nas amostras foi calculada a partir das curvas-padrão obtidas com as proteínas recombinantes. O limite inferior de detecção dos métodos foi de 31,2 pg/mL para IL-1, MCP-1 e KC e 7,8 pg/mL para IL-6 e TNF- α .

3.11. Protocolo de imunização dos animais com as peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

Camundongos (n = 5) foram imunizados pela via intraperitoneal com as peçonhas de *C. agassizii* (100 µg adsorvido em 1,6 mg de Al(OH)₃) em um volume final de 500 µL por animal. Após 7 dias, os animais receberam dose reforço com a mesma quantidade de peçonha mais adjuvante. Animais imunizados somente com Al(OH)₃ foram considerados controle. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico nos dias 7, 14 e 21 após a primeira imunização, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos à 4°C e o plasma foi retirado e estocado na diluição 1/5 a 20° C.

3.12. Determinação dos níveis dos anticorpos IgM, IgG, IgG1 e IgG2a anti-peçonhas

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizados com 10 µg/mL das peçonhas (do muco e do ferrão) de *C. agassizii* diluídos em tampão carbonato pH 9.6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4° C em câmara úmida. Após este período foram submetidas a um ciclo de três lavagens com tampão de lavagem PBST (PBS contendo 0,05% de Tween 20). O bloqueio foi feito com 200 µL/poço de solução PBST contendo 3% de BSA por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após outro ciclo de lavagens, adicionou-se a cada poço 100 µL dos plasmas dos animais imunizados ou não com as peçonhas do muco e do ferrão em tampão de incubação (PBST contendo 0,1% BSA) realizando diluições seriadas, e foi feita uma nova incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após um novo ciclo de lavagens, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com os conjugados imunoenzimáticos (anti-IgM, anti-IgG, IgG1 e IgG2a marcados com peroxidase). Por fim, um novo ciclo de lavagem foi realizado e a reação foi revelada pela adição de 100 µL da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de OPD/mL em tampão citrato 0,2 M, pH 5,5 + H₂O₂ 0,06%, por poço) e interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 8N a cada poço. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da absorbância de cada poço a 492 nm em um leitor de placas (Titertek Multiskan Plus).

3.13. Avaliação da reatividade antigênica cruzada

A reatividade antigênica cruzada foi avaliada entre as peçonhas do muco e do ferrão do bagre *C. agassizii* e entre peçonhas de outros peixes peçonhentos (*Thalassophryne nattereri*, *Potamotrygon orbygnyi* e *Scorpaena plumieri*), as análises foram feitas através das metodologias de ELISA e Immunoblotting.

O teste de ELISA foi realizado como descrito anteriormente. As placas foram sensibilizadas com 10 µg das diferentes peçonhas: do muco e do ferrão do bagre *C. agassizii*, peçonha de *T. nattereri*, *P. orbygnyi* e *S. plumieri* diluídos em tampão carbonato pH 9.6. As amostras de plasmas utilizadas foram de camundongos imunizados com peçonha do muco e peçonha do ferrão na diluição de 1/1000. A intensidade da reação foi determinada por leitura da absorbância de cada poço a 492 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus).

Para verificação da reatividade antigênica por "immunoblotting", 30 µg das peçonhas do muco ou do ferrão de *C. agassizii*, *T. nattereri*, *P. orbygnyi* e *S. plumieri* foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE) e transferidos sob corrente constante de 380 mA durante 2 horas para uma membrana de nitrocelulose usando o sistema Trans Blot Pharmacia (Uppsala, Sweden), de acordo com a técnica descrita por Towbin e colaboradores ⁽⁵¹⁾. As proteínas presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidas à caracterização imunoenzimática. Para isso, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4 °C com solução bloqueadora (PBS contendo 3% de BSA). Após o bloqueio,

a membrana foi lavada com tampão de lavagem (Tris/NaCl pH 7,5) e incubada por 3 horas, à temperatura ambiente com os plasmas de animais imunizados com as peçonhas do muco e do ferrão ou plasmas de animais não-imunizados todos em tampão de incubação (PBST contendo 1% de BSA). Em seguida, foi realizado um novo ciclo de lavagens e a membrana foi incubada por 2 horas com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG marcado com peroxidase) na diluição 1/2000 em tampão de incubação. O excesso do conjugado, foi removido, por um novo ciclo de lavagens e os componentes antigênicos foi revelado pela adição do cromógeno 4-cloro-1 α -naftol 0,05% (p/v) em Metanol 15% (v/v) em presença de 0,03% de H₂O₂ (v/v). A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água corrente. Os padrões de massa molecular utilizados foram: lisozima 14,300, tripsinogênio 24,000, ovalbumina 46,900 e soro albumina bovina 68,000.

3.14. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após a análise de variância (One-Way ANOVA) seguida do teste não-paramétrico Mann-Whitney ou Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$, empregando-se o programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997).

4. Resultados

4.1. Obtenção das peçonhas de *C. agassizii*

Através de saídas de barcos de pescadores profissionais na Baía de Santos – São Vicente, a coleta dos espécimes estudados foi feita por meio de caniço, linha e anzol. As coletas ocorreram em diversas épocas do ano, totalizando cerca de 50 animais. Após a retirada da água, a secreção (peçonha do muco) da pele, foi obtida por meio de raspagem com lâmina de vidro, sendo em seguida, acondicionados em frascos para o transporte e os ferrões foram cortados com alicate corta-fio e em seguida acondicionados em gelo. Ambas as secreções (Figura 1) foram acondicionadas em gelo e transportadas em recipientes térmicos para o Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

A peçonha do muco foi diluída em solução salina estéril, homogeneizada e em seguida centrifugada para a retirada do sobrenadante. Para a extração da peçonha que reveste o ferrão (peçonha do ferrão), os ferrões foram macerados com solução salina estéril e em seguida centrifugados para retirada do sobrenadante. As concentrações de proteínas das peçonhas foram determinadas por método colorimétrico, obtendo concentrações média da peçonha do muco de 7.8 mg/mL e da peçonha do ferrão de 8.7 mg/mL. A partir desses dados utilizamos as peçonhas pela quantidade de proteínas que eles apresentaram.



Fotos ilustrativas

Foto: Flávia Borges Santos

Figura 1. Fotos mostrando onde se localizam as peçonhas do Muco e do Ferrão do Bagre. Após a retirada da água, a secreção (peçonha do Muco) da pele foi retirada por meio de raspagem em lâmina de vidro, sendo em seguida acondicionada em frasco para o transporte. O mesmo procedimento ocorreu com os ferrões (peçonha) que depois de retirados, foram acondicionados em frascos. Ambas as secreções foram refrigeradas em gelo.

4.2. Caracterização bioquímica das peçonhas do muco e do ferrão do bagre *C. agassizii*

As peçonhas do muco e do ferrão foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de resolução 12%, em seguida as proteínas das peçonhas foram coradas com Azul de Comassie.

Conforme pode ser verificado na Figura 2, o perfil eletroforético dessas peçonhas mostra componentes com massa molecular acima de 97 kDa, entre 97 e 66 kDa, entre 30 e 45 kDa e por volta de 14.4 kDa. Podemos observar na peçonha do ferrão a presença da banda por volta de 66 kDa com maior intensidade se comparada a banda encontrada na peçonha do muco e ao contrário, a banda com massa molecular em torno de 45 kDa mostrou-se mais evidente na peçonha do muco.

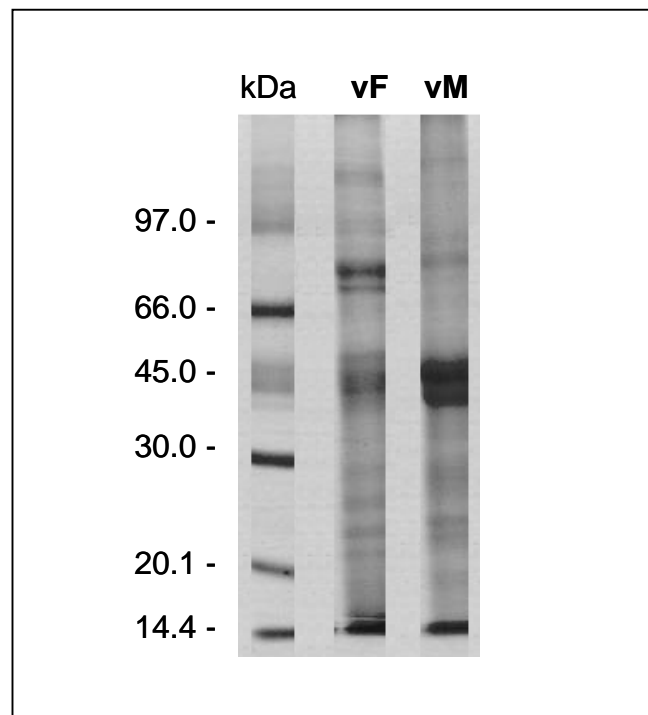


Figura 2 – Eletroforese das peçonhas do Muco e do Ferrão de *Cathrops agassizii*. As peçonhas (30 μ g) do muco (pm) e do ferrão (pf) foram fracionados no gel de poliacrilamida de resolução 12% (SDS-PAGE). O gel foi corado com Azul de Comassie e os números da esquerda indicam os marcadores de massa molecular. Os números a esquerda correspondem aos marcadores de massa molecular Foforilase B (97 kDA), Albumina (66 kDA), Ovalbumina (45 kDA), Anidrase carbônica (30 kDA), Inibidor de tripsina (20,1 kDA) e a Lactalbumina (14,4 kDA)

4.3. Indução do aumento da permeabilidade vascular e do edema pelas peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

Para avaliação da indução da permeabilidade vascular e do edema foram utilizadas as doses de 12,5; 25; 50 ou 100 µg das peçonhas (do muco ou do ferrão). A permeabilidade vascular foi avaliada através do extravasamento do corante azul de Evans na cavidade peritoneal dos camundongos e o edema através da injeção no coxim plantar das peçonhas e o edema avaliado como aumento de espessura da pata injetada.

Ambas as peçonhas do muco ou do ferrão induziram aumento da permeabilidade vascular e edema (Figuras 3 e 4). Com relação à permeabilidade vascular esta foi mais evidente nas maiores doses, como de 50 e 100 µg para ambas as peçonhas (Figura 3). Todas as doses analisadas de ambas as peçonhas induziram edema, sendo mais evidente a partir de 25 µg (Figura 4). Tanto para a permeabilidade vascular quanto para o edema não houve diferença significativa entre as peçonhas do muco e a peçonha do ferrão.

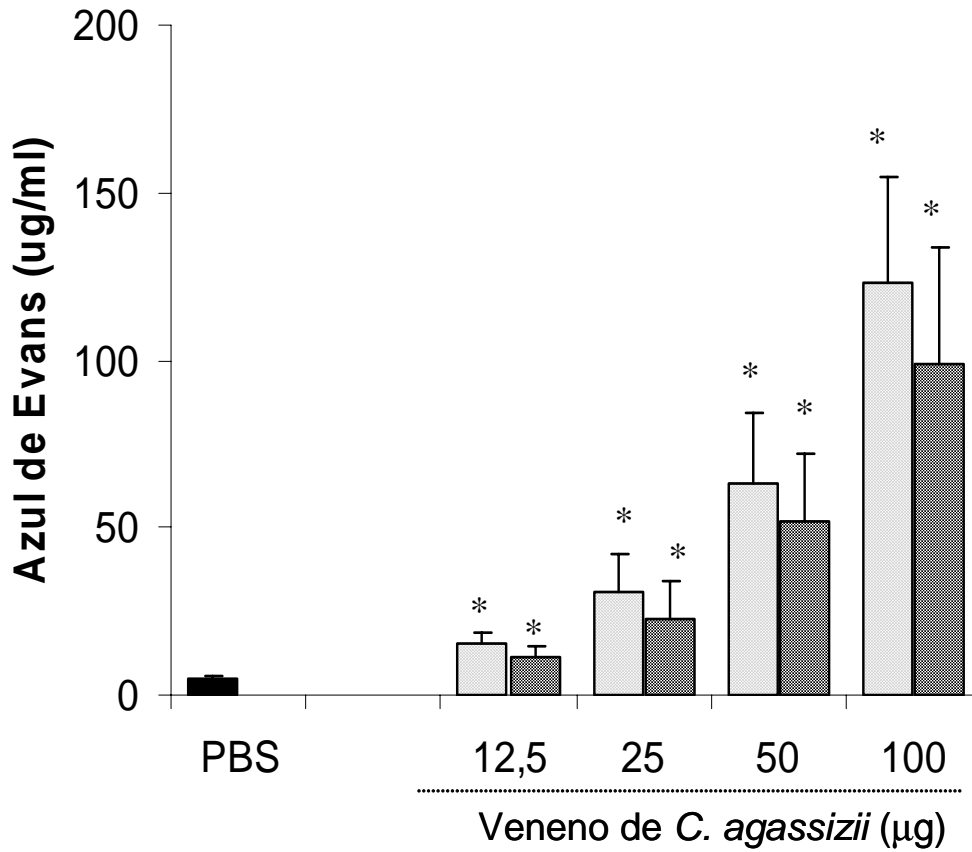


Figura 3. Permeabilidade vascular induzida pelas peçonhas do muco e do ferrão de *Cathrops agassizii*. As alterações da permeabilidade vascular foram avaliadas através do extravasamento do corante azul de Evans, na cavidade peritoneal de camundongos Swiss, 2 horas após a injeção intraperitoneal da peçonha do muco ou da peçonha do ferrão nas doses de 12.5; 25; 50 ou 100 μg diluídos em PBS estéril.

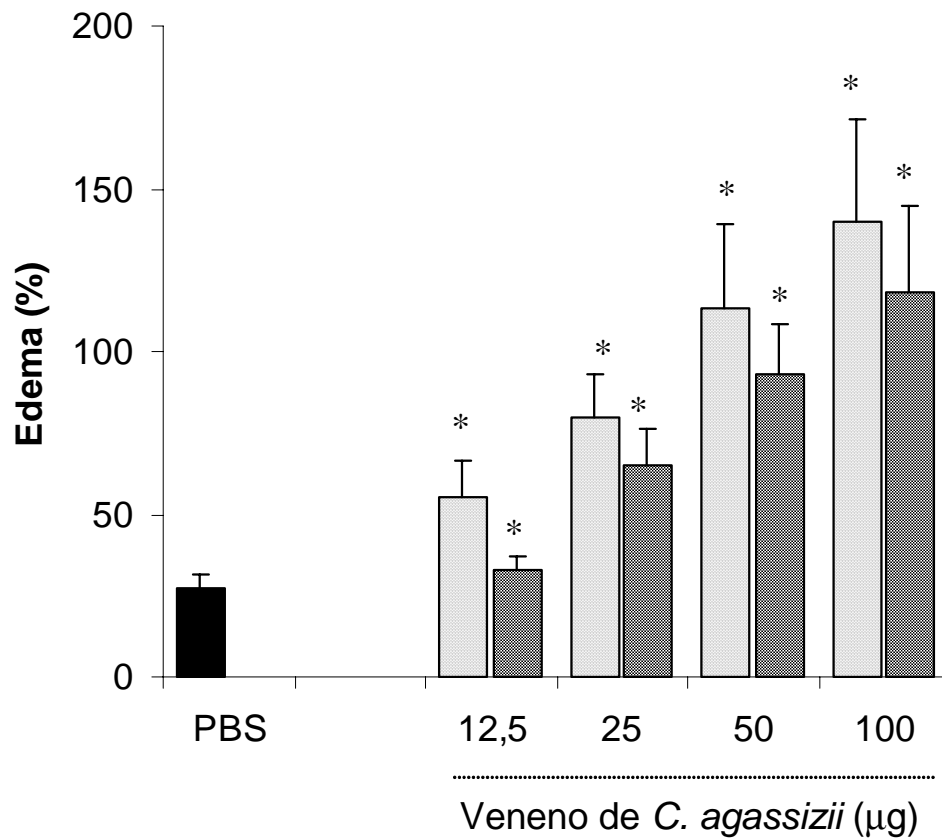


Figura 4. Edema induzido pelas peçonhas do Muco e do Ferrão de *Cathorops agassizii*. Camundongos Swiss foram injetados no coxim plantar com 12.5; 25, 50 ou 100 µg das peçonhas do muco ou do ferrão em 30 µL de PBS estéril. Após duas horas, o edema foi avaliado, medindo-se a espessura da para com um paquímetro. Animais injetados somente com PBS estéril foram considerados grupo-controle.

4.4. Avaliação do rolamento e extravasamento de leucócitos induzido pelas peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

A verificação do rolamento de leucócitos pelas peçonhas do bagre *C. agassizii* foi realizada através da técnica de microscopia intravital. Para tanto 25 µg de cada peçonha (do muco ou do ferrão) foram aplicados topicamente no músculo cremaster de camundongos e o rolamento e o extravasamento de leucócitos verificado.

Como podemos verificar na Figura 5, ambas as peçonhas induziram um aumento no número de leucócitos rolantes nas vênulas pós-capilares (Figura 6) e um grande número de leucócitos extravasados para o espaço intersticial (Figura 7).

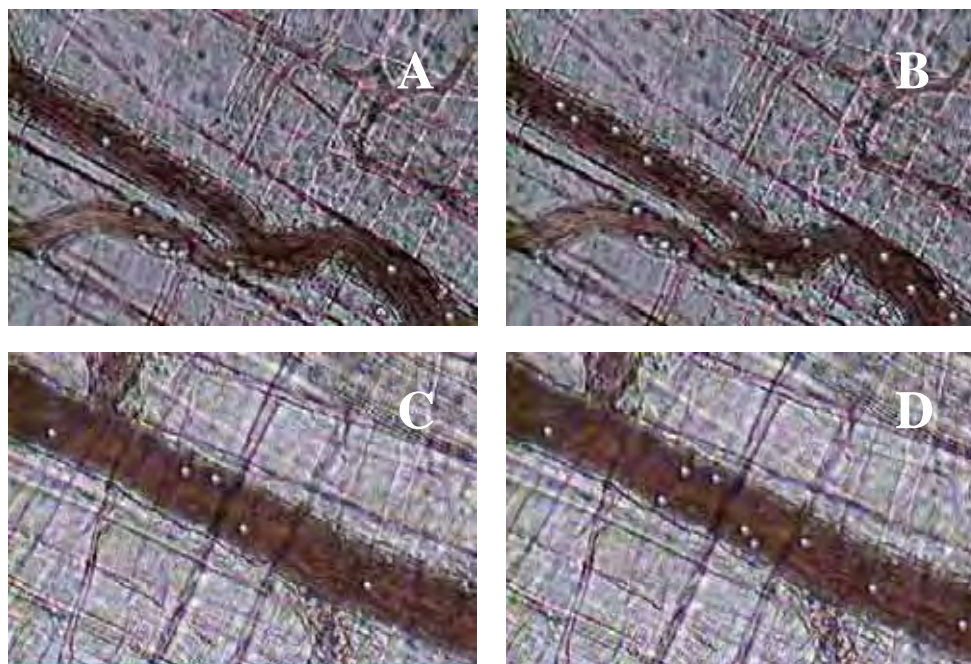


Figura 5. Fotografias mostrando “rolling” de leucócitos após a aplicação tópica da peçonha do muco ou peçonha do ferrão de *Cathorops agassizii* no músculo cremaster de camundongos analisadas através de microscopia intravital. O músculo cremaster de camundongos Swiss foi exposto e aplicado sobre ele 25 μ g das peçonhas do muco ou do ferrão em 20 μ l de PBS estéril. As fotografias das vênulas foram realizadas 30 minutos após a aplicação dos venenos. (A) Vênula pós-capilar normal, (B) Vênula pós-capilar após a aplicação da peçonha do muco, (C) Vênula pós-capilar normal e (D) Vênula pós-capilar após a aplicação da peçonha do ferrão.

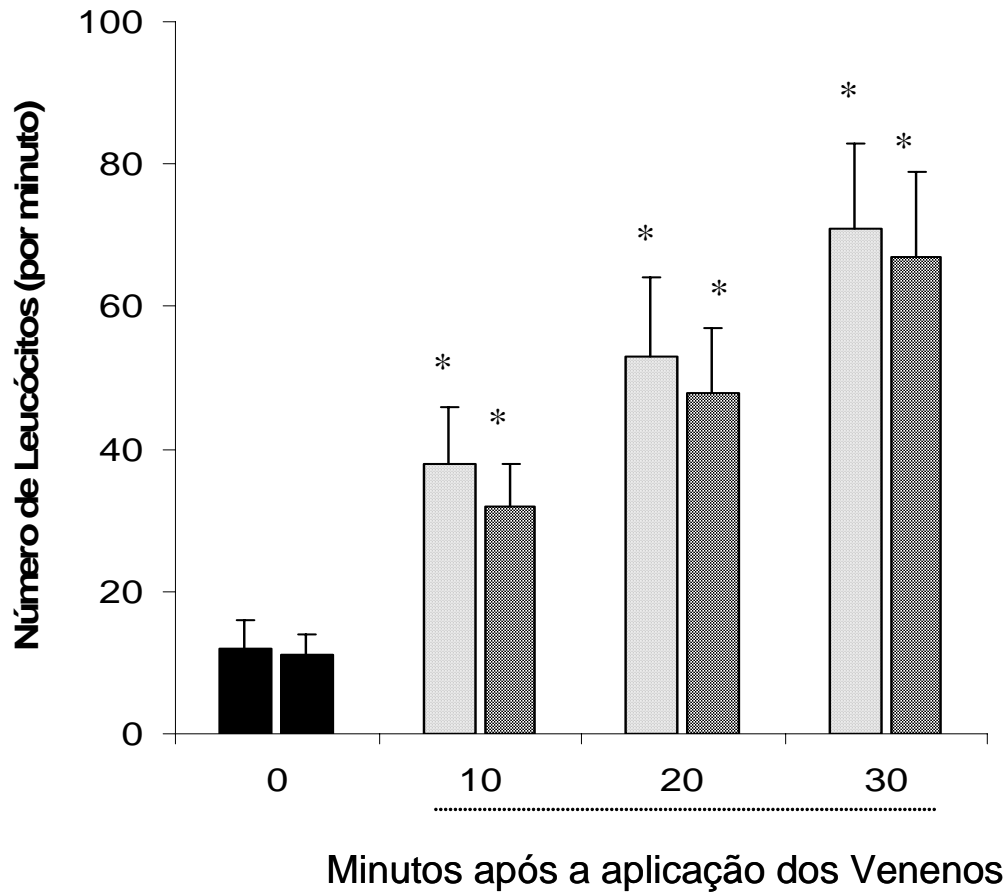


Figura 6. Ativação de leucócitos após a aplicação tópica das peçonhas do muco ou do ferrão de *Cathorops agassizii* no músculo cremaster de camundongos analisada através de microscopia intravital. O músculo cremaster de camundongos Swiss foi exposto e aplicado sobre ele 25 μ g das peçonhas do muco ou do ferrão em 20 μ L de PBS estéril. O número de células ativadas, dentro das vênulas pós-capilares, foi determinado por contagem durante 1 minuto a cada 10 minutos. Numero de leucócitos antes da aplicação dos venenos

4.5. Cinética da migração celular induzida pelas peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

Para analisarmos a cinética de migração celular induzida pelas peçonhas do muco e do ferrão, utilizamos a dose de 100 µg e avaliamos a migração em diferentes tempos (2, 24, 48 horas e 7 dias) após a injeção de peçonha na cavidade peritoneal.

Na Figura 8, podemos observar que, 2 horas após a injeção das peçonhas, ocorreu um aumento no número de leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal. O aumento no número total das células foi provocado pelo recrutamento de neutrófilos, principalmente induzido pela peçonha do ferrão. Neste período, ambas as peçonhas não estimularam a migração de linfócitos ou macrófagos. Vinte e quatro horas após a injeção das peçonhas, foi também observado um infiltrado significativo de leucócitos em relação ao grupo-controle. Entretanto, neste período, somente a peçonha do muco induziu o recrutamento de neutrófilos enquanto que a peçonha do ferrão induziu o recrutamento de macrófagos (Figura 9). O influxo celular, induzido na cavidade peritoneal 48 horas, foi caracterizado pelo recrutamento seletivo de macrófagos somente pela peçonha do ferrão. A peçonha do muco não induziu o influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal (Figura 10). Finalmente, 7 dias após a injeção das peçonhas observou-se que a peçonha do muco induziu um influxo significativo de leucócitos para o peritônio principalmente de macrófagos. Neste período, a peçonha do Ferrão não

induziu o recrutamento celular quando comparado com o grupo-controle (Figura 11).

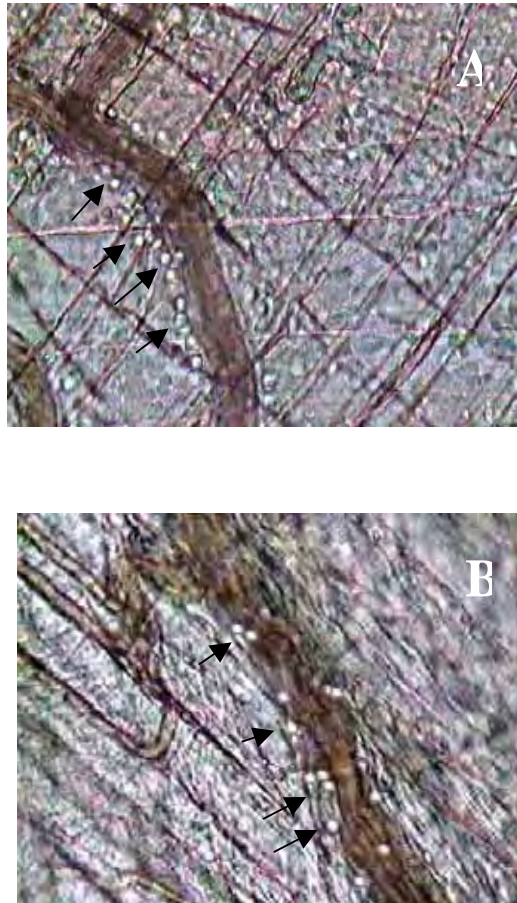


Figura 7. Fotos mostrando a transmigração de leucócitos após a aplicação tópica das peçonhas do muco ou do ferrão de *Cathorops agassizii* no músculo cremaster de camundongos analisadas através de microscopia intravital. O músculo cremaster de camundongos Swiss foi exposto e aplicado sobre ele 25 μg das peçonhas do muco ou do ferrão em 20 μL de PBS estéril. As fotografias das vênulas foram realizadas 40 minutos após a aplicação das peçonhas e mostram a transmigração de leucócitos (setas). (A) Vênula pós-capilar após a aplicação da peçonha do muco e (B) Vênula pós-capilar após a aplicação da peçonha do ferrão.

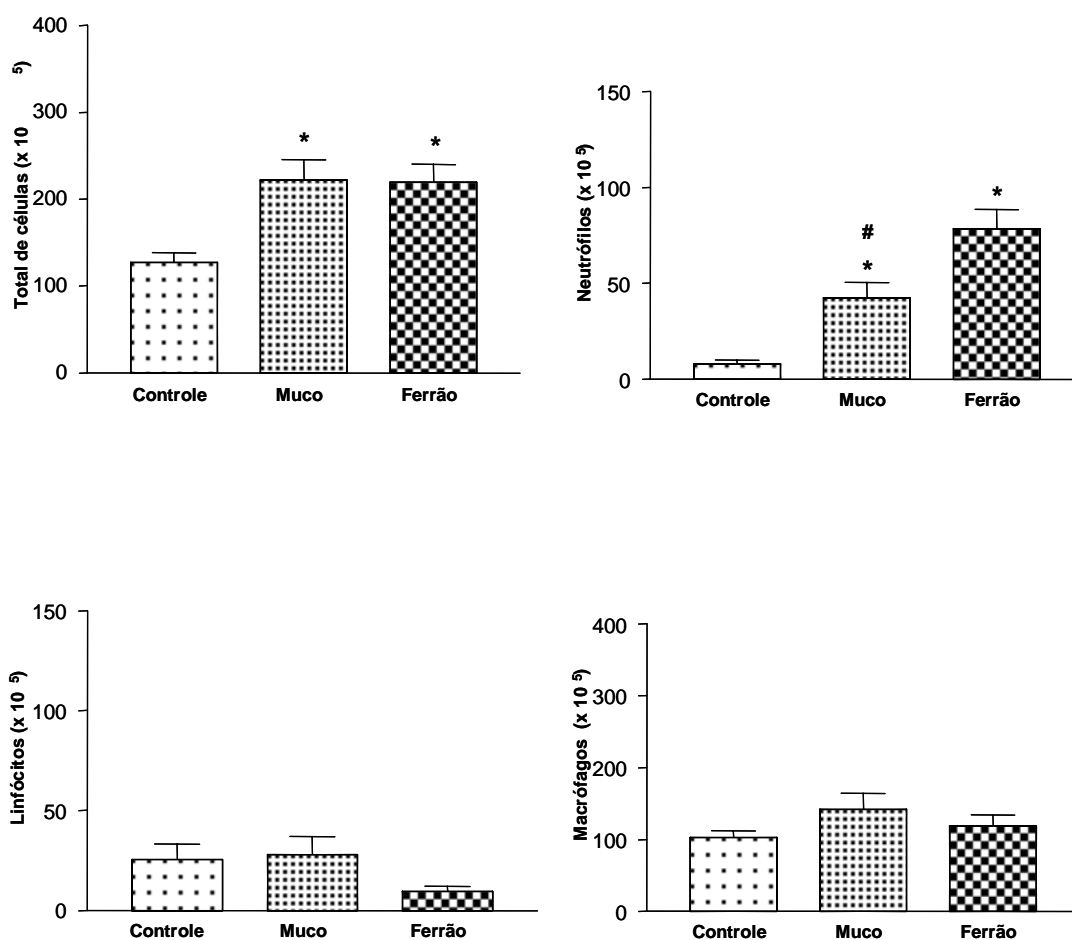


Figura 8. Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 2 horas após a injeção das peçonhas de *Cathorops agassizii*. Camundongos Swiss foram injetados intraperitonealmente com 100 µg da peçonha (do muco ou do ferrão) em 500 µL de PBS estéril e após 2 horas sacrificados para obtenção da suspensão celular para contagem das células. Animais injetados com PBS estéril foram considerados controle. As barras representam a média de cada grupo (n = 6) acrescida do desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

*p < 0,05 em relação ao Controle

#p < 0,05 em relação ao Ferrão

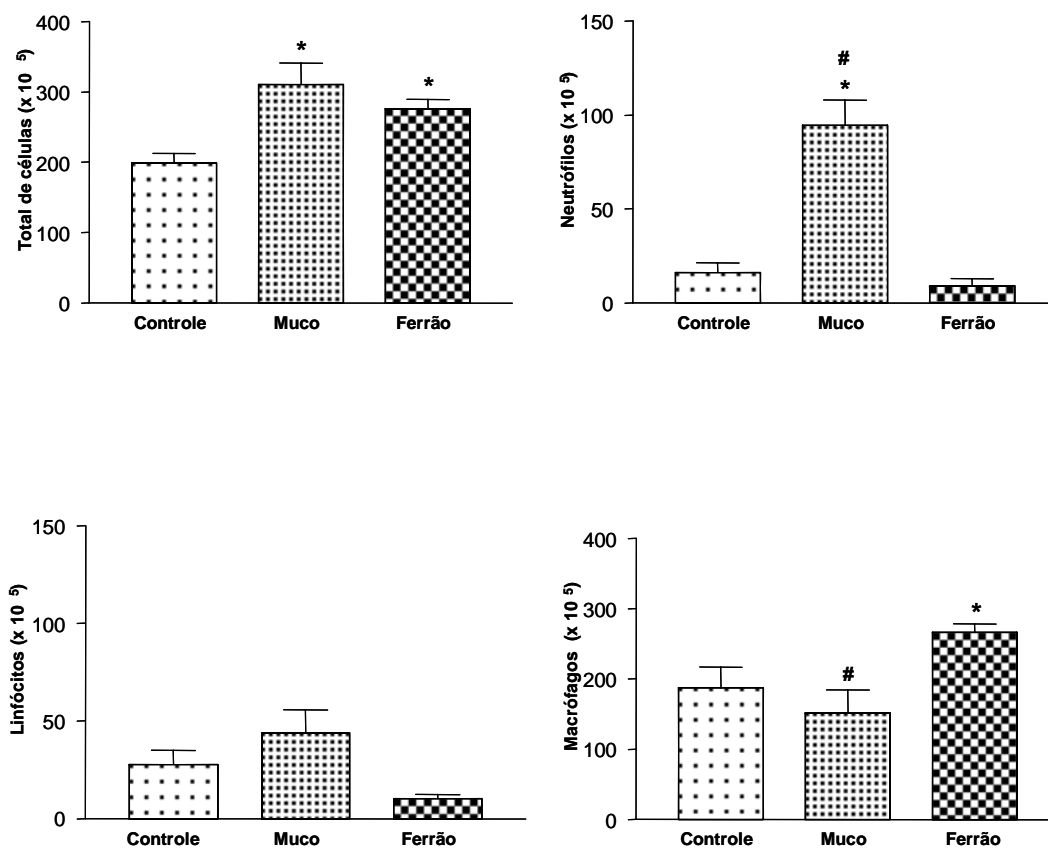


Figura 9. Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 24 horas após a injeção das peçonhas de *Cathorops agassizii*.

Camundongos Swiss foram injetados intraperitonealmente com 100 µg da peçonha (do muco ou do ferrão) em 500 µL de PBS estéril e após 24 horas sacrificados para obtenção da suspensão celular para contagem das células. Animais injetados com PBS estéril foram considerados controle. As barras representam a média de cada grupo (n = 6) acrescida do desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

***p** < 0,05 em relação ao Controle

#**p** < 0,05 em relação ao Ferrão

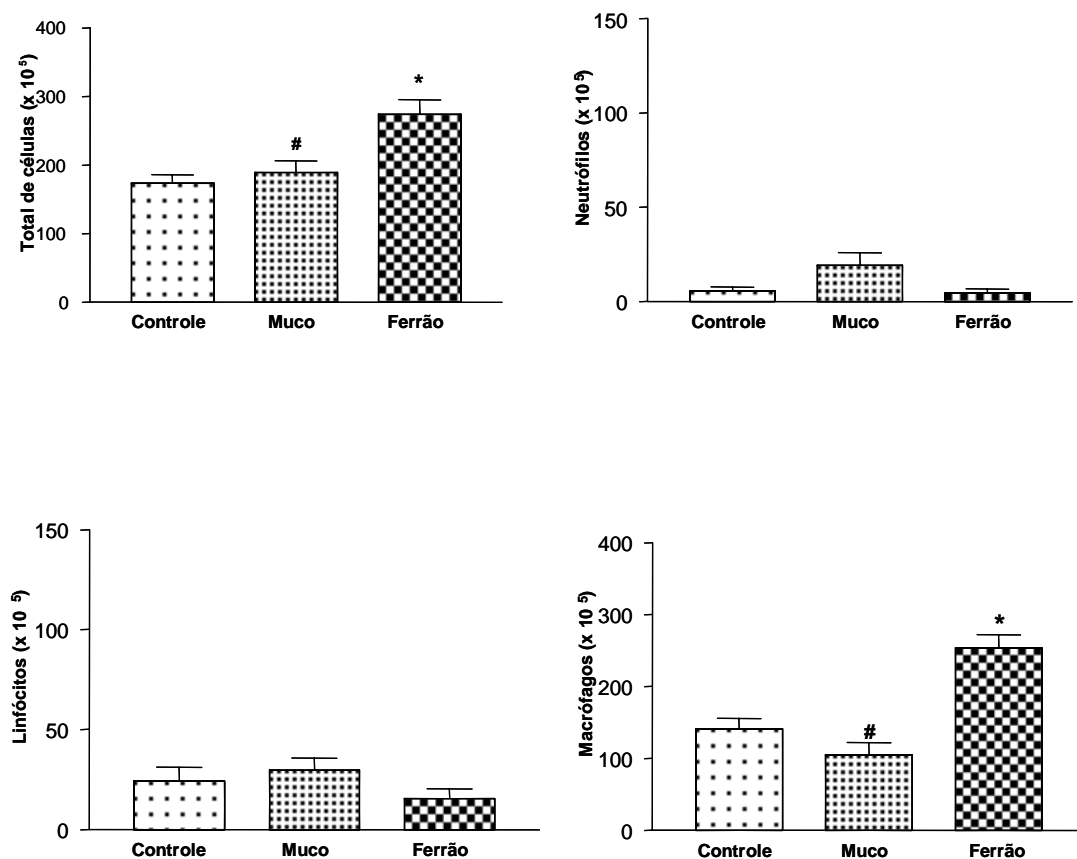


Figura 10. Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 48 horas após a injeção das peçonhas de *Cathorops agassizii*. Camundongos Swiss foram injetados intraperitonealmente com 100 μg da peçonha (do muco ou do ferrão) em 500 μL de PBS estéril e após 48 horas sacrificados para obtenção da suspensão celular para contagem das células. Animais injetados com PBS estéril foram considerados controle. As barras representam a média de cada grupo ($n = 6$) acrescida do desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão

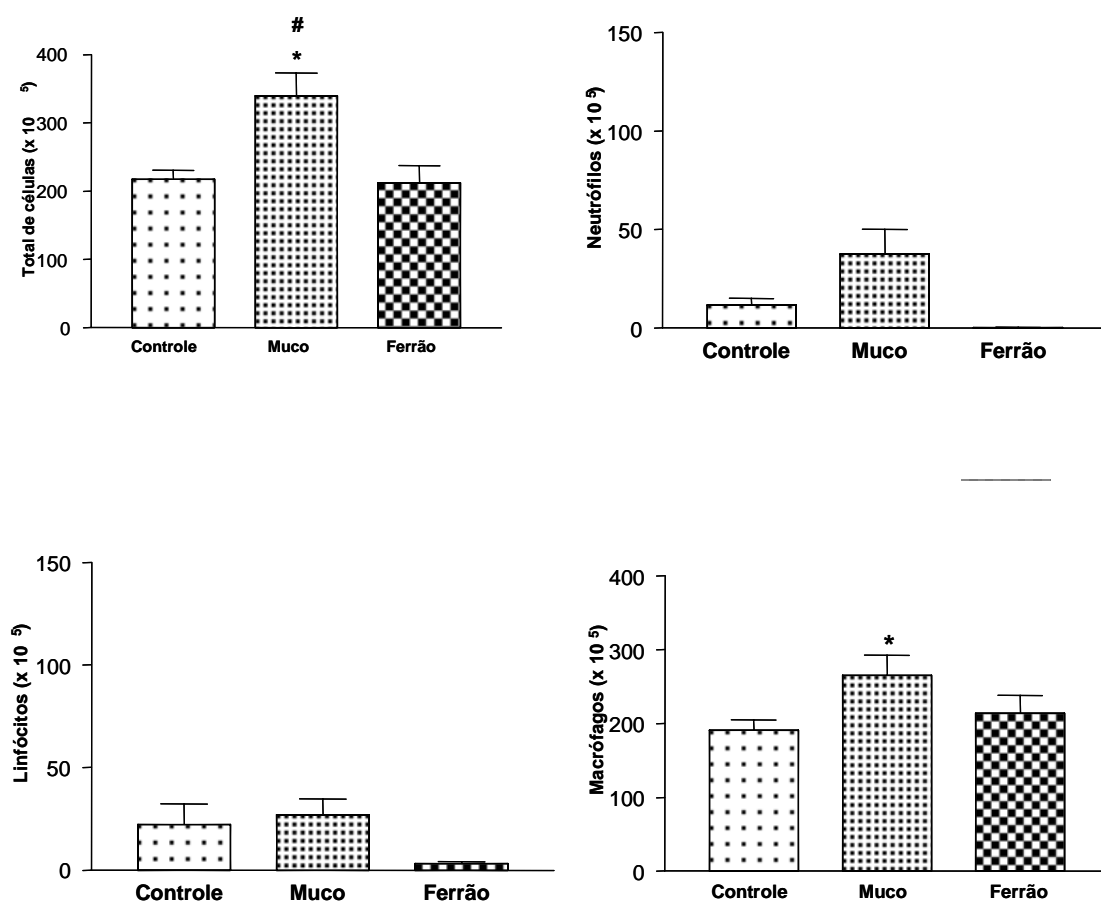


Figura 11. Influxo celular induzido na cavidade peritoneal 7 dias horas após a injeção das peçonhas de *Cathorops agassizii*.

Camundongos Swiss foram injetados intraperitonealmente com 100 μg das peçonhas (do muco ou do ferrão) em 500 μL de PBS estéril e após 7 dias sacrificados para obtenção da suspensão celular para contagem das células. Animais injetados com PBS estéril foram considerados controle. As barras representam a média de cada grupo ($n = 6$) acrescida do desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão

4.6. Mediadores lipídicos induzidos pelas peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

A produção de leucotrieno B4 e prostaglandina D2 foi analisada no sobrenadante da suspensão celular da cavidade peritoneal dos grupos peçonha do muco ou peçonha do ferrão por ELISA de competição. Na figura 12 podemos observar que ambas as peçonhas foram capazes de induzir significativa liberação na cavidade peritoneal de leucotrieno B4 no período de 2 horas. Em relação aos níveis de prostaglandina E2 não foi possível à determinação dos valores deste mediador uma vez que as amostras apresentaram concentrações maiores que a curva-padrão (> 250 pg/mL), sendo portanto analisadas a partir da compra de outro kit de detecção.

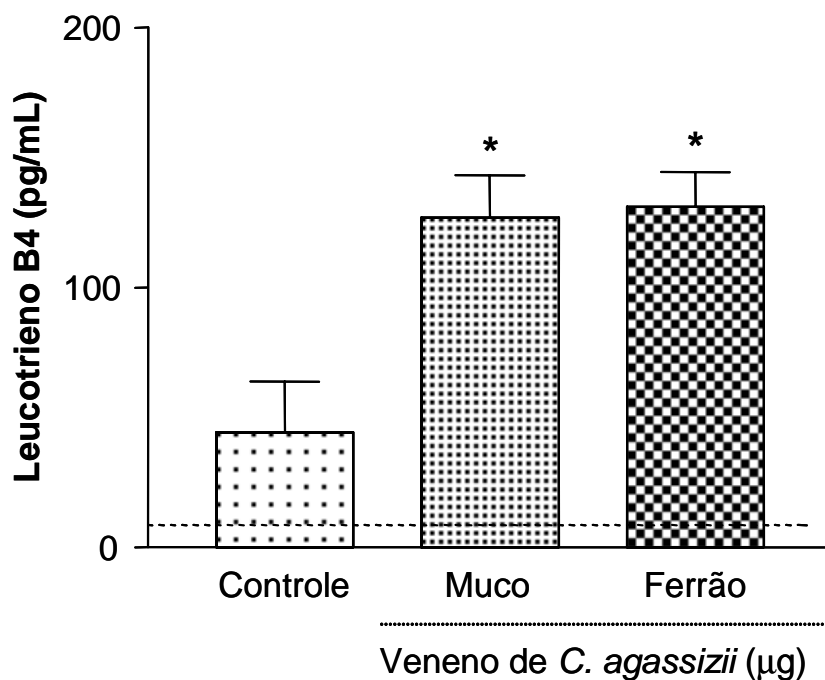


Figura 12. Produção de leucotrieno induzida pelas peçonhas (do muco ou do ferrão) de *C. agassizii*. Camundongos Swiss foram injetados com 100 μg das peçonhas (do muco ou do ferrão) em 500 μL de PBS estéril e após 2 horas foram sacrificados para obtenção do sobrenadante da suspensão celular para dosagem dos mediadores inflamatórios por ELISA de competição. Animais somente injetados com PBS foram considerados grupo-controle

4.7. Citocinas inflamatórias e quimiocinas induzidas pelas peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

Os sobrenadantes do líquido da cavidade peritoneal de camundongos injetados com 100 µg de ambas as peçonhas foram utilizados para a avaliação das citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e das quimiocinas (MCP-1 e KC) pelo método de ELISA.

Como podemos observar na Figura 13, as peçonhas do muco e do ferrão induziram somente a produção da citocina IL-6. Sendo que a do muco induziu níveis significativamente mais elevados. As demais citocinas (IL-1 β e TNF- α) não foram induzidas por nenhuma das peçonhas utilizadas. Quanto as quimiocinas, ambas as peçonhas induziram a síntese de MCP-1 e KC, sendo esta última induzida em maior quantidade pela peçonha do ferrão em relação a peçonha do muco (Figura 14 e 15).

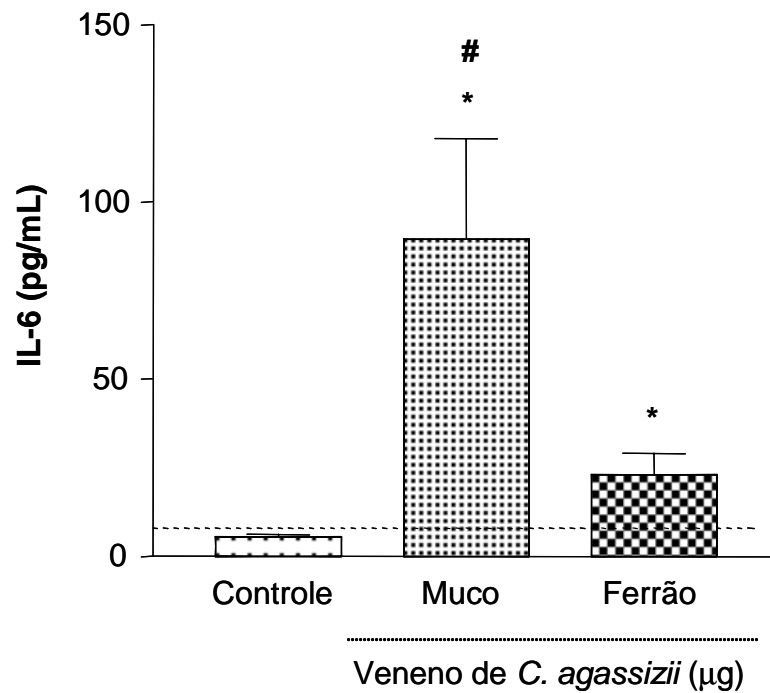


Figura 13. Determinação dos níveis da citocina IL-6 induzida pelas peçonhas de *C. agassizii*. O lavado peritoneal obtido 2 horas após a injeção de 100 μg das peçonhas (do muco ou do ferrão) em camundongos Swiss foi utilizado para a determinação da citocina IL-6, pela técnica de ELISA. As barras representam a média de cada grupo ($n = 6$) acrescida do desvio-padrão e a linha pontilhada, o limite inferior de detecção do método (31,25 pg/mL).

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão

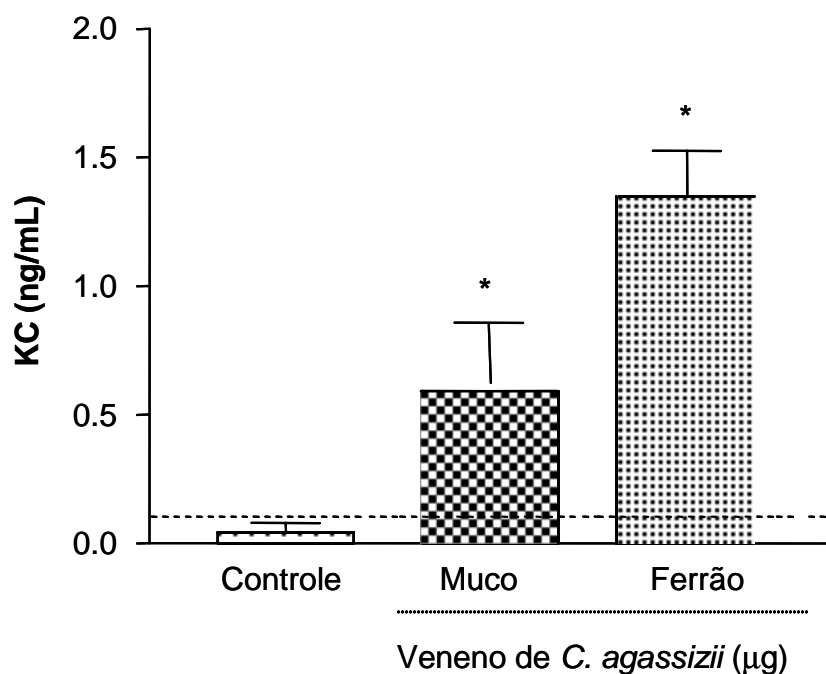


Figura 14. Determinação dos níveis de quimiocina KC induzida pelas peçonhas de *C. agassizii*. O lavado peritoneal obtido 2 horas após a injeção de 100 µg das peçonhas (do muco ou do ferrão) em camundongos Swiss foi utilizado para a determinação da quimiocina MCP-1 pela técnica de ELISA. As barras representam a média de cada grupo ($n = 6$) acrescida do desvio-padrão e a linha pontilhada, o limite inferior de detecção do método (31,25 pg/mL).

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão

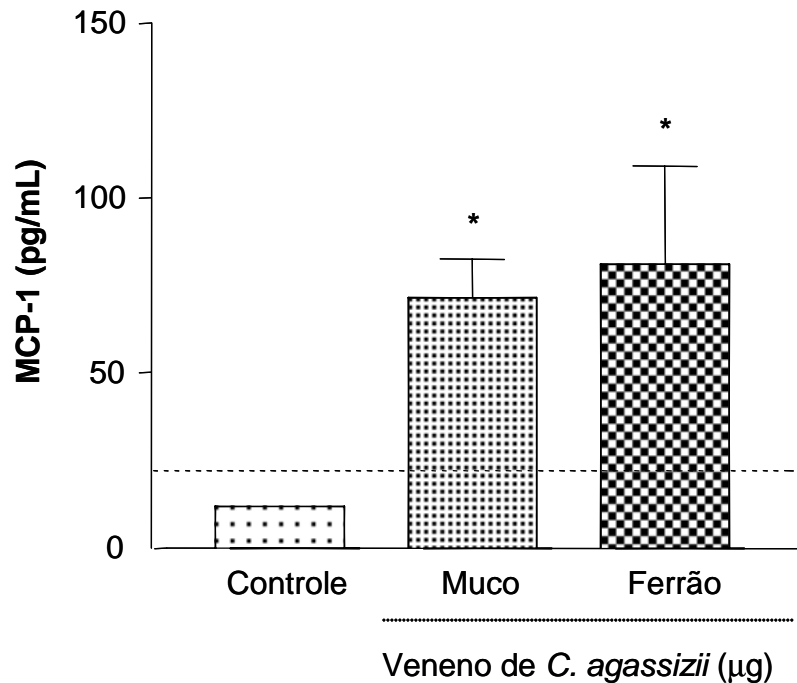


Figura 15. Determinação dos níveis de quimiocina MCP-1 induzida pelas peçonhas de *C. agassizii*. O lavado peritoneal obtido 2 horas após a injeção de 100 μg das peçonhas (do muco ou do ferrão) em camundongos Swiss foi utilizado para a determinação da quimiocina MCP-1 pela técnica de ELISA. As barras representam a média de cada grupo ($n = 6$) acrescida do desvio-padrão e a linha pontilhada, o limite inferior de detecção do método (31,25 pg/mL).

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão

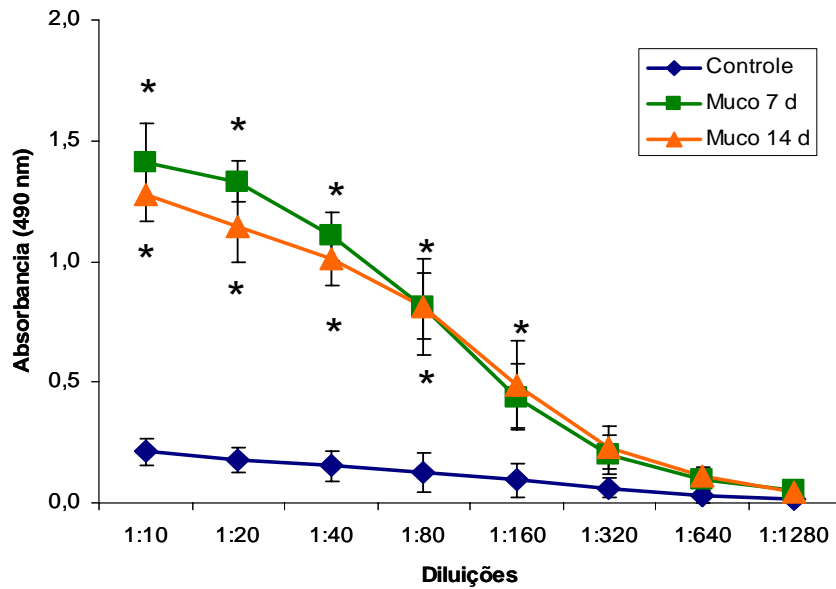
4.8. Produção de anticorpos anti-peçonhas do muco e do ferrão de *C. agassizii*

A resposta imune desencadeada pelas peçonhas de *C. agassizii* foi avaliada através da produção de anticorpos (IgM, IgG, IgG2a e IgG1) por meio da técnica de ELISA. Para tanto, camundongos Swiss foram injetados, pela via intraperitoneal, com 100 µg das peçonhas adsorvidos em 1,6 mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 7. Nos dias 7, 14 e 21 após a primeira imunização, os camundongos foram sangrados para obtenção dos plasmas para as dosagens de anticorpos.

Nossos resultados mostraram que as peçonhas (do muco e do ferrão) foram capazes de induzir igualmente a síntese dos anticorpos IgM durante a resposta primária (7 dias após a 1ª imunização) e secundária (14 dias após a 1ª imunização) (Figura 16A e 17A). Quanto a resposta de produção de IgG anti-peçonha, podemos observar nas Figuras 16B e 17B, que a peçonha do muco induziu maiores níveis deste anticorpo 7 e 14 dias após a 1ª imunização. Além disso, com relação à peçonha do ferrão, como podemos observar na Figura 17B, houve uma maior produção de IgG no 21º dia em relação ao 14º dia.

Também podemos observar que, os níveis de anticorpos IgG induzidos pela peçonha do muco foram devidos a produção de anticorpos da subclasse IgG1 (Figura 18A) e da peçonha do ferrão, devido a produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a (Figura 18).

A) IgM



B) IgG

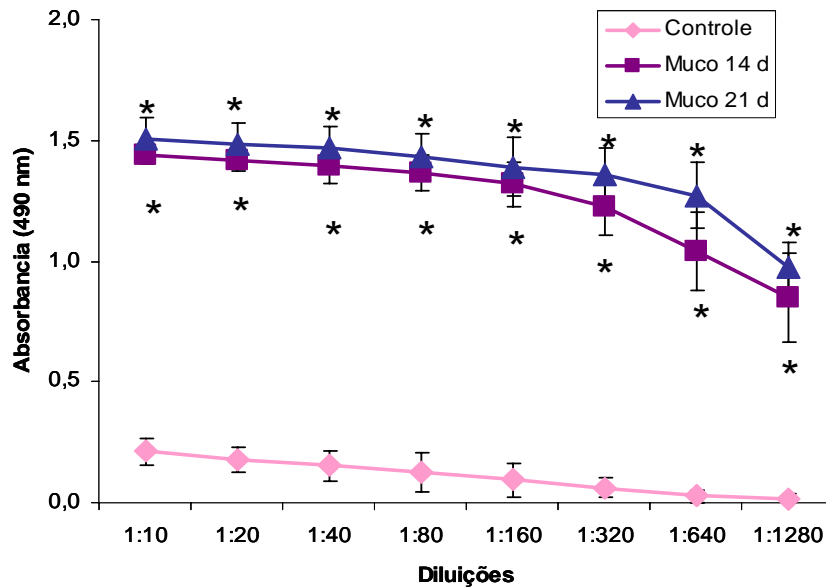
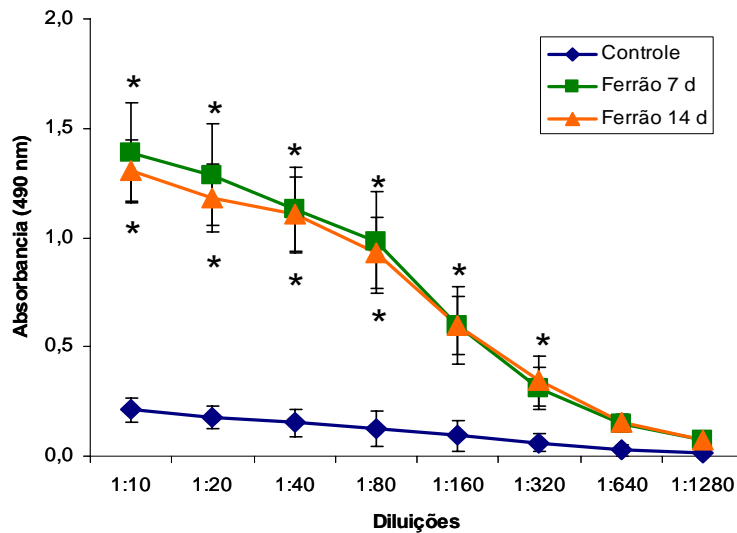


Figura 16. Produção de anticorpos IgM e IgG anti-peçonha do muco. Camundongos Swiss foram imunizados nos dias 0 e 7 com 100 μg da peçonha do muco adsorvido em 1,6 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Nos dias 7, 14 e 21 após a imunização os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma. Animais imunizados com $\text{Al}(\text{OH})_3$ foram considerados controle. Os anticorpos IgM e IgG foram avaliados pela técnica de ELISA. Os pontos representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão.

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

A) IgM



B) IgG

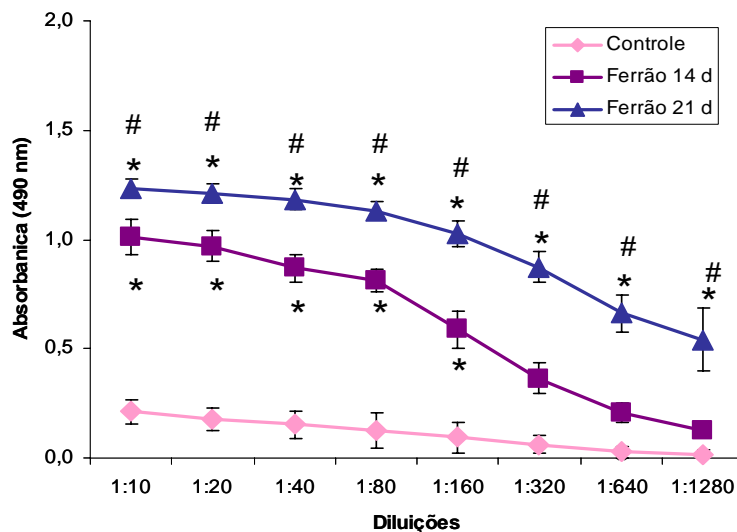
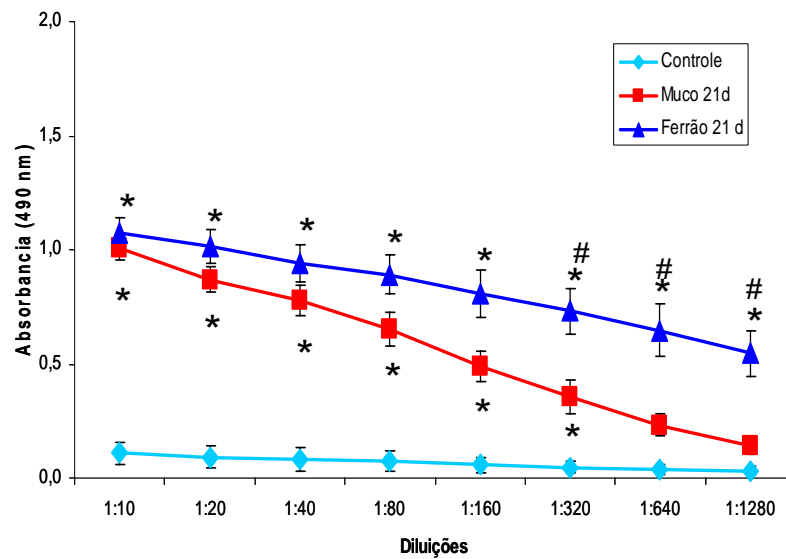


Figura 17. Produção de anticorpos IgM e IgG anti-peçonha de ferrão. Camundongos Swiss foram imunizados nos dias 0 e 7 com 100 µg da peçonha do ferrão adsorvido em 1,6 mg de Al(OH)₃. Nos dias 7, 14 e 21 após a imunização os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma. Animais imunizados com Al(OH)₃ foram considerados controle. Os anticorpos IgM e IgG foram avaliados pela técnica de ELISA. Os pontos representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão.

* $p < 0,05$ em relação ao Controle

$p < 0,05$ em relação ao Ferrão 14 d

A) IgG1



B) IgG2a

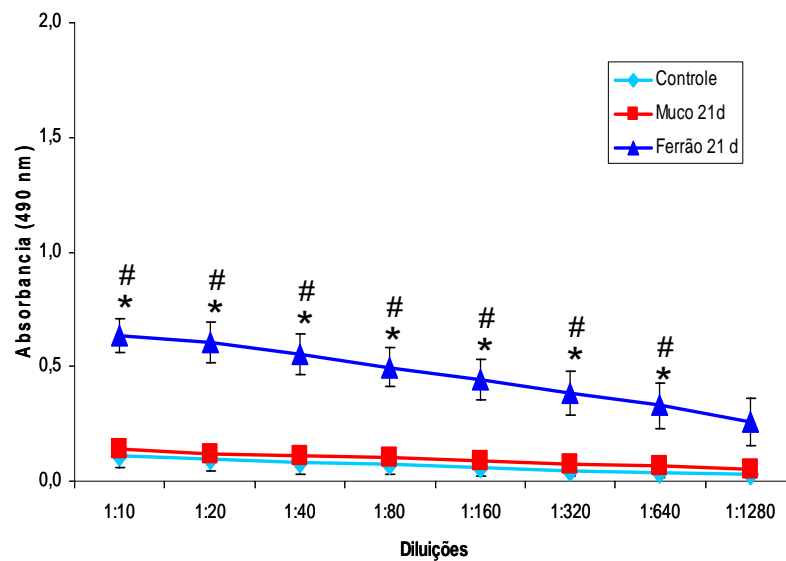


Figura 18. Produção de anticorpos anti-IgG1 e IgG2a. Camundongos Swiss foram imunizados nos dias 0 e 7 com 100 µg das peçonhas do muco ou do ferrão) adsorvido em 1,6 mg de Al(OH)₃. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma no 21º dia após a imunização. Animais imunizados com Al (OH)₃ foram considerados controle. Os anticorpos IgG1 e IgG2a foram avaliados pela técnica de ELISA. Os pontos representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão.

*P < 0,05 em relação ao Controle

p < 0,05 em relação ao Muco

4.9. Verificação da reatividade antigênica cruzada entre peçonhas de peixes peçonhentos

A reatividade antigênica cruzada foi avaliada entre as peçonhas do bagre *C. agassizii* (do muco e do ferrão) e essas peçonhas frente a outras peçonhas de peixes peçonhentos do Brasil (*T. nattereri*, *P. orbygnyi* e *S. plumieri*), através das técnicas de ELISA e Immunoblotting.

Como podemos verificar, na Tabela I, os anticorpos presentes nos plasmas dos animais imunizados com as peçonhas do muco e do ferrão reconheceram por ELISA ambas as peçonhas, sendo o reconhecimento específico maior para os anticorpos presentes no plasma dos animais imunizados com a peçonha do ferrão.

O plasma anti-peçonha do ferrão reconheceu mais fortemente as bandas protéicas da peçonha do ferrão do que da peçonha do muco, enquanto o plasma anti-peçonha do muco reconheceu fracamente as bandas protéicas encontradas na peçonha do muco (Figura 19).

Com relação a outras peçonhas (*T. nattereri*, *P. orbygnyi* e *S. plumieri*), baixos títulos de anticorpos foram detectados quando os plasmas anti-peçonha do muco e anti-peçonha do ferrão foram utilizados. Os títulos foram mais altos frente à peçonha de *S. plumieri* para os plasmas obtidos dos animais injetados com as peçonhas do muco ou do ferrão (Tabela II). O mesmo pode ser observado em relação ao immunoblotting. Tanto os plasmas anti-peçonha do muco e anti-peçonha do ferrão revelaram apenas

bandas protéicas presentes na peçonha de *S. plumieri*, em torno de 47 kDa (Figura 20).

Tabela I. Reatividade antigênica cruzada entre os anticorpos presentes nos soros produzidos em resposta a imunização com os venenos de Muco e Ferrão de *Cathorops agassizii*

	Anticorpos Antiveneno de Muco	Anticorpos Antiveneno de Ferrão
Veneno de Muco	40.960	81.920
Veneno de Ferrão	327.680	327.680

Os títulos de anticorpos determinados por ELISA foram representados como a recíproca da máxima diluição que apresentou um valor de absorvância maior que 0,100.

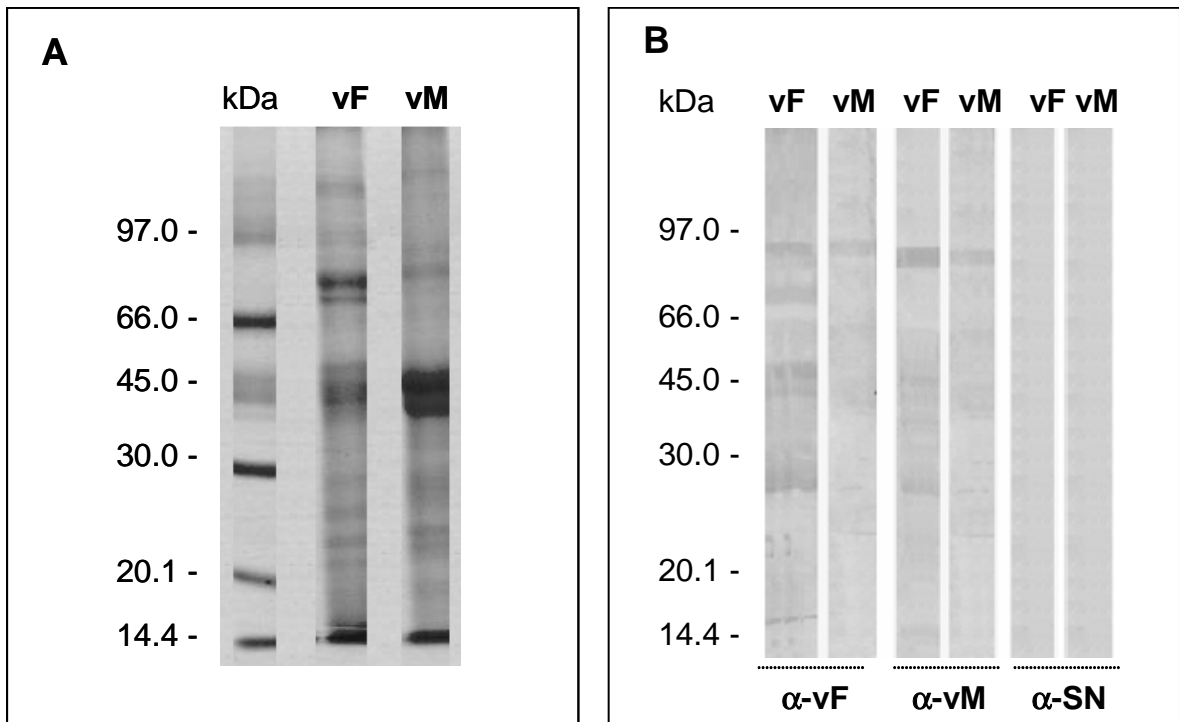


Figura 19. Eletroforese e “Immunoblotting” da peçonha do muco e do ferrão de *C. agassizii*. As peçonhas (30 µg) do muco (vM) e do ferrão (vF) foram fracionados por SDS-PAGE (A) e em seguida transferidos para uma membrana de nitrocelulose onde foram revelados com os soros anti-peçonha de muco (αpm), anti-peçonha do ferrão (αvF) e normal de camundongo - SN (B). O gel foi corado com Azul de Coomassie e os números da esquerda indicam os marcadores de massa molecular.

Tabela II. Reatividade antigênica cruzada entre os anticorpos presentes nos soros produzidos em resposta a imunização com os venenos de Muco ou Ferrão de *Cathorops agassizii* e os venenos de outros peixes peçonhentos

<i>Cathorops agassizii</i>		
	Anticorpos Antiveneno de Muco	Anticorpos Antiveneno de Ferrão
Veneno de <i>Thalassophryne nattereri</i>	320	320
Veneno de <i>Potamotrygon orbygnyi</i>	320	160
Veneno de <i>Scorpaena plumieri</i>	1.280	640

Os títulos de anticorpos determinados por ELISA foram representados como a recíproca da máxima diluição que apresentou um valor de absorbância maior que 0,100.

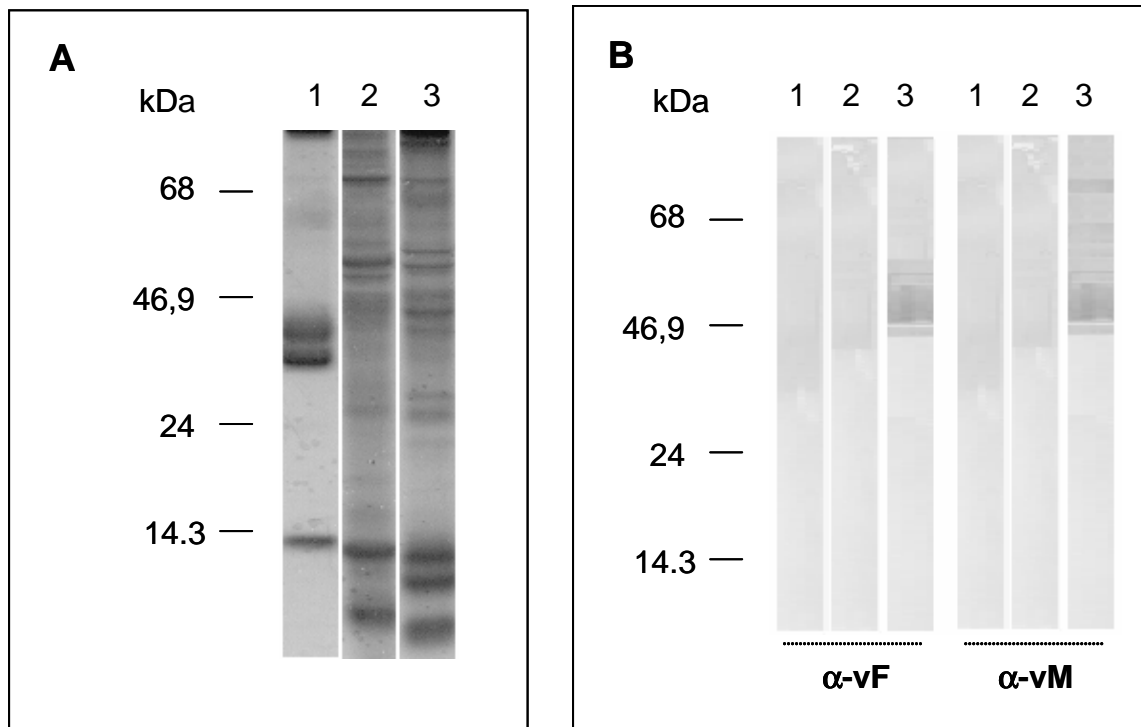


Figura 20. Eletroforese e “Immunoblotting” de diferentes peçonhas de peixes revelados com os soros anti-peçonhas do muco ou do ferrão de *C. agassizii*. As peçonhas (10 μ g) de *Thalassophryne nattereri* (1), *Potamotrygon orbygnyi* (2) e *Scorpaena plumieri* (3) foram fracionados por SDS-PAGE (A) e em seguida transferidos para uma membrana de nitrocelulose onde foram revelados com os soros anti-peçonha do muco (α pm), anti-peçonha do ferrão (α pf) (B). O gel foi corado com Azul de Comassie e os números da esquerda indicam os marcadores de massa molecular.

5. Discussão

Acidentes com bagres marinhos são freqüentes, principalmente por pecadores de camarão e de outros peixes com valor comercial maior. Os bagres são produtos secundários da pesca, pois não têm valor comercial, pelo fato dos pescadores trabalharem em contato permanente com as redes, se ferem com este subproduto. Também ocorre com menor incidência com banhistas que, provavelmente, em decorrência destes peixes serem descartados pelos pescadores profissionais são trazidos pela maré até as praias, ocorrendo assim acidentes em banhistas que inadvertidamente pisam. As manifestações clínicas do envenenamento são: dor intensa em todos os casos observados, incidência de inflamação no local manifestado por edema e eritema. Quando não ocorre fragmentação do ferrão no tecido e não havendo infecção secundária, a inflamação desaparece em 24 horas (1).

Diante da realidade de que, os bagres causam um grande número de acidentes, nos propusemos a estudar a resposta inflamatória que as peçonhas do *C. agassizii* causam nos acidentes. Utilizamos camundongos como modelo experimental, uma vez que, demonstraram serem suscetíveis as peçonhas estudadas.

Inicialmente as peçonhas (do muco e do ferrão) de *C. agassizii*, foram obtidos e analisados quanto ao perfil eletroforético. Podemos verificar que a peçonha do ferrão apresenta componentes majoritários entre 66 e 97 kDa e

a do muco com componentes mais evidentes por volta de 45 kDa. Além disso, os componentes de baixo peso molecular (14 kDa) foram visualizados em ambas as peçonhas, mostrando desta forma uma similaridade entre eles. Junqueira e colaboradores ⁽⁵²⁾ relataram recentemente que as peçonhas do bagre *Genidens genidens*, pertencente à mesma família Ariidae, apresentaram um perfil eletroforético parecido, com componentes distribuídos entre 14 e 97 kDa, sendo a banda majoritária por volta de 45 kDa. Embora seja difícil estabelecer uma comparação entre composições de peçonhas, os nossos resultados mostram uma conservação de identidade entre as peçonhas de *C. agassizii*.

Nossos resultados demonstraram que as peçonhas do muco e do ferrão do *C. agassizii* em modelo murino produzem inflamação. Apoiados nos sinais inflamatórios observados em estudos clínicos dos casos de acidentes com estes peixes ⁽¹⁾, nossos estudos induziram uma inflamação num quadro de acidente com as peçonhas do bagre *C. agassizii*.

A fase aguda da inflamação caracteriza-se por alterações no calibre vascular que levam ao aumento do fluxo sanguíneo e mudanças estruturais na microcirculação, permitindo que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem à circulação ⁽⁵³⁾. **Nossos resultados mostraram que as peçonhas de *C. agassizii* apresentam igualmente a capacidade de induzir aumento da permeabilidade vascular e também edema de pata.** Estes resultados são semelhantes aos obtidos com as peçonhas de outros peixes brasileiros, como *Thallassophryne nattereri* ⁽³²⁾ ou as arraias

Potamotrygon cf. *scobina* e *Potamotrygon* gr. *Orbygnyi* ⁽¹⁸⁾ que também foram capazes de induzir edema em camundongos. Podemos sugerir a presença de componentes nas peçonhas de *C. agassizii* capazes de promover a liberação de mediadores importantes para o desencadeamento do aumento de permeabilidade vascular e edema. Como consequência das mudanças morfo-estruturais sofridas pelas células endoteliais e pelas intersticiais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas gerando mediadores lipídicos biologicamente ativos ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁵⁵⁾. Os fosfolípedes de membrana são clivados por duas vias enzimáticas distintas: a da cicloxigenase, gerando as prostaglandinas (PGD), que são mediadores lipídicos derivados do ácido aracdônico, formados por mastócitos quando ativados, que se liga a receptores nas células dos músculos lisos, atuando como vasodilatador e promovendo a quimiotaxia e acúmulo de neutrófilos nos sítios inflamatórios. As tromboxanas (TBX), e a da lipoxigenase, gerando os leucotrienos (LCT), estes são sintetizados predominantemente em células de origem mielóide através do metabolismo do ácido araquidônico pela via 5-Lipoxigenase (5-LO), com capacidade de quimiotaxia para neutrófilos. São produzidos por mastócitos que se liga a receptores específicos, também nas células dos músculos lisos. E as lipoxinas.

Foi detectada a presença de LCT B4 e PGD E2 no lavado da cavidade peritoneal dos camundongos injetados com ambas as peçonhas confirmando esta hipótese, uma vez que estes mediadores estão relacionados com a indução do aumento de permeabilidade vascular e com o edema. O

extravasamento de células imunes do sangue periférico através do endotélio vascular para a matriz extracelular dos tecidos é um evento comum em manifestações inflamatórias ⁽⁵⁶⁾. Nossos resultados através da microscopia intravital mostraram que as peçonhas do muco e do ferrão do bagre *C. agassizii* induziram um grande número de leucócitos rolantes nas vênulas pós-capilares com focos de extravasamento leucocitário. A infiltração tecidual por leucócitos necessita de interações dinâmicas, reguladas entre leucócitos, células endoteliais e complexos de receptores na superfície da matriz extracelular e ainda, um conjunto de substâncias quimioatratoras específicas identificadas como quimiocinas ^{(57) (58) (59) (60)}. Os receptores de leucócitos que participam da interação com as células endoteliais pertencem a 2 principais classes de proteínas: as selectinas que medeiam as interações iniciais com carboidratos, e as integrinas que são responsáveis pela fina adesão e transmigração por entre as junções das células endoteliais ⁽⁶¹⁾. Uma vez ocorrida à transmigração pelas células endoteliais, os leucócitos começam a interagir com a membrana basal e a matriz extracelular ^{(57) (62)} ⁽⁶³⁾.

O recrutamento leucocitário foi observado no modelo *in vivo* pela injeção de ambas as peçonhas do bagre. As peçonhas do muco e do ferrão foram capazes de induzir o influxo para a cavidade peritoneal principalmente de neutrófilos seguido pelo influxo de macrófagos. Além disso, a peçonha do ferrão induziu uma resolução mais rápida do influxo leucocitário ao contrário da peçonha do muco que manteve o infiltrado macrofágico por até 7 dias.

O padrão de recrutamento leucocitário (primeiramente o influxo predominante de neutrófilos, sendo depois substituído pelo recrutamento de células mononucleares) parece ser responsável pela resolução do processo inflamatório, que removeu o agente lesivo restaurando a homeostase tecidual. Neutrófilos são as primeiras células a alcançarem o sítio da lesão e predominam numericamente no período agudo da injúria tecidual. Desenvolvem um papel importante na defesa do organismo, pois podem fagocitar e destruir o agente lesivo. Além disso, podem ser ativadas pelas citocinas produzidas pelos macrófagos residentes no tecido e células endoteliais. Uma vez que os monócitos do sangue saem da circulação e entram no local da injúria, diferenciam-se em macrófagos, que são células efetoras finais da reação inflamatória. Os macrófagos fagocitam as partículas estranhas e as destroem pela síntese de espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico. Seqüencialmente, o macrófago ativado age retirando os restos celulares, induzindo a eliminação do antígeno e a resolução da reação inflamatória.

A infiltração tecidual por leucócitos também pode ser regulada inicialmente por citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Estas proteínas inflamatórias atuam no recrutamento leucocitário induzindo um aumento na expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais ⁽⁶⁴⁾ ⁽⁶⁵⁾. São secretadas por células da imunidade inata e também pela adquirida. Produzidas em resposta a microrganismos e a outros antígenos, diferentes citocinas estimulam diversas respostas de células envolvidas na imunidade e

na inflamação, pois podem atuar próximo ao local onde foi produzida, isto é, na própria célula que a secretou ou em uma célula próxima, influenciando ações de outras citocinas.

As quimiocinas também participam deste processo, formam uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam, por recrutamento seletivo, os leucócitos do sangue para os tecidos. As quimiocinas CXC agem predominantemente em polimorfonucleares (IL-8 em humanos ou seu homólogo murino KC) e as da família CC e C atuam, sobretudo sobre monócitos, linfócitos T e B, células NK, eosinófilos e basófilos (MCP-1 e MIP-1 α) ⁽⁶⁶⁾. As quimiocinas recrutam as células de defesa para os sítios da infecção, sendo comuns, diferentes quimiocinas atuando sobre diferentes células para controlar a natureza do infiltrado inflamatório. São moléculas básicas que se ligam por interações eletrostáticas à porção comum de heparan sulfato dos proteoglicanos da matriz extracelular como sindecam, glipicam e CD44 que se apresentam carregados negativamente ^{(67) (68)}.

Portanto, o próximo passo do nosso trabalho foi avaliar a presença das citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e das quimiocinas (KC e MCP-1) neste modelo. De maneira interessante, somente a citocina IL-6 foi detectada no lavado peritoneal induzida principalmente pela peçonha do muco, podendo ter sido sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares ou por fibroblastos presentes neste processo. A IL-6 é considerada uma citocina multifuncional envolvida na regulação de uma

variedade de respostas celulares, incluindo sua atuação juntamente com GM-CSF sobre a produção de monócitos na medula óssea ⁽⁶⁹⁾.

Notamos também, a presença das quimiocinas KC e MCP-1, por ambas as peçonhas, indicando a participação destes mediadores no recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio da lesão. Estas quimiocinas estimulam a polimerização e despolimerização, alternadamente, dos filamentos de actina, induzindo o movimento de células leucocitárias migrarem para os sítios de inflamação. A quimiocina KC recruta preferencialmente neutrófilos e a MCP-1, monócitos. Lima e colaboradores ⁽³²⁾ também demonstraram a indução de recrutamento celular para a cavidade peritoneal de camundongos pela injeção da peçonha do peixe *T. nattereri*, como também a presença de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α no coxim plantar. Uma vez caracterizada a resposta inflamatória investigamos a capacidade das peçonhas do bagre *C. agassizii* de induzir uma resposta imune específica.

O sistema imune defende o organismo através de mecanismos fisiológicos, reconhecendo corpos estranhos e impedindo a sua disseminação na tentativa de eliminar o agente agressor. Para isso, muitas células de vários tipos interagem entre si e com o agente. Essas interações bidirecionais otimizam a resposta imune e garantem uma função protetora mais eficiente. As células apresentadoras de antígeno (APCs) representadas principalmente por macrófagos e células dendríticas apresentam o antígeno associado a moléculas de histocompatibilidade (do tipo I ou II) em sua superfície. Isto

garante o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T através do seu receptor de antígeno (TCR).

A apresentação antigênica ao receptor do linfócito T cria um estímulo e garante a sua ativação; quando o linfócito T é ativado, inicia-se o processo de proliferação e diferenciação em célula efetora com produção de citocinas e o recrutando e a ativação de outros tipos celulares. A resposta imune desencadeada a partir da ativação do linfócito T pode ser de dois tipos, a resposta imune humoral – mediada por anticorpos produzidos por plasmócitos (linfócitos B diferenciados) e a resposta imune celular, caracterizada por linfócitos T efetores com produção de citocinas.

Inicialmente observamos que o processo de imunização com as peçonhas do muco ou do ferrão foi eficaz em induzir uma produção primária e secundária de anticorpos das classes IgM e IgG anti-peçonhas. No entanto, a peçonha do muco induziu níveis mais elevados de anticorpos IgG na resposta secundária em relação a peçonha do ferrão. Além disso, observamos que a peçonha do muco foi capaz de provocar a produção principalmente de anticorpos IgG1 e a peçonha do ferrão dos dois isótipos, IgG1 e também de IgG2a. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram a produção inicial de IgM na resposta imune primária, resposta obtida após o primeiro contato com o antígeno. Os anticorpos IgM circulam no sangue e na linfa e possuem múltiplos sítios de ligação ao antígeno por se apresentarem na forma pentamérica. A resposta secundária é desencadeada mais rápida que a primária, e, além disso, a síntese de IgM

é substituída por maiores níveis de IgG com afinidade aumentada, específica para o antígeno em questão. É importante salientar que a presença de anticorpos mais específicos produzidos pelos linfócitos B ocorre em resposta aos sinais gerados pelos linfócitos T efetores (moléculas co-estimulatórias e citocinas). As citocinas IL-2, IFN- γ produzidas pelos linfócitos Tipo 1 podem induzir a síntese de anticorpos IgG2a, e as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 produzidas pelos linfócitos Tipo 2 podem induzir a síntese de IgE e IgG1.

Avaliamos ainda, a capacidade dos anticorpos presentes nos plasmas coletados dos animais imunizados com as peçonhas do muco ou do ferrão de reconhecerem os componentes das próprias peçonhas. Observamos uma especificidade dos anticorpos para os componentes das próprias peçonhas e também uma reatividade antigênica cruzada entre eles. Indicando que embora não foi verificada uma identidade total entre as peçonhas do muco e do ferrão elas podem apresentar sítios antigênicos comuns reconhecíveis pelos anticorpos.

Finalmente, utilizando os mesmos anticorpos que se encontravam presentes nos plasmas coletados dos animais imunizados com as peçonhas do muco e do ferrão, quando colocados na presença de peçonhas de diferentes peixes peçonhentos, pudemos notar o reconhecimento de algumas proteínas presentes na peçonha de *S. plumieri* e poucas nos demais.

6. CONCLUSÕES

Podemos sugerir que as peçonhas do bagre *C. agassizii* (do muco ou do ferrão) são capazes de induzir resposta imune inata e desencadear a resposta imune específica. Estas respostas parecem ser reguladas pela presença de células inflamatórias neutrófilos e macrófagos, dos mediadores lipídicos (LCT B4 e PGD E2), da citocina IL-6 e das quimiocinas KC e MCP-1. A produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a sugerem que as peçonhas são também capazes de induzir uma resposta imune específica mista, com diferenciação de clones de linfócitos dos tipos T1 e T2.

7. Referencias Bibliográficas

1. Haddad Jr.V. Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento. Editora Rocca, São Paulo, 2000.
2. Russell, FE. Poisonous Marine Animals. TFH Publications. New York, 1971.
3. Olivera BM, Rivier J, Clarck C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hilliard DR, Cruz LJ. Diversity of Conus neuropeptides. Science. 1990. v. 249, p. 257-63.
4. Nuijen B, Bouma M, Henrar RE, Manada C, Bult A, Beijnen JH. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. Anticancer Drugs. 1999. Nov; 10(10):879-87.
5. Rinehart KL. Antitumor compounds from tunicates. Med Res Rev. Jan. 2000. 20(1):1-27.
6. Cvetkovic RS, Figgitt DP, Plosker GL. ET-743. Drugs. 2002. 62(8):1185-92.
7. Van Kesteren, C, Twelves C, Bowman A, Hoekman K, Lopez-Jazarro Jimeno J, Guzmán C, Mathot RA, Simpson A, Vermorken JB, Smytl J, Schellens JH, Hildenbrand MH, Rosing H, Beijnen JH. Clinical pharmacology of the novel marine derived anticancer agent

- ecteinascidin 743 administered as a 1 and 3 h infusion in a phase in study. *Anticancer Drugs*, New York, 2002. v.13, p.381-393.
8. Nelson JP, Lucas GL. Peripheral neuropathy caused by catfish pectoral spine. *South. Med. J.* 1970. 63(8): 981-982.
 9. Russell FE. *Poisonous Marine Animals*. New York: TFH Publications, 1971.
 10. SAN W. Animais marinhos venenosos e peçonhentos. In: Cecil. - *Tratado de medicina interna*, 18. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1990. p.1684-85.
 11. Schvartsman S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992.
 12. Hara T.J, Macdonald S. Olfactory responses to skin mucous substances in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol A*. 1976. 54(1): 41-4.
 13. Boylan DB, Scheuer PJ. Pahutoxin: a fish poison. *Science*. 1967. Jan. 6; 155(758): 52-6.
 14. Hashimoto Y, Oshima Y. Separation of grammistins A, B and C from a soapfish *Pogonoperca punctata*. *Toxicon*. 1972. May; 10(3):279-84.
 15. Church JE, Hodson WC. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, 2002. v. 40, p. 1083-93.
 16. Haddad Jr V, Pardal PP, Cardoso JL, Martins IA. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): report of 43

- injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Para State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2003. 45(4), p.221-223,
17. Haddad JR.V, Neto DG, De Paula Neto JB, De Luna Marques FP, Bárbaro KC. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenoming in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon* 2004. v. 43, p. 287-294.
 18. Magalhães GS, Junqueira-de-Azevedo, Lopes-Ferreira M, Lorenzini DM, Ho PL, Moura-da-Silva AM. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie (in press)* 2006.
 19. Carrijo LC, Andrich F, Ferreira-de-Oliveira, R, Cordeiro MN, Richardson M, Figueiredo SG. Some chemical and pharmacological proprieties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. SBBq XXXII Reunião Annual, 2003.
 20. Boletini-Santos D, Haddad JR. V, Figueiredo SG, Lopes-Ferreira M, Lima C. Evaluation of acute lung injury induced by the venom of the fish *Scorpaena plumieri* in murine model. *Memórias do Instituto Butantan.* 2005. V. 62 p. 127.
 21. Fróes HP. Sur un poisson toxiphore brésilien: le "niquim" *Thalassophryne maculosa*. *Rev Sud-Am Med Chil*, 1932. v.3, p.871-878,
 22. Fróes HP. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). *Bahia Médica*, 1933. v.4, p.225-227.

23. Almeida VG & Rocha CM. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. Rev. Soc. Bras. Toxicol. 1989. 2: 49-51.
24. Auto HF. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. Rev. Esc. Cienc. Med. de Alagoas. 1992. 5:35-36.
25. Lopes-Ferreira M, Moura-da-Silva AM, Mota I, Takehara HA. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. Toxicon. 2000. Vol.38, p 1149-1156.
26. Monteiro H S A, Bezerra G P, Facó PEG, Havt A, Silva-JR GB. Epidemiologia dos acidentes pelo peixe Niquim (*Thalassophryne nattereri*) no estado do Ceará no período de 1992 a 2002, - XXXIX Congresso da Sociedade brasileira de Medicina tropical, p.11,2003.
27. Lopes-Ferreira M, Barbaro KC, Cardoso DF, Moura-da-Silva AM, Mota I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. Toxicon. 1998. v.36, p.405-410.
28. Fonseca LA, Lopes-Ferreira M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). Anais Bras. Dermat. 2000. 75:435-443.
29. Lopes-Ferreira M, Emim JAS, Souccar C, Lapa AJ, Cezari MHS, Juliano L, Moura-Da-Silva AM, Mota I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *Thalassophryne nattereri* fish venom. Toxicon 1998b. v.36, p.1304.

30. Lopes-Ferreira M, Núñez J, Rucavado A, Farsky SHP, Lomonte B, Angulo Y, Moura-da-Silva AM, Gutierrez JM. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *Int. J. Exp. Pathol*, 2001. 82: 55-64.
31. Lopes-Ferreira M, Moura-da-Silva AM, Piran-Soares AA, Ângulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM, Farsky SHP. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*, 2002. 40:1141-1147.
32. Lima C, Clissa PB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-da-Silva AM, Lopes-Ferreira M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*, 2003. v. 42, p. 499-507.
33. Lopes-Ferreira, M., Emim, J. A., Oliveira, V., Puzer, L., Cezari, M. H., Araújo, M. D. A., Juliano, L., Lapa, A. J., Souccar, C., Moura-da-Silva, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol*. 2004 Dec 1;68(11):2151-7.
34. Piran-Soares AA, Bruni FM, Távora JPF, Guidolin R, Higashi HG, Fernandes I, Takehara HA, Lopes-Ferreira M. Development of a new antivenom: experimental evidence of the efficacy of horse serum against *Thalassophryne nattereri* venom. *Memórias do Instituto Butantan*, 2003. v.60, p.95.

35. Reis EG. A pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. Documentos Técnicos. 05, Furg. Rio Grande do Sul, 1986. 22p.
36. Figueiredo JL, Menezes NA. Manual de Peixes Marinhos do Brasil – II. Teleostei (1). Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo. São Paulo. 1978. p.34-95.
37. Thulesius O, Al-Hassan JM, Criddle RS, Thomson M. Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). Gen Pharmacol. 1983. 14(1):129-32.
38. Al-Hassan JM, Afzal M, Ali M, Thomson M, Fatima T, Fayad S, Criddle RS. Lipid composition of the epidermal gel secretion from the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus* Ruppell). Comp Biochem Physiol 1986. B.85(1):41-7.
39. Al-Hassan JM, Ali M, Thomson M, Fatima T, Gubler CJ. Toxic effects of the soluble skin secretion from the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell) on plasma and liver enzyme levels. Toxicon. 1985. 23(3):532-4.
40. Al-Hassan JM, Ali M, Thomson M, Fatima T, Gubler CJ, Criddle RS. Prostaglandin associated mortality following intravenous injection of catfish epidermal secretions in rabbits. Prostaglandins Leukot Med. 1987. Jun;28(1):95-102.

41. Al-Lahham A, Al-Hassan JM, Thomson M, Criddle RS. A hemolytic protein secreted from epidermal cells of the Arabian Gulf catfish, *Arius thalassinus* (Ruppell). *Comp Biochem Physiol B*. 87(2):321-7, 1987.
42. Kizer K.W. Marine envenomations. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1983-84. 21(4-5):527-55.
43. Al-Hassan JM, Ali M, Thomson M, Pace-Asciak CR. Detection of 8-epi prostaglandin F₂alpha in an extract of epidermal secretion of the catfish from the Arabian Gulf. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998. Nov; 59(5):325-8.
44. Al-Hassan JM. Diabetic ulcer healing preparations from the skin of the Arabian Gulf catfish (*Arius bilineatus* Val.): a novel and effective treatment. *Int J Tissue React*. 1990. 12(2):121-35
45. Al-Bow HA, Al-Hassan JM, Thomson M, Thulesius O, Elkhawad A. Multiple vasoactive factors in epidermal secretions of the Arabian Gulf catfish, *Arius bilineatus* (Valenciennes). *Gen Pharmacol*. 1997. May;28(5):737-44.
46. Fahim FA, Esmat AY, Mady EA, Ahmed SM, Zaki MA. Biological activities of the crude skin toxin of the Suez Gulf oriental catfish (*Plotosus lineatus*) and its antitumor effect in vivo (mice). *J Nat Toxins*. 2002. Dec; 11(4):283-95.
47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976. 72: 248-254.

48. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. v.227, p.680-685.
49. Sirois MG, Jancar S, Braquet P, Plante GE, Sirois P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins*. 1988. Nov;36(5):631-44.
50. Lomonte B, Lungren J, Johansson B, Bagge U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle; an intravital. *Toxicon* 1994. 32, 41-55.
51. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A*, 1979. 76:4350.
52. Junqueira MEP, Mondin AC, Lopes CAM, Lopes-Ferreira M. Electrophoretical characterization and induction of edema and nociception by the skin venom of the *Genidens Genidens* In: VII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia. VIII Symposium of the Pan American Society on Toxinology. , 2004. v.1. p.114 – 114
53. Collins SM, Vallance B, Barbara G, Borgaonkar M. Putative inflammatory and immunological mechanisms in functional bowel disorders. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 1999 Oct;13(3):429-36.
54. Gallin JI, Goldstein IM & Snyderman R. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York. 1992.

55. Paul WE. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven, New York, 1998.
56. Cid MC. New developments in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1996, 8:1.
57. Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte integrins. *FASEB J* 5:2292, 1991
Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994. 76:301.
58. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* , 1996, 272:60.
59. Keane MP, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4 Suppl):N13-26
60. Feng L. Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res*. 2000;21(2-3):203-10.
61. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*. 1997 Dec 1;139(5):1349-60.
62. Cid MC, Esparza J, Juan M, Miralles A, Ordi J, Vilella R, Urbano-Márquez A, Gayà A, Vives J, Yagüe J: Signaling through CD50 (ICAM-3) stimulates T lymphocyte binding to human umbilical vein endothelial cells and extracellular matrix proteins via an increase in β 1 and β 2 integrin function. *Eur J Immunol* 1994, 24:1377.

63. Bianchi E, Bender JR, Blasi F, Pardi R. Through and beyond the way: Late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol Today* 1997, 18:586.
64. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994 Mar 24;368(6469):339-42.
65. Issekutz TB. In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J Immunol*. 1995 Jun 15;154(12):6533-40.
66. Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998 392:565-568.
67. Kuschert GSV, Coulin F, Power CA, et al. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*. 1999, 38:12959-12968.
68. Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today*. 1993, 14:500-505.
69. Jansen JH, Kluin-Nelemans JC, Van Damme J, Wientjens GJ, Willemze R, Fibbe WE: Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, 1992, 175: 1151-1154.