JULIANA MOZER SCIANI

ESTUDOS TOXINOLÓGICOS DO OURIÇO-DO-MAR
ECHINOMETRA LUCUNTER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

JULIANA MOZER SCIANI

ESTUDOS TOXINOLÓGICOS DO OURIÇO-DO-MAR
ECHINOMETRA LUCUNTER

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientação: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sciani, Juliana Mozer.

Estudos toxinológicos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* /
Juliana Mozer Sciani. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica animal.

Versão do título para o inglês: Toxinologic studies about *Echinometra
lucunter* sea urchin.

1. Bioquímica animal 2. *Echinoidea* 3. Biologia celular
4. Enzimologia 5. Toxinas 6. Cromatografia líquida de alta eficiência
I. Pimenta, Prof. Dr. Daniel Carvalho II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0105/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):   Juliana Mozer Sciani.

Título da Tese: Estudos toxinológicos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.

Orientador(a):   Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

(   ) Aprovado(a)

(   ) Reprovado(a)

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
                                 Nome: .....
                                 Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização bioquímica de peptídeos e proteínas de *Echinometra lucunter* monitorado por efeito biológico", protocolo nº438/07, sob a responsabilidade de Daniel Carvalho Pimenta e Juliana Mozer Sciani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/02/2008.

A CEUAIB autorizou as mudanças solicitadas pelo pesquisador, ou seja, alteração no prazo de vigência.

Vigência do Projeto: 02/2008 – 02/2012	Nº de animais/espécie	ADITIVO
Bioquímica e Biofísica	36 camundongos Swiss Machos	316 camundongos Swiss
	10 ratos Wistar Machos	114 ratos Wistar
	15 cobaios Fêmeas	

São Paulo, 13 de maio de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2163 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Isolamento e caracterização bioquímica de moléculas de *Echinometra lucunter* monitorado por efeito biológico", **protocolo nº 856/11**, sob a responsabilidade de Daniel Carvalho Pimenta e Juliana Mozer Sciani – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/09/2011.

We certify that the research entitled "Isolation and biochemical characterization of molecules from *Echinometra lucunter*, monitored by biological effects", **protocol number 856/11**, under the responsibility of Daniel Carvalho Pimenta and Juliana Mozer Sciani – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research – is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 08/09/2011.

Vigência do Projeto: 09/2011 - 09/2012	Nº de animais/espécie
Laboratório de Bioquímica e Biofísica	182 camundongos Swiss (M) 84 ratos Wistar (M)

São Paulo, 08 de setembro de 2011.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família pelo apoio em todas as etapas e dificuldades enfrentadas, em especial ao Eduardo, que além disso tudo auxiliou nas coletas.

Ao meu orientador, Daniel, pela oportunidade e pelo companheirismo ao longo desses anos.

A todos os meus colaboradores: Marta Antoniazzi, Carlos Jared e Adriana Neves, pelos experimentos de microscopia; Luis Roberto Gonçalves e Bianca Zychar, pelos experimentos de inflamação, Catarina Teixeira e Marlos Cortez, pelos experimentos de desgranulação de mastócitos; Renata Giorgi e Thiago Nogueira, pelos experimentos de hipernocicepção.

Ao CEBIMar, pelo apoio dado a coleta de animais e infra-estrutura, quando necessário.

Ao IBAMA, pela autorização na coleta dos ouriços.

À FAPESP e CNPq, pelo financiamento do trabalho.

RESUMO

SCIANI, J. M. **Estudos toxinológicos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter***. 2012. 146 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) é o ouriço-do-mar mais conhecido da costa brasileira, responsável por cerca de 50% dos acidentes com animais marinhos. A injúria inicial causada pelos ouriços é a penetração dos espinhos na pele, seguida da retenção de seus fragmentos. Esses fragmentos causam reações inflamatórias e dor local, e ocasionalmente doença sistêmica, sintomas que eram atribuídos somente ao trauma mecânico. Acidentes após a ingestão de ovos de ouriços-do-mar também já foram descritos. O objetivo desse trabalho foi verificar a presença de toxinas nos espinhos e no líquido celômico perivisceral do ouriço-do-mar *E. lucunter* do litoral de São Paulo, isolar e caracterizar essas moléculas e avaliar a correlação histológica entre as toxinas presentes e uma possível estrutura secretora. O líquido celômico e um extrato aquoso de espinhos de *E. lucunter* foram fracionados e testados em modelos de microcirculação do músculo cremaster, edema de pata, desgranulação de mastócitos peritoneais e teste de hipernocicepção. Ainda foram feitos testes de atividade hemorrágica e hemolítica. Aquelas frações que apresentaram atividade foram fracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência, procedimento repetido até que moléculas puras fossem obtidas e caracterizadas. Ainda foram feitas análises histológicas do espinho e estudos de atividade enzimática do extrato de espinhos. A partir do líquido celômico foram identificados efeitos pró-inflamatórios, de alterações na microcirculação, edematogênicos, nociceptivos e de desgranulação de mastócitos, que puderam ser atribuídos a um peptídeo. Outra molécula, isolada do extrato de espinho, foi capaz de provocar inflamação. Além disso, foi verificada a presença de atividade enzimática do tipo catepsina B/X no extrato de espinho. Na microscopia de luz, foram observadas células em estrutura radial, em meio de uma porção calcificada, além de estruturas em formas de grânulos, com conteúdo protéico. Análises por microscopia eletrônica mostraram células contendo grânulos eletrodensos, típicos de células secretoras. Com esses resultados, foi possível concluir que o espinho e o líquido celômico do ouriço-do-mar *E. lucunter* possuem toxinas que causam inflamação e dor, que vão além da simples penetração física do espinho no tecido. Além disso, o espinho possui uma estrutura histológica organizada, com células granulosas dispostas em torno de uma estrutura calcificada, indicando a presença de uma estrutura secretora de toxinas, na qual a presença de

uma cisteíno peptidase pode indicar a existência de um mecanismo de reparação dessa estrutura, quando danificada.

Palavras-chave: Ouriço-do-mar. *Echinometra lucunter*. Toxinas. Inflamação. Catepsinas. Células granulares.

ABSTRACT

SCIANI, J. M. **Toxinologic studies about *Echinometra lucunter* sea urchin**. 2012. 146 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) is the most spread the sea urchin of the Brazilian shore line and it is responsible for circa 50% of all marine animals accidents. Initial sea urchin injury is caused by the spine penetration, followed by its fragmentation under the skin. These fragments can cause local pain and inflammatory reactions, initially attributed to the mechanical trauma of the spines penetration, and occasionally systemic disorders. Few accidents were reported after the ingestion of raw sea urchin. The aim of this work was to assess the presence of toxins in the spines and perivisceral celomic fluid of *E. lucunter* sea urchin from São Paulo shore line, through the biological driven isolation and biochemical characterization of the toxins. The celomic fluid and spines were extracted and fractionated. The fractions were tested for biological activities in the cremaster muscle, paw edema, peritoneal mastocyte degranulation and paw pressure test. Moreover, hemorrhagic and hemolytic tests were also performed. The active fractions were further purified by high performance liquid chromatography, and this procedure was repeated until pure molecules were obtained, which were then characterized. In order to assess the possible urchin cellular role of in the spine regeneration process and the presence of a toxin secretory structure, histological analyses were performed. Moreover, enzymatic assays were conducted. From the celomic fluid, proinflammatory, edematogenic, mast cell degranulation and nociceptive effects could be identified that were correlated to a peptide. Another molecule, yet to be characterized that was isolated from spines, was able to cause inflammation. Moreover, a cathepsin B/X activity could also be identified in the aqueous spine extract. Under light microscopy, radial distributed cells could be observed embedded in a calcified matrix, as well as granulous cells displaying proteic contents. Electron microscopy analysis showed cells containing electrodenses granules, typical of secretory cells. With these results, it was possible to conclude that the spine and the celomic fluid of *E. lucunter* do contain toxins that are able to cause inflammation and pain, that prolong the spine puncturing event itself. Furthermore, the spine possesses an organized histological structure that contains granulous cells distributed around a calcified matrix, indicating that there might be a toxin secretory structure, in which a cysteine peptidase would indicate the presence of a mechanism of tissue remodeling.

Keywords: Sea urchin. *Echinometra lucunter*. Toxins. Inflammation. Cathepsins. Granular cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia do ouriço-do-mar.....	21
Figura 2 - Ouriço-do-mar da espécie <i>Echinometra lucunter</i>	23
Figura 3 – Fluxograma da metodologia empregada.....	42
Figura 4 – Amostras de pele de camundongos, injetados com líquido celômico de <i>E. lucunter</i>	43
Figura 5 – Número de células da microcirculação do músculo cremaster de camundongo após 1, 2 e 4 horas da aplicação das frações F25 e F75 do líquido celômico de <i>E. lucunter</i>	45
Figura 6 – Perfil cromatográfico da F25 do líquido celômico de <i>E. lucunter</i> , em coluna C18, $\lambda=214$ nm.....	46
Figura 7 – Número de células da microcirculação do músculo cremaster de camundongo após 2 e 24 horas da aplicação das frações do p10.....	47
Figura 8 – Perfil cromatográfico da F25 do líquido celômico de <i>E. lucunter</i> , indicando o p10, que causou atividade pró-inflamatória.....	48
Figura 9 – Purificação do p10, em coluna C18 core-shell, $\lambda=214$ nm, mostrando o pico ativo, p10B.....	48
Figura 10 – Edema de pata de camundongo causado pela injeção de p10B do líquido celômico de <i>E. lucunter</i>	49
Figura 11 – Valores de limiar de dor, em gramas, após 1, 2 e 4 horas da injeção do p10B da F25 do líquido celômico de <i>E. lucunter</i>	49
Figura 12 – Fotomicrografia do peritônio de camundongo, contendo mastócitos aderidos (seta), após a injeção de p10B.....	50
Figura 13 – Porcentagem de mastócitos desgranulados em peritônio de camundongos após a injeção de p10B.....	51
Figura 14 – Porcentagem de desgranulação de mastócitos com o aumento da concentração de p10B, em 30 minutos.....	52
Figura 15 – Porcentagem de edema de pata de camundongo causado pela injeção do p10B, em animais previamente tratados com cromoglicato.....	52
Figura 16 – Espectro de massas do p10B, analisado por ESI-IT-ToF.....	53

Figura 17 - Padrão de fragmentação dos íons precursores do p10B, obtidos após a colisão por gás argônio.....	54
Figura 18 - Espectro deconvoluído teórico e experimental do p10B.....	55
Figura 19 – Amostras de pele de camundongos injetados com extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	57
Figura 20 – Contagem de células da microcirculação após 2, 4, 24 e 48 horas da aplicação de extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	58
Figura 21 – Porcentagem de edema de pata de camundongo após a injeção de extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	59
Figura 22 – Valores de limiar de dor, em gramas, após 1, 2 e 4 horas da injeção do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	60
Figura 23 – Análise da microcirculação após 2 horas da injeção das frações F25 e F50 do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	61
Figura 24 – Perfil cromatográfico da F25 do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	62
Figura 25 – Contagem de células da microcirculação após a aplicação do p3, isolado do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	62
Figura 26 – Perfil cromatográfico da F25 do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i> , indicando o pico 3, capaz de induzir resposta inflamatória.	63
Figura 27 – Cromatograma da re-purificação do p3.....	64
Figura 28 – Contagem de células da microcirculação após a aplicação do p3E, isolado do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	64
Figura 29 – Porcentagem de edema com a injeção do p3E.....	65
Figura 30 – Valores de limiar de dor, em gramas, 1, 2, 4 e 8 horas após a injeção de p3E, isolado do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i>	65
Figura 31 - Análise do p3E em um detector <i>photo diode array</i>	66
Figura 32 – Análise por espectrometria de massas (ESI-IT-ToF) do p3E, em um <i>scan</i> de 50 a 2000 m/z.....	67
Figura 33 – Fragmentação induzida por colisão por argônio do íon 599,3409 m/z.....	67
Figura 34 – Análise da fórmula molecular do p3E, do extrato aquoso de espinho, causador do efeito pró-inflamatório.....	68
Figura 35 – Curva de pH do extrato aquoso de espinho de <i>E. lucunter</i> com o substrato Z-R-MCA.....	69

Figura 36 - Valores de velocidade por concentração do substrato Z-R-MCA incubado com o extrato aquoso de espinho ativado por DTT.....	70
Figura 37 – Velocidade por concentração do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH incubado com o extrato aquoso de espinho ativado por DTT.....	71
Figura 38 – Velocidade de hidrólise de Abz-GIVRAK(Dnp)-OH incubado com extrato aquoso espinho, inibido por E-64.....	72
Figura 39 – Análise do produto da hidrólise do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH pelo extrato aquoso do espinho de <i>E. lucunter</i>	73
Figura 40 – SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> do extrato aquoso de espinho incubado com anticorpos anti-catepsina B e K.....	74
Figura 41 – Corte transversal do espinho, mostrando positividade à anti-catepsina B.....	74
Figura 42 – Fotografia da ponta espinho de <i>E. lucunter</i> regenerada.....	75
Figura 43 – Fotografia do espinho, mostrando a estrutura externa.....	76
Figura 44 - Microscopia eletrônica de varredura do meio do espinho.....	76
Figura 45 – Microscopia eletrônica de varredura da parte externa do espinho.....	76
Figura 46 - Cortes transversais da ponta e da base do espinho após a descalcificação para verificar a presença de células.....	78
Figura 47 – Microscopia eletrônica, mostrando células ricas em grânulos.....	79
Figura 48 - Estrutura localizada na periferia do espinho, correspondentes aos sulcos longitudinais.....	80
Figura 49 - Corte do meio do espinho mostrando positividade ao colágeno.....	80
Quadro 1 – Resumo dos resultados referentes ao líquido celômico.....	89
Quadro 2 – Resumo dos resultados referentes ao extrato aquoso de espinho.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de aminoácidos do p10B, do líquido celômico de <i>E. lucunter</i>	56
Tabela 2 – Valores de Vmax e Km do extrato aquoso de espinho sobre o substrato Z-L-Arg-MCA.....	70
Tabela 3 – Valores de Vmax e Km do extrato aquoso de espinho sobre o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz - *o*-aminobenzoic acid

ACN – acetonitrila

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

C4 – butil

C8 – octil

C18 – octadecil

CN- ciano

Dnp - *2,4-dinitrophenol*

DTT - *Dithiothreitol*

EDDnp - *N*-(*2,4-dinitrophenyl*)-ethylenediamine

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*

ESI – *electrospray*

FITC - *fluorescein isothiocyanate*

HCl – ácido clorídrico

IT-ToF – *ion trap – time of flight*

kDa – kilodalton

MYP – *major yolk protein*

NC-IUBMB - *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

PAS – *periodic acid - Schiff*

PH- fenil

MeOH – metanol

NaCl – cloreto de sódio

PAGE – *poliacrilamida gel electrophoresis*

PBS – *Phosphate buffered saline*

PDA – *photo diode array*

PMSF - *phenylmethanesulfonylfluoride*

PTH – *phenylthiohydantoin*

RP-HPLC – *reversed phase – high performance liquid chromatography*

SDS - *sodium dodecyl sulfate*

SPE – *solid phase extraction*

TBS-T – *tris buffered saline e tween 20*

TEA - tiietanolainina

TFA – *trifluoroacetic acid*

Z-R-MCA - Z-L-arginina 7-amido-4-metilcumarina

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Nome	3 letras	1 letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Fenilalanina	Phe	F
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Espinhos de ouriço-do-mar	20
1.2 Líquido celômico de ouriço-do-mar	22
1.3 <i>Echinometra lucunter</i>	23
1.4 Acidentes por contato com espinhos de <i>Echinometra lucunter</i>	24
1.5 Acidentes por consumo de ovas de <i>Echinometra lucunter</i>	25
1.6 Inflamação e nocicepção	26
1.7 Enzimas proteolíticas	28
1.7.1 Catepsinas	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Obtenção das amostras	32
3.2 Fracionamento dos extratos	32
3.3 Purificação das frações	33
3.4 Caracterização bioquímica	34
3.4.1 Espectrometria de massas	34
3.4.2 Análise de aminoácidos	34
3.4.3 SDS-PAGE e Western Blotting	35
3.5 Ensaio biológicos	35
3.5.1 Microcirculação do músculo cremaster	36
3.5.2 Edema de pata	36
3.5.3 Hipernocicepção	37
3.5.4 Desgranulação de mastócitos	37
3.5.5 Hemorragia	38
3.5.6 Atividade hemolítica	38
3.5.7 Atividade enzimática	38
3.6 Morfologia dos espinhos	40
3.6.1 Processamento das amostras	40
3.6.2 Microscopia de luz	40
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão	40
3.6.4 Microscopia eletrônica de varredura	41

3.6.5 Imunohistoquímica	41
3.7 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Líquido celômico perivisceral	43
4.1.1 Hemorragia	43
4.1.2 Atividade hemolítica	43
4.1.3 Avaliação da atividade pró-inflamatória	43
4.1.4 Desgranulação de mastócitos	50
4.1.5 Caracterização bioquímica do p10B	53
4.2 Extrato aquoso do espinho	56
4.2.1 Hemorragia	56
4.2.2 Atividade hemolítica	57
4.2.3 Atividade pró-inflamatória do extrato bruto	57
4.2.4 Atividade pró-inflamatória das frações	60
4.2.5 Caracterização bioquímica do p3E	66
4.2.6 Atividade enzimática	69
4.3 Morfologia dos espinhos	75
5 DISCUSSÃO	81
5.1 Peptídeo desgranulador de mastócitos, isolado do líquido celômico de <i>E. lucunter</i> ..	82
5.2 Presença de toxinas pró-inflamatórias no espinho de <i>E. lucunter</i>	84
5.3 Atividade enzimática de catepsina B /ou X no espinho de <i>E. lucunter</i>	85
5.3 Morfologia dos espinhos de <i>E. lucunter</i>	87
6 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE A - Artigos publicados em periódicos, no tema da tese	99
APÊNDICE B - Artigos submetidos para periódicos, no tema da tese	104
APÊNDICE C - Matéria de revista	105
APÊNDICE D - Artigos publicados em periódicos, em colaboração	110

1 INTRODUÇÃO

Os ouriços-do-mar são animais invertebrados pertencentes ao filo *Echinodermata* e à classe *Echinoidea*. Os equinodermos possuem simetria radial e um celoma dividido em 3 partes: sistema ambulacrário (sistema em tubos que se manifesta na superfície externa do corpo na forma de pés ambulacrários), sistema peri-hemal (conjunto de tubos internos que incluem cordões de tecido) e celoma perivisceral (cheio de líquido, que circunda os órgãos internos). Todo o transporte de gases e excreção é feito pelo líquido celômico. Esse líquido também contém células que fagocitam substâncias estranhas (ROCHA, 2006; STORER et al., 2007).

A classe *Echinoidea* compreende cerca de 900 espécies, sendo 105 presentes no Brasil (HENDLER et al., 1995). A figura 1 mostra um esquema dos órgãos internos e a parte externa de um ouriço-do-mar. O caráter mais evidente dessa classe é a presença de uma carapaça rígida, com 7 a 8 cm de diâmetro, que envolve as vísceras, formada de placas calcárias fusionadas na qual os espinhos estão inseridos por meio de um tubérculo (DINCER; CAKLI, 2007). Na porção inferior, no centro da carapaça, há a boca, onde são visualizados 5 dentes, suportados por uma estrutura complexa, dentro da carapaça, chamada de lanterna de Aristóteles. Em torno da boca encontra-se uma membrana formada pela parede do corpo, denominada perístoma. Sobre o perístoma, um círculo de pedicelárias circunda a boca. As pedicelárias são estruturas epidérmicas em forma de pinça, em pedúnculos longos e flexíveis, que têm a função de defesa, limpeza e apreensão de alimentos (ROCHA, 2006; STORER et al., 2007). Esses animais podem viver até 100 anos (EBERT; SOUTHON, 2003).

1.1 Espinhos de ouriço-do-mar

Os espinhos de ouriço-do-mar possuem a função de defesa, na proteção do corpo do animal contra predadores e partículas em suspensão, além de estarem envolvidos com a locomoção. Eles podem ser ocos ou maciços, dependendo da espécie (DUBOIS; AMEYE, 2001; MOREAUX et al., 2010).

Figura 1 – Anatomia do ouriço-do-mar.

Fonte: Rocha (2006).

Os espinhos são compostos por um elemento esquelético, inserido na derme e recoberto por uma epiderme, que circunda todo o corpo. O chamado esqueleto consiste de uma rede tridimensional de trabéculas mineralizadas, o esteroma, que delimita uma rede orgânica interna e complementar, preenchida por tecido conjuntivo, o estroma. O esteroma (a fase mineral) consiste em carbonato de cálcio e/ou carbonato de magnésio com uma morfologia de esponja, que se forma radialmente no eixo do espinho. O estroma contém 0,1% de material orgânico: matriz extracelular, células, incluindo células esquelotogênicas, conhecidas como esclerócitos, fagócitos e células de diferentes tipos contendo esférulas (CHAVE, 1952; DUBOIS; AMEYE, 2001; WEINER, 1985; WEINER; ADDADI; WAGNER, 2000). Existem outros tipos celulares que parecem ser celomócitos migratórios ou compartilham um ancestral comum com essas células (DUBOIS; GHYOOT, 1995; HEATFIELD; TRAVIS 1975).

Os espinhos são móveis, uma característica dos ouriços-do-mar, e arranjam-se mais ou menos simetricamente no corpo. A maioria dos ouriços, como é o caso do *Echinometra lucunter*, possui espinhos longos, chamados de primários, e curtos, os secundários, que se distribuem igualmente sobre a superfície corporal (RUPPERT; BARNES, 1996). A base do espinho é articulada ao corpo, por meio de fibras colágenas e miócitos, inseridos em um tendão (CASTILLO et al., 1995).

1.2 Líquido celômico de ouriço-do-mar

O líquido celômico é um fluido que circunda os órgãos internos do ouriço e tem a função de transporte de gases e excreção. Esse líquido contém células capazes de fagocitar substâncias estranhas (ROCHA, 2006; STORER et al., 2007). Essa função se torna extremamente importante, já que equinodermos estão constantemente expostos a altas concentrações de bactérias, vírus e fungos, que podem ser danosos ao animal. A sobrevivência desses animais depende de mecanismos antimicrobianos eficientes, que protejam os animais de infecções microbianas (HAUG et al., 2002).

A imunidade dos equinodermos não é específica, ou seja, não é mediada por anticorpos, mas sim baseada na ativação de células efectoras do sistema imune, os celomócitos (DHEILLY et al., 2011; GROSS et al., 1999). Os celomócitos estão localizados na cavidade celômica, livres no líquido celômico, em uma concentração aproximada de $7,5 \times 10^6$ células por mL de fluido (PANCER, 2000). Eles consistem em uma população de células similares aos macrófagos de vertebrados. A ativação dessas células leva ao aumento de motilidade, fagocitose, encapsulação e secreção ou desgranulação de fatores antibacterianos e tóxicos (LIN; ZHANG; BECK, 2001; SMITH; DAVIDSON, 1994). Dessa forma, os ouriços eliminam efetivamente as bactérias da cavidade celômica (JOHNSON, 1969; SMITH; BRITTEN; DAVIDSON, 1995). Em casos de injúria do animal, essas células se acumulam no sítio danificado e formam coágulos (PANCER, 2000).

O líquido celômico de equinóides contém quatro diferentes tipos de celomócitos: 76% amebócitos, 8% pigmentados, 4% esferulócitos não coloridos e 12% células vibráteis (ARIZZA et al., 2007). A espécie *E. lucunter* possui todos esses tipos de celomócitos (FARIA; SILVA, 2008).

Já foram descritas algumas proteínas dos celomócitos de diferentes espécies de ouriços-do-mar, que participam do sistema imune (DHEILLY et al., 2009; GHOSH et al., 2010) e do sistema complemento, sendo uma delas, homóloga ao fator B e outra homóloga às proteínas do complemento C3/C4/C5 de vertebrados (AL-SHARIF et al., 1998; SMITH et al., 1996, 1998). Também já foram descritos peptídeos antimicrobianos em celomócitos do ouriço *S. droebachiensis* (LI et al., 2010) e *P. lividus* (SCHILLACI et al., 2009).

1.3 *Echinometra lucunter*

A espécie *E. lucunter*, mostrada da figura 2, é o ouriço-do-mar mais conhecido na costa brasileira, chamado popularmente de pinaúna ou pindá (CARNEIRO; CERQUEIRA, 2008). Ocorre em águas tropicais e temperadas do oceano Atlântico, geralmente entre o limite da baixa-mar até 45 metros de profundidade (TAVARES, 2004). Ocorrem em densidades bastante elevadas nos costões rochosos ao longo da costa brasileira, principalmente no sul e sudeste. Nas Américas, se distribui desde a Carolina do Norte (Estados Unidos) até Florianópolis (Brasil), sendo registrada também na costa oeste africana (HADEL et al., 1999; MCPHERSON, 1969; TAVARES, 2004). Essa espécie de ouriço possui intenso potencial bioerosivo, e essa característica lhe confere grande importância ecológica, pois modifica a arquitetura do ecossistema e a estrutura da comunidade residente (SANTOS; FLAMMANG, 2005; TAVARES, 2004). São capazes de aumentar a profundidade de depressões ou mesmo escavar buracos em rochas e outros materiais firmes. Esse comportamento perfurador parece ser uma adaptação para compensar a ação das ondas, já que o local mais comum de encontrar esses animais é o costão rochoso (MARIANTE et al., 2009; RUPPERT; BARNES, 1996).

Figura 2 - Ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*, coletado em São Sebastião, São Paulo.

Fonte: Sciani (2012)

Esses *Echinoidea* são herbívoros, exercendo significativo controle na população de várias espécies de algas (HOPP; HERDING, 1996). O hábito alimentar da espécie foi descrito

por vários autores, como Lawrence (1975) e McClanahan e Muthiga (2007), que notaram não haver uma uniformidade no tipo de alimentação da espécie, e que esta pode ter variações entre habitats. *E. lucunter* é essencialmente herbívoro, alimentando-se de uma variedade de algas e macrófitas, sendo considerado também como onívoro quando se alimenta de animais, tais como esponjas, microcrustáceos e corais (ERICKSON et al., 2006).

A utilização das gônadas desse espécie de ouriço como alimento e da carapaça e espinhos como artesanato foi documentada no nordeste do Brasil por Carneiro e Cerqueira (2008).

1.4 Acidentes por contato com espinhos de *Echinometra lucunter*

Os ouriços da espécie *E. lucunter* provocam vários acidentes traumáticos no Brasil, sendo responsáveis por cerca de 50% dos acidentes atendidos em Pronto-Socorros nas cidades litorâneas. Ainda não se tem certeza da presença de veneno (toxinas) nas pedicelárias dessa espécie, mas os maiores problemas relatados decorrem da penetração e da dificuldade de extração dos espinhos, em Pronto-Socorros (HADDAD JR, 2003).

A primeira injúria causada pelos ouriços é a penetração dos espinhos na pele. As áreas mais comprometidas são os pés e os tornozelos, quando o acidentado pisa em um ouriço, ou as mãos, quando o acidentado manipula o animal ou se defende no costão rochoso da ação das ondas do mar (ROSSETO; MORA; HADDAD JR, 2006).

A penetração do espinho causa dor intensa e imediata, reação inflamatória local, sangramento, eritema, edema e mialgia local. Se o espinho entra em alguma articulação, pode ocorrer sinovite granulomatosa, que pode resultar em uma artrite (BADEN, 1987; DE LA TORRE; TORIBIO, 2001; GUYOT-DROUOT et al., 2000; McWILLIAM et al., 1991; WADA et al., 2008). Reações sistêmicas ocorrem quando há entrada de toxinas após a penetração de muitos espinhos, e já foi relatado para muitas espécies de ouriço. Esses sintomas incluem parestesia, dor radiada, hipotensão, fraqueza muscular e dispnéia (ROSSETO; MORA; HADDAD JR, 2006). Além dos efeitos do próprio espinho, é frequente ocorrer infecções por bactérias presentes na água do mar (KABIGTING et al., 2009). Embora esses sintomas sejam relatados no acidente por *E. lucunter*, não havia descrição de toxinas no espinho dessa espécie de ouriço.

Há dois tipos de reação à penetração de espinhos na pele: imediata e tardia. As reações tardias podem ser nodulares ou difusas, e são designadas como granulomas de ouriço-do-mar. (BADEN, 1987; ROCHA; FRAGA, 1962; WARIN, 1977).

O granuloma ocorre após a quebra do espinho quando penetra na pele, e um fragmento fica retido (ROSSETO; MORA; HADDAD JR, 2006). O granuloma causado por ouriço é uma reação do tipo tardia como lesão de pele granulomatosa crônica. A patogênese ainda não está esclarecida, mas é considerada uma reação a um corpo estranho ou uma resposta não convencional a um antígeno não identificado. Análises histológicas de granulomas formados após a penetração dos espinhos de *Paracentrotus lividus* mostram que na maioria dos casos ocorre uma reação granulomatosa. A presença de necrose e microabscessos também foram frequentemente observadas (DE LA TORRE; TORIBIO, 2001).

1.5 Acidentes por consumo de ovas de *Echinometra lucunter*

Dos membros pertencentes à classe dos equinodermos, os ouriços-do-mar (*Echinoidea*) e os pepinos-do-mar (*Holothuroidea*) são os animais de maior importância comercial, e estão sendo objetos de extensa exploração pesqueira. No caso dos ouriços, as gônadas, tanto de machos quanto de fêmeas, são a parte mais consumida, e são servidas frescas, referidas como “ovas de ouriço” (KELLY, 2005).

Desde a Antiguidade (540 a.C.) os ouriços vêm sendo consumidos pelos gregos (CASO, 1978). Durante muitos séculos a utilização deste recurso se dava de maneira artesanal, principalmente na Ásia, onde a maricultura é bem difundida (CUEVAS, 2005). No final do século XX (década de 1970), o ouriço passou a ser mais apreciado, seu valor comercial aumentou e a pesca expandiu-se mundialmente. Suas gônadas são apreciadas como *delicatesse* principalmente na Europa e na costa mediterrânea (TAVARES, 2004). Nos últimos 20 anos a comercialização e exportação de equinodermos aumentaram em países como Irlanda, Estados Unidos, Canadá e Chile (HAGEN, 1996). As gônadas dos ouriços e a musculatura da parede do corpo das holotúrias são produtos exportados especialmente para os países da Ásia e da Europa sendo os seus principais consumidores o Japão e a França.

O Japão é o maior importador e consumidor de ovas de ouriços do mundo, onde são principalmente usadas como ingrediente de sushi. Esse aumento na demanda pelas ovas na culinária faz com que haja uma superexploração de ouriços nativos. Essa exploração ainda é maior para garantir a qualidade do alimento, que é fortemente influenciada pela aparência, cor, textura e sabor, e ainda é necessário que o animal se encontre em certo estágio de maturidade sexual e em determinadas épocas do ano (PHILLIPS et al., 2010).

No Brasil, a pesca de equinodermos é pouco conhecida pelo público em geral, ocorrendo sem nenhum registro de desembarque (BATTAGLENE, 1999). O *E. lucunter*

apresenta ser um potencial recurso pesqueiro, pois pode ser utilizado na alimentação, no artesanato (com seus espinhos e carapaça), além de estar presente na medicina popular para a cura de algumas doenças. Casos de acidentes após o consumo de ovas de ouriço já foram relatados entre comunidades pesqueiras (ALVES; DIAS, 2010).

Há relatos de alguns casos de pessoas que desenvolveram reações de anafilaxia após o consumo de ovas de ouriço (HICKEY, 2007; YAMASAKI et al., 2010). Unuma et al. (2009) descreveram uma glicoproteína de 170 kDa, MYP (*major yolk protein*), que é encontrada nas ovas e também no líquido celômico de ouriços machos e fêmeas.

1.6 Inflamação e nocicepção

Após a injúria de um tecido, seja por microrganismos, queimaduras, substâncias químicas ou entrada mecânica de algum material, inicia-se um conjunto de alterações bioquímicas, vasculares e celulares, denominado reação inflamatória. Essa reação propicia o acúmulo e a ativação de células fagocitárias no local da lesão, que contribui para a eliminação de agentes estranhos, e também é necessária para a regeneração do tecido (JANCAR, 2009).

O processo inflamatório é dividido em fases aguda e crônica, cada uma sendo caracterizadas por eventos celulares (recrutamento de neutrófilos, granulócitos e macrófagos) e bioquímicos (síntese e liberação de mediadores) (LINLEY et al., 2010; MALING et al., 1974).

Mediadores inflamatórios são produzidos em consequência da ativação de células presentes no local da inflamação, por estimulação de sistemas plasmáticos. Exemplos de mediadores são bradicinina, histamina, serotonina, substância P, ATP, prostaglandinas, citocinas, etc (LINLEY et al., 2010). Os mastócitos, por exemplo, quando ativados, desgranulam e liberam histamina, PAF, leucotrienos e outras moléculas pró-inflamatórias que causam adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares (GRANGER; KUBES, 1994).

A liberação de mediadores inflamatórios também causa sensibilização de nociceptores, por meio da ligação das moléculas em receptores específicos do nociceptor. A sensibilização de nociceptores sensoriais primários é referida como hiperalgesia ou alodídia (dor devido a um estímulo que geralmente não causa dor) (LINLEY et al., 2010; VERRI et al., 2006). A hiperalgesia é a dor aumentada a um estímulo normalmente doloroso, que pode ser térmico, mecânico ou químico. O aumento da sensação de dor ocorre devido à diminuição do limiar de disparo do potencial de ação na membrana plasmática do nervo, que leva a sensação de dor no indivíduo (LINLEY et al., 2010). Assim, nessa situação, um estímulo de menor intensidade já

é capaz de sensibilizar o nervo e causar dor. A hiperalgesia pode ser desenvolvida após certas condições fisiopatológicas, como a inflamação (LINLEY et al., 2010).

O termo hipernocicepção é utilizado para designar os dois tipos de sensibilização de nociceptores, hiperalgesia e alodínia (VERRI et al., 2006).

Quando há a liberação de mediadores inflamatórios no espaço extracelular de um tecido danificado, a inflamação inicia-se, na microcirculação. Esses mediadores causam alteração no calibre das arteríolas, seja contração ou relaxamento da musculatura lisa que envolve os vasos, com consequente alteração no fluxo sanguíneo local. Quando há vasodilatação, há maior aporte de sangue na região inflamada, possibilitando a chegada de uma maior quantidade de células imunes no local. Nesse momento, ocorre rubor e calor, sinais típicos da inflamação (JANCAR, 2009).

A vasodilatação também favorece o aumento da permeabilidade vascular, ocasionada pela ação de mediadores inflamatórios, aumentando o fluxo de plasma dos espaços intra para o extravascular, causando edema. O acúmulo de proteínas plasmáticas no tecido passa então a exercer uma pressão oncótica que, mesmo após o fechamento das junções endoteliais, pode continuar ocorrendo extravasamento de líquido para o tecido. Esse acúmulo de líquido nos tecidos pode pressionar as terminações nervosas e causar dor. No entanto, mediadores inflamatórios também podem se ligar a receptores específicos localizados nos nociceptores das fibras sensoriais, causando dor (JANCAR, 2009; LINLEY et al., 2010).

No local da inflamação podem ainda ocorrer rompimento dos vasos sanguíneos e hemorragia, por exemplo, quando há introdução de um espinho na pele. Em consequência disso, são produzidas substâncias biologicamente ativas, como a bradicinina e peptídeos derivados da ativação do sistema complemento (JANCAR, 2009).

Para que ocorra a regeneração do tecido, é necessária a transmigração de leucócitos para o espaço extravascular, em uma série complexa de eventos que agem em função do tempo e níveis de expressão de várias moléculas de adesão. O *rolling* de leucócitos na vênula pós-capilar, a adesão à parede do vaso sanguíneo e a transmigração dos leucócitos são passos essenciais nesse processo. Esses passos requerem moléculas de adesão, como selectinas e integrinas (SUMAGIN; SARELIUS, 2006).

O *rolling* de leucócitos pode ser descrito como uma interação adesiva de baixa afinidade entre leucócitos e o endotélio vascular, onde a força do fluxo sanguíneo atua sobre o leucócito para induzir um movimento rotacional. Leucócitos em *rolling* são definidos como células brancas que se movem ao longo dos vasos com uma velocidade menor que as células vermelhas (GRANGER; KUBES, 1994). Em um tecido inflamado, o *rolling* de leucócitos

leva a um estado estacionário em que leucócitos permanecem firmemente aderidos a superfície da célula endotelial, ao longo da vênula (GRANGER; KUBES, 1994).

Muitos agentes e condições que fazem a firme aderência de leucócitos nas vênulas pós-capilares também realizam o *rolling* de leucócitos. Esta associação indica que o *rolling* é um pré-requisito para a firme aderência dos leucócitos. O *rolling* leva a um contato entre os leucócitos e as células endoteliais, e esse processo permite que os leucócitos se tornem ativados por agentes expressos na superfície das células endoteliais ou por substâncias liberadas de células imediatamente fora dos vasos (GRANGER; KUBES, 1994).

Seguido do período de adesão estacionária, o leucócito pode deixar a vênula pós-capilar por pseudopodia e se deslocar para o espaço subendotelial e compartimentos intersticiais adjacentes. Esse evento complexo, que é frequentemente denominado extravasamento de leucócitos, migração ou diapedese, é dependente de um arranjo de processos celulares que incluem a expressão e ativação de moléculas de adesão, reorganização do citoesqueleto e alterações da permeabilidade das vênulas em consequência da abertura das junções entre as células endoteliais (GRANGER; KUBES, 1994; JANCAR, 2009).

A microscopia intravital possibilita a visualização e quantificação do número de leucócitos que aparecem no interstício vascular durante a reação inflamatória. Essa técnica tem sido usada para demonstrar uma variedade de agentes e condições experimentais que possibilitam a migração de leucócitos da vênula pós-capilar (GRANGER; KUBES, 1994).

1.7 Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas, ou peptidases, é um termo geral utilizado para descrever as hidrolases que atuam sobre proteínas. Essas enzimas podem ser endopeptidases, que atuam longe das extremidades da proteína ou do peptídeo, ou exopeptidases, que clivam próximo do N ou C-terminal (BARRET, 2001).

O sítio ativo de uma peptidase está frequentemente localizado em um sulco da superfície da enzima e a especificidade ao substrato é ditada pelas propriedades de ligação do sítio ativo da enzima ao substrato, além da ligação de regiões próximas ao sítio catalítico. O sítio catalítico é responsável pela hidrólise da ligação peptídica (BARRET, 2001).

As enzimas proteolíticas podem ser agrupadas de acordo com a natureza química do sítio catalítico. Hoje, há cinco tipos distintos reconhecidos de sítios, que classificam as enzimas em famílias: cisteíno, serino, aspártico, treonino e metalopeptidases (RAWLINGS et al., 2012).

1.7.1 Catepsinas

As catepsinas são enzimas que pertencem à família das cisteíno peptidases C1, também conhecida como família papaína. Essa família compreende um grande número de enzimas provenientes tanto de procariotos quanto de eucariotos (RAWLINGS et al., 2012).

Dois maiores grupos de catepsinas foram descritos e agrupados de acordo com a distribuição tecidual. Ao primeiro grupo pertencem as catepsinas amplamente expressas em vários tecidos (catepsinas B, C, F, H, L, O e X) e o segundo grupo consiste de enzimas com expressão restrita em certos tecidos (catepsinas J, K, S and W) (CHAPMAN; RIESE, SHI, 1997). As catepsinas ainda podem ser divididas em 3 subgrupos, baseado na sequência, homologia e *motifs* de aminoácidos específicos, como as catepsinas B-like, L-like e F-like (LECAILLE; KALETA; BRÖME, 2002).

As catepsinas constituem os maiores componentes do sistema proteolítico lisossomal, responsável pela degradação e *turnover* protéico, sendo importante na manutenção da homeostase nos organismos. A liberação de catepsinas lisossomais para fora da célula pode levar à degradação da matriz extracelular. Quando esse processo se torna patológico, contribui para o desenvolvimento de algumas doenças, como câncer, artrite, osteoporose, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e inflamação (BRIX et al., 2008).

Essas enzimas ainda estão envolvidas na digestão de proteínas de ovócitos e ovos fertilizados. Além disso, estão presentes em tecidos não-ovarianos de peixes, onde podem estar envolvidas no processo de degradação de proteínas celulares, como *post mortem*, desova, inanição, além de função bacteriana (MAGNADÓTTIR et al., 2004).

As catepsinas do tipo X (EC 3.4.18.1, nomenclatura de acordo com a NC-IUBMB) foi anteriormente descrita como carboxipeptidase LB, catepsina IV, catepsina B2, catepsina P, catepsina Y, catepsina Z, catepsina Z1, CTSZ g.p., carboxipeptidase tipo cisteína e carboxipeptidase B lisossomal. Essa enzima é uma carboxipeptidase, que degrada substratos preferencialmente de modo carboximonopectidase, ou seja, cliva o primeiro aminoácido da porção C-terminal do substrato. No entanto, foi observado que a catepsina X também cliva substratos contendo arginina na antepenúltima posição, atuando como carboxidipeptidase. Isso demonstra uma mudança entre atividade monopectidil e dipeptidilpeptidase, razão da qual foi nomeada anteriormente catepsina B2. Além disso, possui pouca ou nenhuma atividade endopeptidase (KLEMENČIČ et al., 2000; STACHOWIAK et al., 2004).

Catepsinas X e B (EC 3.4.22.1) compartilham várias características. A catepsina B hidrolisa substratos como dipeptidil carboxipeptidase e também possui uma significativa atividade endopeptidase (KLEMENČIČ et al., 2000; THERRIEN et al., 2001).

2 OBJETIVOS

Isolar e caracterizar moléculas bioativas contidas nos espinhos e no líquido celômico do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, encontrado em São Sebastião, litoral norte de São Paulo, e correlacioná-las com os acidentes e com a biologia e toxinologia do animal, além de analisar a estrutura e identificar componentes secretores dos espinhos.

2.1 Objetivos específicos

- a) obter e padronizar um extrato dos espinhos e puncionar o líquido celômico do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*;
- b) fracionar o extrato de espinhos e o líquido celômico visando à obtenção de moléculas puras com efeitos biológicos;
- c) estudar efeitos farmacológicos promovidos pelas moléculas extraídas;
- d) caracterizar a estrutura da molécula ativa nos modelos biológicos;
- e) obter cortes histológicos para microscopia de luz, eletrônica de transmissão e varredura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

Espécimes de ouriços do mar *E. lucunter* foram coletados em uma localidade do município de São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo (23°49'53'S; 45°31'18'O), sem distinção quanto a sexo, idade ou tamanho, sob licença permanente para coleta e transporte de material zoológico emitida pelo IBAMA (n° 13852-1). O líquido celômico e os espinhos dos animais foram retirados no local da coleta, armazenados e/ou diluídos na solução de armazenamento e transporte, ácido acético 0,05% e acetato de amônio 100 mM, respectivamente, e levados ao laboratório para posterior processamento e análise.

A retirada do líquido celômico dos animais foi realizada através da inserção de uma seringa cirúrgica estéril na membrana que circunda o aparato bucal do animal com subsequente aspiração de cerca de 4-5 mL por ouriço. As amostras provenientes de todos os animais foram agrupadas e imediatamente colocadas em um frasco contendo ácido acético (em uma concentração final de 0,05%), imerso em gelo. Essa amostra foi então centrifugada a 1248 x g por 10 minutos para separar o líquido dos componentes celulares. O sobrenadante foi submetido a um fracionamento para subsequente purificação.

Os espinhos foram retirados com o auxílio de uma tesoura e pinça, para que não houvesse danos em sua estrutura, e depois de retirados foram imediatamente colocados em um frasco contendo acetato de amônio 100 mM, imerso em gelo, para a extração de componentes presentes no espinho (extrato aquoso). Foram retirados cerca de 30 espinhos por animal. Alguns espinhos foram imersos em fixador Karnovsky, para posterior estudo morfológico (ver item 3.6). O extrato aquoso proveniente da imersão dos espinhos em acetato de amônio foi subsequentemente fracionado.

3.2 Fracionamento dos extratos

Tanto o líquido celômico quanto o extrato aquoso de espinho foram fracionados por extração em fase sólida (SPE), em cartuchos com resina C18, 55µm, 70Å, 5g/20mL (Strata®, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EUA). As amostras foram submetidas a gradientes escalonados de 0, 25, 50, 75 e 100% de acetonitrila (ACN) 90% em água contendo 0,1% de TFA. Por último foi feita uma eluição com metanol 100% (MeOH). Essas frações (F0, F25,

F50, F75, F100 e FMeOH) foram liofilizadas e ressuspensas em soluções apropriadas para as análises subsequentes.

3.3 Purificação das frações

Para a purificação das frações provenientes de extração em fase sólida foi usado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), (20A Prominence, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Inicialmente foram empregadas diferentes colunas cromatográficas e solventes, com o objetivo de se obter um perfil cromatográfico mais resolutivo, ou seja, aquele que apresentasse uma maior e mais homogênea distribuição de picos ao longo de um gradiente linear. As colunas testadas foram octadecil (C18), octil (C8), butil (C4), ciano (CN) e fenil (PH). O conteúdo eluído foi monitorado por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA, na faixa de 200 a 500 nm, para o qual foi escolhido o comprimento de onda mais adequado para o monitoramento durante a purificação.

O gradiente utilizado para a purificação das frações do líquido celômico foi 0 a 100% de B em 30 minutos, sendo o solvente A ácido trifluoroacético (TFA) / água (1:1000) e solvente B TFA / metanol (MeOH) / água (1:900:100), em fluxo constante de 1,7 mL/min, em uma coluna C18, 5 µm, 300 Å, 250 mm x 7,75 mm (ACE®) a 38 °C. Para a re-purificação, foi utilizada coluna C18 core-shell 2,6 µm, 100 Å, 100 x 4,6 mm (Kinetex®, Phenomenex Inc., EUA), com um fluxo de 1,2 mL/min a 38 °C, sendo o solvente A o mesmo utilizado anteriormente e o solvente B TFA / ACN / água (1:900:100).

Para a purificação das frações do extrato aquoso de espinho foi utilizado um gradiente de 0 a 80% de B em 20 minutos sendo o solvente A ácido trifluoroacético (TFA) / água (1:1000) e solvente B TFA / ACN / água (1:900:100), em fluxo constante de 1 mL/min, em uma coluna C18 (ACE® C18, 5 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm) a 38 °C. Para a re-purificação, foi utilizada uma coluna C18 com base de carbono 5 µm, 4,6 x 150 mm (Hypercarb®, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) em um método isocrático de 15 minutos em TFA/água (1:1000) a 4 °C.

3.4 Caracterização bioquímica

3.4.1 Espectrometria de massas

Análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biofísica, em um espectrômetro ESI-IT-ToF (Shimadzu Co., Japão) para determinação da massa molecular e fórmula molecular, a partir da análise dos fragmentos gerados pela colisão por gás argônio. As amostras, diluídas em 50% ACN em água, contendo 0,5% ácido fórmico, foram inseridas diretamente no espectrômetro por injeção manual, em um injetor Rheodyne, preferencialmente em modo positivo, a um fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, na mesma solução em que as amostras foram diluídas. A voltagem utilizada da interface foi 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,76 kV, com temperatura de 200 °C. A fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia. Os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z.

Para o sequenciamento ‘de novo’ de peptídeos, o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. O espectro gerado foi analisado pelo software Peaks Mass Spectrometry (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá). A sequência peptídica gerada foi comparada com um espectro teórico, obtido pelo Protein Prospector. A partir dessa sequência de aminoácidos, também foi feita uma busca em banco de dados Standard Protein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), em modo não redundante, sem filtro de taxonomia (ALTSCHUL et al., 1997).

O processamento dos dados para a obtenção da fórmula molecular foi feito pelo software Formula Predictor (Shimadzu Co., Japão).

3.4.2 Análise de aminoácidos

Para a análise de aminoácidos, a amostra foi adicionada a 200 μL de HCl 1M e fenol, em uma ampola. A ampola foi fechada, colocada na estufa a 110 °C por 10 horas e depois seca no dessecador. O conteúdo foi lavado com 100 μL de água ultrapura por 3 vezes. Após isso, a amostra foi lavada com uma solução de etanol, água ultrapura e TEA (2:2:1) e derivatizada por 15 minutos com uma solução de etanol, TEA, PTH e água ultrapura (7:1:1:1). O produto foi então analisado por HPLC, em coluna C18, e comparada com a análise por HPLC de um padrão de 18 aminoácidos.

3.4.3 SDS-PAGE e *Western Blotting*

O extrato aquoso de espinho, nas doses de 5, 10 e 20 µg e o marcador de massa molecular, foram aplicados em géis de poliacrilamida (PAGE) a 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

Um dos géis foi corado com nitrato de prata para observação do conteúdo proteico total do extrato de espinho.

O outro gel, após a corrida do gel de SDS-PAGE, foi utilizado para a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8,6) a 125 mA por 2 horas. A membrana foi corada com Ponceau para verificar se a transferência para a membrana ocorreu. Após isso, a membrana foi bloqueada com 0,3% albumina sérica bovina em TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5), incubada com o anticorpo primário por 10 minutos no sistema SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore, Billerica, MA, EUA) e lavada com TBS-T. Após isso, foi incubado o anticorpo secundário por 10 minutos e lavado novamente com TBS-T. A membrana foi então revelada em câmara escura com reagentes de detecção ECL 1 e 2 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Reino Unido), com exposição em filme de raio-X (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

Os anticorpos primários utilizados foram anti-catepsina B e anti-catepsina K, monoclonais para humanos, feitos em camundongos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 4 µg/mL. O anticorpo secundário utilizado foi um para camundongos, na diluição 1:333 (Sigma-Aldrich, EUA). O tempo de exposição na revelação do anticorpo anti-catepsina B foi de 2 minutos, enquanto que o tempo de revelação do anti-catepsina K foi *overnight*.

3.5 Ensaios biológicos

Os experimentos que utilizaram animais foram feitos após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob os protocolos número 438/07 e 856/11.

3.5.1 Microcirculação do músculo cremaster

Experimentos sobre a microcirculação, bem como todos os outros experimentos para identificação de atividade pró-inflamatória e hemorrágica, foram feitos no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, em colaboração com o Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves e com a Dra. Renata Giorgi.

A resposta pró-inflamatória do extrato aquoso do espinho e do líquido celômico do ouriço (10 µg) foi avaliada por microscopia intravital do músculo cremaster de camundongos Swiss. Essa concentração de amostra foi selecionada a partir de experimentos prévios em que foram testadas diferentes doses de amostra, em injeções tópicas no músculo. As amostras (diluídas em 100 µL de solução salina) ou solução salina (controle) foram injetadas por via subcutânea na bolsa escrotal dos animais. Após 2, 4, 24 ou 48 horas os animais foram anestesiados por injeção subcutânea de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e o músculo cremaster foi exposto para análise da microcirculação por microscopia, conforme o método descrito por Baez (1973). Durante o procedimento, os animais foram mantidos em uma placa aquecida constantemente a 37 °C com um orifício transparente, no qual o cremaster foi posicionado. Respostas leucocitárias foram avaliadas por microscopia de luz (Axioplan II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com objetivas Achroplan 10.0/0.25. As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (JVC, Japão) e transmitidas a um monitor de TV e a um computador, no qual a imagem era digitalizada por software (KS 300, Kontron, Carl Zeiss, Alemanha).

Para o experimento, uma vênula pós-capilar (20–40 mm de diâmetro) foi selecionada ao acaso. Após um período de 10 minutos de estabilização, foi iniciada contagem de *rolling* e células aderidas durante 3 minutos em um segmento de 100 mm de vaso. Adesão de leucócitos foi considerada quando a célula permanecia pelo menos 30 s no vaso. Migração de leucócitos foi quantificada no tecido extravascular, em uma área de 50 mm, de cada lado do vaso.

3.5.2 Edema de pata

Edema de pata foi induzido após injeção intraplantar de 10 e 20 µg de amostra (diluída em 30 µL de solução salina), em camundongos Swiss. A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina (pata controle). O edema foi avaliado por meio de um pleitismômetro (Letica, Rochester, MI, EUA) em 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção. Os

resultados foram expressos como a diferença, em porcentagem, do volume entre as patas injetadas com a amostra e com salina.

3.5.3 Hipernocicepção

Uma possível atividade hipernociceptiva dos extratos de ouriço foi avaliada em ratos Wistar machos (160 - 180 g), que foram submetidos a uma avaliação do limiar de dor, de acordo com o método adaptado de Randall e Selitto (1957). Por meio desse teste é possível verificar se os compostos extraídos de *E. lucunter* causam diminuição do limiar de dor nos animais, isto é, o limiar que, quando alcançado, dispara o potencial de ação dos nociceptores, causando a dor.

Todos os animais utilizados no experimento passaram por um processo de adaptação ao aparelho (Ugo Basile, Collegeville, PA, EUA) e tiveram seu limiar de dor determinado antes e após a injeção de amostra (10 e 20 µg), em diferentes tempos (1, 2, 4 e 8 horas). Esse limiar foi mensurado com a aplicação de uma carga crescente ao longo do tempo (16 g/s) na pata do animal, até a reação do animal retirar a pata do aparelho. A atividade hipernociceptiva foi expressa em gramas necessários para induzir a retirada da pata, e foi comparado ratos controle com ratos tratados.

3.5.4 Desgranulação de mastócitos

Experimentos de desgranulação de mastócito foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pela equipe da Dra. Catarina F. P. Teixeira.

Amostras provenientes do líquido celômico (0,05, 0,5 e 1 µg/g animal), diluídas em 500 µL de salina, ou salina estéril foram injetadas por via intraperitoneal em camundongos Swiss machos. Em intervalos de tempo selecionados (10, 15, 30 ou 60 minutos) após a injeção, os animais foram eutanaziados com halotano e o abdômen foi aberto para a retirada do mesentério. Este foi colocado em uma solução de formaldeído 4% por 2 horas a 4 °C. O mesentério fixado foi então colocado em uma lâmina de vidro para microscopia e corado com Giemsa para observação no microscópio de luz. Cem mastócitos foram contados em uma região aleatória, e foi determinado se eles estavam desgranulados ou não (grânulos ao redor da célula). Em murinos, células desgranuladas podem ser visualizadas, pois os grânulos corados ainda permanecem no tecido quando são liberados.

Para verificar a participação da desgranulação de mastócitos nos eventos inflamatórios observados, foi feito um tratamento com cromoglicato (3 doses, uma vez ao dia, 25 mg/kg de animal i.p.), em camundongos. O cromoglicato é um estabilizador da membrana de mastócitos, dificultando a desgranulação e liberação de mediadores inflamatórios. Após o tratamento, camundongos foram injetados com as amostras teste para estudo de edema de pata.

3.5.5 Hemorragia

A atividade hemorrágica foi verificada, de acordo com o método descrito por Kondo et al. (1960). A amostra (10 e 20 µg) foi injetada por via intradérmica na pele dorsal de camundongos Swiss. Três horas após a injeção, os animais foram eutanaziados e a pele, na área da injeção, foi removida. A face interior da pele foi analisada para identificação de pontos hemorrágicos.

3.5.6 Atividade hemolítica

A possível atividade hemolítica das frações foi ensaiada sobre hemácias humanas de um doador saudável (sangue tipo O positivo), conforme se segue. O sangue total foi centrifugado para a separação das hemácias. As hemácias foram lavadas 3 vezes com PBS por centrifugação, e foi feita uma solução 4% em PBS. Para determinar a atividade hemolítica, foram adicionados 40 µL de PBS, 10 µL da suspensão de hemácias 4% e 50 µL de amostra diluída em PBS, nas concentrações de 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL (ou 50 µL de PBS para o controle negativo). Para o controle positivo, foi adicionado 50 µL de Triton-X 0,1%. Essa solução foi incubada por 1 hora a 37 °C, e após esse período foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. A absorbância de 60 µL do sobrenadante foi determinada a 540 nm.

3.5.7 Atividade enzimática

Foram feitos ensaios de atividade enzimática do extrato aquoso do espinho para verificar um possível envolvimento de enzimas no processo de regeneração do espinho, quando quebrado.

A hidrólise do substrato fluorogênico Z-L-arginina 7-amido-4-metilcumarina (Z-R-MCA) (Sigma-Aldrich, EUA) foi monitorada por até 40 minutos em um espectrofluorímetro

(SpectraMaxGeminiXPS – Molecular Devices) a λ_{em} =430 nm e λ_{ex} =330 nm, após a incubação do extrato aquoso de espinho (0,12 mg/mL), a 30 °C, em 100 mM de acetato de amônio. Foi feita uma curva de pH para determinar aquele de melhor atividade enzimática, que foi escolhido e utilizado para os experimentos subsequentes. Esse experimento também foi feito após pré-incubação do extrato de espinho com DTT (2 mM) por 10 minutos em temperatura ambiente, para testar a hipótese da presença de cisteíno peptidases. Para estudos de cinética enzimática, foram utilizadas várias concentrações de substrato: 35, 140, 280, 560 e 840 μ M.

Também foram utilizados os substratos com supressão interna de fluorescência (FRET) Abz-GIVRAK(Dnp)-OH (Abz: ácido o-aminobenzóico; Dnp: 2,4-dinitrofenol) e Abz-GIVRAKQ-EDDnp (EDDnp: N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina), gentilmente cedidos pela Aminotech P&D Ltda. Esses substratos foram ensaiados em tampão acetato de amônio 100 mM, contendo cloreto de sódio 200 mM, pH 4,5 e a fluorescência foi mensurada em λ_{ex} =320 nm e λ_{em} =420 nm em um espectrofluorímetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O aumento da fluorescência foi registrado de modo contínuo ao longo do tempo, por 10 minutos.

Para a avaliação da atividade enzimática em substratos proteicos, foi utilizado como substrato caseína conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com o método descrito por Twining (1984). O extrato de espinho foi incubado com o substrato, em tampão Tris 100 mM, pH 8, por 10, 20, 30 e 40 minutos, a 30 °C. Após esse período, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 5% e centrifugadas. O sobrenadante foi adicionado ao tampão Tris 500 mM e lido em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de λ_{ex} =365 nm e λ_{em} =525 nm.

Para estudos de inibição da atividade enzimática, foram usados os inibidores: PMSF (1 mM) e aprotinina (0,3 μ M) para serinopeptidases, EDTA (1mM) para metalopeptidases e E64 (9 μ M) para cisteíno peptidases. Esses inibidores foram incubados com a enzima por 15 minutos antes do ensaio, com ou sem DTT. Para a titulação do sítio ativo da enzima, foi feita inibição com doses crescentes de inibidor, de acordo com o método descrito por Salvesen e Nagase (2001).

A identificação do sítio de clivagem do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH foi verificada após separação manual dos produtos de hidrólise por RP-HPLC, seguido por análise por espectrometria de massas.

Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com Wilkinson (1961), usando plots de Eadie-Hofstee. Todos os dados foram calculados em equações usando o Grafit 3.0 de software Erithacus (LEATHERBARROW, 1992).

3.6 Morfologia dos espinhos

Para análises microscópicas do espinho de *E. lucunter*, foram feitos experimentos no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em colaboração com a Dra. Marta Antoniazzi, Dr. Carlos Jared e Dra. Adriana da Costa Neves.

3.6.1 Processamento das amostras

Após a remoção, os espinhos foram imediatamente imersos em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Após 48 horas, os espinhos foram submetidos à descalcificação em solução aquosa de EDTA a 4,13%, pH 7,2, em agitação constante, por cerca de 24 horas. Após esse período procedeu-se o processamento histológico. Para tanto fragmentos dos espinhos foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 95% e 100%), embebidos na resina por 12 horas e incluídos em cápsulas de gelatina, orientados para a confecção de cortes transversais.

3.6.2 Microscopia de luz

Cortes de 2 μ m foram obtidos em micrótomo Microm HM340 E, utilizando-se navalhas de vidro, e corados em azul de toluidina-fucsina. Foram também realizadas as reações histoquímicas do PAS, alcian-blue, pH 2,5, para a localização de polissacarídeos, azul de bromofenol, para a localização de proteínas, e picrossírius, para localização de colágeno.

3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para o processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos dos espinhos fixados e descalcificados conforme o já descrito, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 40 minutos, desidratados em série etanólica crescente (70%, 95% e 100%) e incluídos em resina epoxy (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA), orientados para a obtenção de cortes transversais. Cortes ultrafinos de 60 nm foram

obtidos em um ultramicrotomo Sorvall MT6000, utilizando-se navalha de diamante. Após contrastação em acetato de uranila a 2%, e citrato de chumbo, os cortes foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, operando a 80 KV. Para a captura das imagens, foi utilizada uma câmera MegaView III, acoplada ao software ITEM, ambos da Olympus (Tóquio, Japão).

As fotomicrografias foram obtidas a partir de um microscópio Olympus BX51 e de um estereomicroscópio Olympus SZ, utilizando o sistema fotográfico Image-Pro Express Olympus.

3.6.4 Microscopia eletrônica de varredura

Um espinho, preservado nos mesmos fixadores para microscopia eletrônica de transmissão, foi lavado com 70% etanol, secado naturalmente e quebrado manualmente em vários pedaços para análise por microscopia eletrônica de varredura, em baixo vácuo (60 Pa), a 10 kV.

3.6.5 Imunohistoquímica

Reações de imunohistoquímica foram feitas em cortes transversais do espinho, utilizando o anticorpo monoclonal anti-catepsina B, produzido em camundongos (Sigma Aldrich, EUA). Cortes com 3 μ m de espessura, processados como descrito anteriormente, foram desparafinizados, reidratados e incubados com peróxido de hidrogênio 6% em metanol (1:1) por 30 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo anti-catepsina B, na dose de 8 μ g/mL, por 2 horas, em temperatura ambiente. Um sistema de detecção de anticorpos ADVANCED HRP (Dako, Carpinteria, EUA) foi utilizado: os cortes foram corados gentilmente com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em uma lâmina de vidro em meio baseado em xileno. Soro não imune foi usado como controle negativo.

3.7 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para comparação de dois grupos experimentais foi feito teste t de Student. Para comparação de mais de dois grupos experimentais, foi feita análise de variância ANOVA one-way, seguida de pós-teste de Tukey, ou ANOVA two-way, seguida de pós teste de Bonferroni (Instat 3.01,

GraphPad Software Inc, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p era menor que 0,05

Figura 3 – Fluxograma da metodologia empregada para a obtenção do material, análise e teste.

4 RESULTADOS

4.1 Líquido celômico perivisceral

4.1.1 Hemorragia

Não foi observada atividade hemorrágica com a injeção de 10 ou 20 µg de líquido celômico de *E. lucunter*, comparado com controle (salina), que também não apresentou hemorragia. A figura 4 é a foto das amostras de pele dos animais injetados com salina ou líquido celômico.

Figura 4 – Amostras de pele de camundongos injetados com líquido celômico de *E. lucunter*, nas doses de 10 e 20 µg. Acima, injeção de salina como controle negativo. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

4.1.2 Atividade hemolítica

O líquido celômico, bem como suas frações, não foi capaz de causar hemólise de hemácias humanas, em todas as concentrações testadas nesse ensaio.

4.1.3 Avaliação da atividade pró-inflamatória

As frações provenientes da SPE (nomeadas F0, F25, F50, F75, F100 e FMeOH) foram testadas na microcirculação de camundongos para verificar uma possível atividade pró-inflamatória.

Inicialmente todas as frações, nas doses de 5, 10 e 20 µg, foram aplicadas topicamente sobre o músculo cremaster. Foram vistas alterações na microcirculação com 10 e 20 µg das frações F25 e F75, verificadas pela dilatação do vaso sanguíneo, diminuição de leucócitos em *rolling* e aumento de leucócitos aderidos, eventos típicos de inflamação.

Essas duas frações, na dose de 10 µg, foram injetadas no saco escrotal, separadamente, e a microcirculação foi exposta para análise 1, 2 e 4 horas após a injeção. *Rolling*, adesão e migração de leucócitos foram os parâmetros avaliados.

O gráfico da figura 5A mostra a contagem das células em *rolling* 1, 2 e 4 horas após a injeção da F25 e F75. Uma hora após a administração da F25, houve um aumento significativo de *rolling*, que diminuiu após 2 horas, e voltou a aumentar 4 horas após a injeção. Com a F75, não houve aumento de *rolling* nas duas primeiras horas, comparado com a injeção de solução salina.

Células aderidas foram observadas com a administração tanto de F25 quanto de F75. Essa adesão ocorreu após 1 hora e aumentou em 2 horas após a injeção, sendo que após 4 horas o número de células aderidas diminuíram, embora ainda tenham sido estatisticamente diferentes em relação ao controle (figura 5B).

Também foram observadas células migradas em decorrência da administração de F25 e F75 (figura 5C). Para as duas frações, a migração ocorreu 4 horas após a injeção, sendo que a F25 induziu uma maior quantidade de células migradas.

A fração 25 (F25), por apresentar maior quantidade de células em *rolling*, principalmente em 1 hora, e maior quantidade de células migradas, foi escolhida para a purificação, por RP-HPLC, em coluna C18, como descrito na seção Material e Métodos. A figura 6 mostra o cromatograma obtido da F25, com a absorbância no comprimento de onda de 214 nm. Os picos marcados com asterisco foram os selecionados para os testes na microcirculação, no tempo de 2 horas. Esse tempo foi escolhido pois permite a observação de células aderidas e migradas.

Figura 5 – Número de células da microcirculação do músculo cremaster de camundongo após 1, 2 e 4 horas da aplicação das frações F25 e F75 do líquido celômico de *E. lucunter*. (A) contagem de células em *rolling*, por minuto. (B) número de células aderidas ao endotélio em 100 μm de vaso. (C) número de células migradas para o espaço extravascular. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 6 – Perfil cromatográfico da F25 do líquido celômico de *E. lucunter*, em coluna C18, $\lambda=214$ nm. Os asteriscos indicam os picos testados na microcirculação de camundongos.

Fonte: Sciani (2012)

Um dos picos testados, nomeado pico 10 (p10), proveniente da purificação da F25, mostrou ser pró-inflamatório, por causar aumento de células aderidas e migradas em 2 horas após a injeção, como está ilustrado na figura 7A. Os demais picos não causaram nenhuma alteração celular. A observação de leucócitos na microcirculação também foi feita após 24 horas da injeção de p10, como está mostrado na figura 7B. Nesse tempo, não houve alteração no número de células em *rolling* e aderidas, comparado com o controle. Células migradas foram observadas, mas como não há mais células aderidas, o número de células migradas tende a diminuir com o tempo, encerrando o processo inflamatório.

A figura 8 mostra o cromatograma obtido da F25. A seta indica o pico que causou atividade pró-inflamatória, nomeado p10.

Figura 7 – Número de células da microcirculação do músculo cremaster de camundongo após 2 e 24 horas da aplicação das frações do p10, isolado do líquido celômico de *E. lucunter*, sobre a microcirculação do músculo cremaster de camundongo (leucócitos em *rolling*, aderidos e migrados): (A) exposto 2 horas após a aplicação. (B) 24 horas após p10, * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=5.

A

B

Fonte: Sciani (2012)

Figura 8 – Perfil cromatográfico da F25 do líquido celômico de *E. lucunter*, em coluna C18, $\lambda=214$ nm. A seta indica o pico que causou atividade pró-inflamatória, nomeado p10.

Fonte: Sciani (2012)

Por meio de análises cromatográficas, foi verificado que o p10 não estava puro. Foi então utilizado um novo método para a re-purificação desse pico (ver seção 3.3), como mostrado na figura 9. Os picos provenientes dessa nova cromatografia foram testados novamente na microcirculação, e foi identificado um pico com atividade, nomeado p10B (figura 9, seta). A pureza dessa molécula foi confirmada por HPLC e espectrometria de massas (ver adiante). O perfil de alteração celular da microcirculação causado pelo p10B foi similar ao p10, por isso não está mostrado.

Figura 9 – Cromatograma obtido a partir da injeção do p10, em coluna C18 core-shell, $\lambda=214$ nm. A seta mostra o pico com atividade inflamatória (p10B).

Fonte: Sciani (2012)

Além dos efeitos na microcirculação, foi observada formação de edema de pata, estatisticamente significativa, após a injeção de 10 e 20 μg de p10B (figura 10). A formação do edema ocorreu de maneira dose-resposta, que se iniciou 30 minutos após a administração e atingiu o valor máximo (64 % do controle) em 1 hora.

A atividade hipernociceptiva foi mensurada após a injeção de 10 μg do p10B da F25 do líquido celômico. Comparado com animais controle, uma hora após a administração, o limiar de dor diminuiu significativamente e permaneceu por 2 horas após a injeção. Após um período de 4 horas, os valores de limiar de dor retornaram aos valores basais (figura 11).

Figura 10 – Porcentagem de edema de pata de camundongo causado pela injeção de 10 e 20 μg do p10B do líquido celômico de *E. lucunter*. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 11 – Valores de limiar de dor, em gramas, após 1, 2 e 4 horas da injeção do p10B da F25 do líquido celômico de *E. lucunter*. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=8.

Fonte: Sciani (2012)

4.1.4 Desgranulação de mastócitos

Devido ao p10B ter iniciado um processo inflamatório rapidamente (início do edema em 30 minutos e início do recrutamento celular e dor em 1 hora), foram feitos ensaios para verificar se este causa desgranulação de mastócitos e consequente liberação de mediadores inflamatórios. Tais mediadores, como por exemplo, a histamina, possuem essa ação rápida para o desenvolvimento do processo inflamatório, sendo o principal componente dos grânulos de mastócitos.

O p10B, na dose de 0,5 $\mu\text{g/g}$, foi capaz de induzir a desgranulação em 15 minutos. A figura 12 apresenta fotomicrografias do peritônio de camundongos, com mastócitos aderidos (setas). No grupo controle, os mastócitos estão intactos, com os grânulos contidos na célula. Com o p10B, foi possível observar a dispersão desses grânulos, sem estarem contidos por uma membrana, indicando que esses mastócitos estão desgranulados. O mesmo foi possível observar com a injeção de 48/80 (0,5 $\mu\text{g/g}$), um conhecido desgranulador de mastócitos.

Figura 12 – Fotomicrografia do peritônio de camundongo, contendo mastócitos aderidos (seta), após a injeção de p10B. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Em um estudo da desgranulação induzida pelo p10B (0,5 $\mu\text{g/g}$) ao longo do tempo, foi possível observar que 10 minutos após a administração, 15,8% dos mastócitos estavam desgranulados, o que já é significativamente diferente do controle (gráfico da figura 13). A desgranulação foi aumentando com o tempo: 22% em 15 minutos e 30,25% em 30 minutos. Após 60 minutos de injeção de p10B, não havia mais mastócitos desgranulados. Com a administração de 48/80, também houve desgranulação, o que mostra a eficiência do método.

Figura 13 – Porcentagem de mastócitos desgranulados em peritônio de camundongos após a injeção de p10B (0,5 $\mu\text{g/g}$) e 48/80 (0,5 $\mu\text{g/g}$), em diferentes tempos de incubação. * $p < 0,05$, comparado com os respectivos controles; # $p < 0,05$, comparado com o p10B em 10 min; § $p < 0,05$, comparado ao p10B em 15 min. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Estudos de concentração-reposta com a incubação de p10B, por 30 minutos, foram feitos, como mostrado na figura 14. Com 0,05 $\mu\text{g/g}$, houve 7,3 % de desgranulação de mastócitos, mas não foi estatisticamente significativo em relação ao controle. Com 0,5 $\mu\text{g/g}$, foi observada uma desgranulação de 25,67 %, como já visto anteriormente. Com uma dose maior, de 1 $\mu\text{g/g}$, a desgranulação aumentou para 42,0 %.

Figura 14 – Porcentagem de desgranulação de mastócitos com o aumento da concentração de p10B, em 30 minutos. * $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ em relação ao 0,5 $\mu\text{g/g}$. $N=5$.

Fonte: Sciani (2012)

Para verificar a participação dos mastócitos na formação do edema de pata, os animais foram previamente tratados com cromoglicato (25 mg/kg i.p., 1 vez ao dia, por 3 dias), e então injetados com p10B (10 μg) para então a avaliação do edema. Na figura 15 pode ser observado que com o tratamento, o edema diminuiu mais de 50%, o que é significativamente diferente dos camundongos injetados com p10B, sem cromoglicato. Isso mostra que após a estabilização da membrana do mastócito pelo cromoglicato, o p10B causa pouca desgranulação, portanto os mediadores liberados pelo mastócito tem um papel importante no efeito edematogênico.

Figura 15 – Porcentagem de edema de pata de camundongo causado pela injeção do p10B, em animais previamente tratados com cromoglicato. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. $N=5$.

Fonte: Sciani (2012)

4.1.5 Caracterização bioquímica do p10B

Análises por espectrometria de massa foram feitas com o p10B para verificar a natureza das moléculas e a pureza.

Foi observado um íon intenso de 353,1980, com 3 cargas, como mostra a figura 16. Foram observados também os íons 529,2924 e 265,1490, com 2 e 4 cargas, respectivamente, que correspondem à mesma molécula do íon 353, tendo, portanto $1056,591 \pm 0,006$ Da.

Outros íons de pequena intensidade também foram observados, porém correspondem a contaminantes externos.

Figura 16 – Espectro de massas do p10B, analisado por ESI-IT-ToF. Inserido, um zoom do íon 353,1980, mostrando a distribuição isotópica.

Fonte: Sciani (2012)

Os íons com 2 e 3 cargas do p10B foram fragmentados (MS/MS), para o sequenciamento *de novo*. O padrão de fragmentação gerado é típico de peptídeos, como está mostrado nas figuras 17A (fragmentação do íon 353,1980) e 17B (fragmentação do íon 529,2924).

Os espectros de íons filhos gerados foram então analisados pelo programa Peaks, que auxiliou no processo de sequenciamento *de novo* do peptídeo. Foram calculadas algumas sequências de aminoácidos, que foram analisadas manualmente. Juntamente com o sequenciamento manual, o perfil de fragmentação experimental (deconvoluído) foi comparado a espectros teóricos das sequências peptídicas candidatas. Foi observado um padrão semelhante entre o espectro teórico (figura 18A) e o experimental (figura 18B) para o

peptídeo LRKLMLQR, havendo bastante semelhança entre os íons das séries b e y, correspondentes aos dois espectros. Além disso, alguns fragmentos internos também foram identificados no espectro experimental. O erro apresentado pelo espectro teórico é muito baixo, o que mostra uma coerência da sequência calculada.

Além dessas análises, a sequência primária pôde ser confirmada pela análise de aminoácidos, mostrada na tabela 1. Os aminoácidos presentes no peptídeo LRKLMLQR puderam ser identificados pela análise de aminoácidos, especialmente a leucina, que em análises por espectrometria de massas, não pode ser diferenciada da isoleucina.

Figura 17 – Padrão de fragmentação dos íons precursores (A) 353,1980 e (B) 529,2924, obtidos após a colisão por gás argônio.

A

B

Fonte: Sciani (2012)

Figura 18 – Espectro deconvolvido e anotado (A) e reconstituído do p10B (B), mostrando a similaridade entre os íons da série b e y, confirmando a sequência peptídica LRLMLQR.

A

B

Fonte: Sciani (2012)

Tabela 1 – Análise de aminoácidos do p10B, isolado do líquido celômico de *E. lucunter*.

Aminoácido	%
Arg	26,6
Leu	20
Lys	6,7
Met	20
Phe	6,7
Val	20

Fonte: Sciani (2012)

Buscas em bancos de dados do NCBI/BLAST foram feitas para verificar alguma similaridade entre o peptídeo p10B e algum já descrito. Foi encontrado um peptídeo similar à vitelogenina, do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, cuja sequência é LRKLMLER.

4.2 Extrato aquoso do espinho

4.2.1 Hemorragia

Não foi observada atividade hemorrágica com a injeção de 10 ou 20 µg de extrato aquoso dos espinhos de *E. lucunter* (figura 19). Os animais que tiveram o extrato injetado apresentaram o mesmo perfil dos animais injetados com PBS. Animais injetados com jararagina, uma metalopeptidase da peçonha de *Bothrops jararaca*, com conhecida ação hemorrágica (KAMIGUTI et al., 1996), foi injetada utilizada como controle positivo, e apresentou spots de hemorragia na pele (linha superior).

Figura 19 – Amostras de pele de camundongos injetados com extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. Acima, injeção de jararagina, como controle positivo, e à esquerda, injeção de PBS como controle negativo. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

4.2.2 Atividade hemolítica

Não foi observada qualquer atividade hemolítica sobre hemácias humanas, com todas as doses testadas do extrato aquoso de espinho e suas frações.

4.2.3 Atividade pró-inflamatória do extrato bruto

A administração do extrato aquoso de espinho causou interações e migrações celulares, de maneira tempo-dependente, observadas na microcirculação do músculo cremaster (figura 20).

Um recrutamento celular foi observado 2 horas após a injeção do extrato, observado por aumento de contagem de células aderidas ao endotélio e migradas. Após 4 horas, embora o número de células aderidas tenha diminuído (não estatisticamente significativo), o número de células migradas aumentou significativamente. A adesão e migração atingiram valores máximos em 24 horas após a administração do extrato. Após 48 horas, células em *rolling* e aderidas retornaram ao estado basal, indicando o final da inflamação. Nesse tempo, ainda foram observadas algumas células migradas.

Figura 20 – Contagem de células da microcirculação de músculo cremaster de camundongo após 2, 4, 24 e 48 horas da aplicação de extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. (A) contagem de células em *rolling*, por minuto. (B) número de células aderidas ao endotélio em 100 μm de vaso. (C) número de células migradas para o espaço extravascular. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=5.

A

B

C

Fonte: Sciani (2012)

A administração do extrato aquoso de espinho, nas doses de 10 e 20 μg , foi capaz de induzir um edema de pata (figura 21). Embora esse edema não tenha sido intenso, foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$), comparado com o controle, atingindo valores máximos de 28%. Esse valor máximo de edema ocorreu aos 30 minutos após a injeção, e decresceu progressivamente.

Figura 21 – Porcentagem de edema de pata de camundongo após a injeção de extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*, nas doses de 10 μg (círculos pretos) e 20 μg (círculos brancos). * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

O extrato aquoso de espinho também foi capaz de diminuir o limiar de dor dos animais. No início do experimento, ou seja, antes da injeção do extrato, todos os animais apresentaram o mesmo limiar de dor (figura 22). Uma hora após a administração de 10 e 20 μg do extrato, o limiar de dor diminuiu significativamente, comparado com os animais controle, que receberam solução salina. Após 2 horas, os valores de limiar de dor permaneceram nos animais que receberam 20 μg de extrato, e os que receberam 10 μg retornaram aos valores basais de limiar. Após 4 horas, os valores de limiar do grupo que recebeu 20 μg também voltaram para os valores basais.

Figura 22 – Valores de limiar de dor, em gramas, após 1, 2 e 4 horas da injeção do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=8.

Fonte: Sciani (2012)

4.2.4 Atividade pró-inflamatória das frações

As frações do extrato aquoso do espinho obtidas por SPE (F0, F25, F50, F75, F100 e FMeOH) foram injetadas na dose de 10 µg para análise de alterações na microcirculação, 2 horas após a injeção. A fração F25 foi identificada como ativa, pois causou diminuição no número de células em *rolling*, e aumento de células aderidas e migradas, sinais típicos da inflamação (figura 23). A F50 causou aumento de células aderidas e migradas, em menor número que a F25. No entanto, a F50 não causou diminuição das células em *rolling* e o número de células aderidas e migradas foi menor que a F25. As demais frações foram estatisticamente iguais ao grupo controle, por isso não foram mostradas.

Figura 23 – Análise das células da microcirculação do músculo cremaster 2 horas após as frações F25 e F50 do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. Barras pretas indicam células em *rolling*, barras brancas indicam a número de células aderidas ao endotélio em 100 μ m de vaso e barras cinzas o número de células migradas para o espaço extravascular. * $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

A F25 foi então purificada por RP-HPLC, em coluna C18. O perfil cromatográfico resultante dessa purificação está mostrado na figura 24, e os picos obtidos nessa purificação foram testados na microcirculação, também no tempo de 2 horas (os picos testados foram os marcados com asteriscos no cromatograma da figura 24).

Foi identificado um pico ativo, nomeado p3, que assim como a F25, causou diminuição de células em *rolling* e aumento de células aderidas e migradas, como mostra a figura 25. A figura 26 mostra o cromatograma da F25, mostrando o p3, pico ativo na microcirculação.

Figura 24 – Perfil cromatográfico da F25 do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*, em $\lambda=214$ nm. Os asteriscos indicam os picos testados nos modelos de inflamação.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 25 – Contagem de células da microcirculação pós a aplicação do p3, isolado do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. Barras brancas indicam a contagem de células em *rolling*, por minuto, barras cinzas o número de células aderidas ao endotélio em 100 μ m de vaso e barras pretas o número de células migradas para o espaço extravascular. * $p<0,05$, comparado com o respectivo grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 26 – Perfil cromatográfico da F25 do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*, em $\lambda=214$ nm. A seta indica o pico 3 (p3), capaz de induzir resposta inflamatória.

Fonte: Sciani (2012)

De acordo com análises cromatográficas, foi possível identificar impurezas no p3. Foi então desenvolvido um método para a purificação da molécula (item 3.3). O p3 foi separado em pelo menos 7 picos, mostrados na figura 27, que foram re-testados na microcirculação. Dessa forma, foi identificado novamente um pico ativo, agora puro (mostrado na seta da figura 27), nomeado p3E. A figura 28 mostra o efeito do p3E na microcirculação, em que pode ser observado aumento de células aderidas e migradas. Os demais picos não causaram qualquer alteração na microcirculação.

Além dos efeitos na microcirculação, o p3E foi capaz de induzir um discreto edema, que atingiu 20% em 20 minutos após a administração, porém estatisticamente significativa, como mostrado na figura 29.

Figura 27 – Cromatograma da re-purificação do p3. A seta mostra o pico responsável por causar inflamação e hipernocicepção.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 28 – Contagem de células da microcirculação após a aplicação do p3E, isolado do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. Barras brancas indicam a contagem de células em *rolling*, por minuto, barras cinzas o número de células aderidas ao endotélio em 100 μ m de vaso e barras pretas o número de células migradas para o espaço extravascular. * $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 29 – Porcentagem de edema ao longo do tempo, em relação ao grupo controle, após a injeção do p3E, isolado do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. * $p < 0,05$. N=5.

Fonte: Sciani (2012)

O pico isolado, p3E, também foi testado no modelo de hipernocicepção, na dose de 10 μ g. A molécula foi capaz de diminuir o limiar de dor dos ratos, conforme mostrado na figura 30. Esse efeito começou após 1 hora da injeção e permaneceu até 4 horas. Após 8 horas, não foram observados mais efeitos.

Figura 30 – Valores de limiar de dor, em gramas, 1, 2, 4 e 8 horas após a injeção de p3E, isolado do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle. N=8.

Fonte: Sciani (2012)

4.2.5 Caracterização bioquímica do p3E

O p3E foi analisado em detector PDA (*photo diode array*), para uma varredura de comprimento de onda. Foi verificada absorção em comprimentos de onda mais baixos, sendo a maior intensidade entre 205 e 230 nm, como mostra a figura 31A, em uma varredura de comprimento de onda de todo o cromatograma, com o p3E mostrado na seta. A figura 31B mostra a varredura do comprimento de onda somente do p3E, em que também é possível observar a absorção em comprimentos de onda baixos.

Figura 31 – Análise do p3E em um detector PDA (*photo diode array*), para uma varredura de comprimento de onda. (A) Varredura de todo o cromatograma; (B) varredura do p3E.

A

B

Fonte: Sciani (2012)

Para a elucidação da fórmula molecular da molécula isolada do extrato de espinho (p3E), foram feitas análises por espectrometria de massas, no modo positivo, em um *scan* de 50 a 2000 m/z. A figura 32 mostra o espectro obtido, em que são observados dois íons mais intensos, de m/z 599,3409 e 485,3217. Com a fragmentação do íon 599,34, é possível observar o íon 485,32 (figura 33, seta). Esse íon, portanto, não se trata de uma impureza, mas sim um íon filho do íon 599,3409, que aparece devido a uma fragmentação espontânea no cone, quando a molécula é injetada no equipamento.

Figura 32 – Análise por espectrometria de massas (ESI-IT-ToF) do p3E, em um *scan* de 50 a 2000 m/z.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 33 – Perfil de fragmentação induzida por colisão por argônio do íon 599,3409 m/z. A seta mostra o íon 485,32 m/z, observado no espectro do p3E.

Fonte: Sciani (2012)

De acordo com análises pelo software Formula Predictor, chegou-se uma fórmula molecular $C_{28}H_{42}N_{10}O_5$, com um *score* de 91% (figura 34). Essa análise leva em conta a massa exata do íon principal e de seus isótopos e a relação de intensidade entre os isótopos. Essa análise é possível e confiável, pois o equipamento possui alta resolução, sendo capaz distinguir moléculas muito parecidas. Os parâmetros foram ajustados de acordo com análises prévias por ressonância magnética nuclear, onde foi possível confirmar a pureza da molécula, além da presença de nitrogênio e a ausência de anéis aromáticos. Análises manuais do perfil de fragmentação (MS/MS) do íon 599 m/z foram feitas para identificar a perda neutra de moléculas comuns, e confirmar a fórmula molecular do composto. Nessa análise, foi possível observar perdas de H_2O , CH , CH_3N , C_2H_5N , CH_3 , CH_3CH_3 e CH_3CH_2 , e com isso, chegou-se a uma fórmula molecular muito similar àquela calculada pelo Fórmula Predictor.

Figura 34 – Análise da fórmula molecular do p3E, do extrato aquoso de espinho, causador do efeito pró-inflamatório.

Fonte: Sciani (2012)

4.2.6 Atividade enzimática

Após a incubação do extrato aquoso do espinho com o substrato Z-R-MCA, não foi observada atividade enzimática. Quando o extrato de espinho foi pré-incubado com DTT, foi observada hidrólise do substrato, o que indica a presença de enzimas ativadas por DTT, ou seja, cisteíno peptidases. Foi feita uma curva de pH do extrato de espinho, com tampão acetato de amônio 100 mM, em pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Foi verificado que o pH de melhor atividade é 5 e 7 (figura 35).

Figura 35 – Curva de pH do extrato aquoso de espinho de *E. lucunter*, com o substrato Z-R-MCA.

Fonte: Sciani (2012)

Foi então feita a incubação do extrato (ativado por DTT) com várias concentrações de substrato, para estudos cinéticos. Foi possível observar aumento de velocidade, conforme o aumento da concentração de substrato, até que atingisse um ponto de saturação (figura 36). Com esses valores de velocidade, foi possível fazer o cálculo de V_{max} e K_m , mostrados na tabela 2.

Figura 36 - Valores de velocidade por concentração de substrato Z-R-MCA, quando incubado com o extrato aquoso de espinho, ativado por DTT.

Fonte: Sciani (2012)

Tabela 2 – Valores de V_{max} e K_m do extrato aquoso de espinho sobre o substrato Z-L-Arg-MCA

<i>Variable</i>	<i>Value</i>	<i>Std. Err.</i>
V max (AUF/s)	4009,0640	325,4133
Km (μM)	147,2492	39,9867

Fonte: Sciani (2012)

Foram então utilizados os substratos Abz-GIVRAK(Dnp)-OH e Abz-GIVRAKQ-EDDnp, substratos específicos para cisteínopeptidases do tipo exopeptidases e endopeptidases, respectivamente. Com a incubação do Abz-GIVRAKQ-EDDnp, não foi observada hidrólise, enquanto que com o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH houve atividade proteolítica, cujos valores de velocidade estão mostrados na tabela 3. Também houve um comportamento de aumento de velocidade conforme o aumento da concentração de substrato, como mostrado na figura 37.

Com a incubação do extrato de espinho com caseína, não foi observada atividade enzimática, com a mesma concentração de extrato utilizado nos demais experimentos enzimáticos. Também não foi observada atividade proteolítica aumentando a concentração de substrato.

Tabela 3 – Valores de Vmax e Km do extrato aquoso de espinho sobre o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH

<i>Variable</i>	<i>Value</i>	<i>Std. Err.</i>
V max (AUF/s)	2581,7403	54,5865
Km (μ M)	8,5761	0,5100

Fonte: Sciani (2012)

Figura 37 – Valores de velocidade de hidrólise do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH, após a incubação com extrato aquoso de espinho ativado por DTT.

Fonte: Sciani (2012)

Para confirmar que a atividade enzimática era devido à presença de cisteíno peptidases, foram utilizados os inibidores aprotinina, PMSF, EDTA, E64. A atividade somente foi inibida com a incubação com E64 (figura 38), de maneira dose-dependente, o que confirma a atividade de cisteíno peptidases. Com esse experimento, foi possível fazer a titulação da cisteíno-peptidase presente no extrato aquoso de espinho. Foi então estimada a quantidade de enzima presente no extrato de espinho em 30 nM, como mostra a figura 38.

Figura 38 – Velocidade de hidrólise do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH após a adição do extrato aquoso de espinho ativado por DTT, e pré-incubado com concentrações crescentes de E-64, inibidor de cisteíno-peptidases.

Fonte: Sciani (2012)

Sabendo-se da presença de uma cisteíno peptidase no extrato aquoso de espinho, o produto da incubação do extrato aquoso de espinho ativado por DTT com o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH foi analisado por RP-HPLC e espectrometria de massas, a fim de se determinar o ponto de clivagem da enzima presente no extrato e identificar a família e o clan a que pertence essa(s) enzima(s).

Foram verificados dois pontos de clivagem: um após a arginina e outro após a alanina, conforme o cromatograma por HPLC da figura 39A. A figura 39B mostra o espectro de massa da análise de um fragmento, produto da digestão enzimática.

Após a comprovação da presença de catepsinas no extrato de espinho e a identificação dos pontos de clivagem, suspeitou-se que essa enzima pudesse ser uma catepsina B. Para confirmar essa hipótese, foi feito *Western blotting* com anticorpos monoclonais específicos para essa enzima, além de anticorpos para catepsina K. A figura 40A mostra o perfil de SDS-PAGE do extrato total, enquanto que a figura 40B mostra o *Western blotting* após a incubação com os anticorpos. Houve um reconhecimento do anticorpo anti-catepsina B, com bandas na faixa de 105 kDa e uma banda forte entre 50 e 75 kDa, que respondeu de acordo com a concentração do extrato de espinho. Com o anticorpo para catepsina K, foi necessário um tempo de revelação *overnight*, e mesmo assim não apareceram bandas claras. Pode ser que a concentração de catepsinas K seja muito baixa no extrato, ou ainda que haja uma ligação

inespecífica do anticorpo à alguma outra proteína, ou mesmo que não haja uma enzima catepsina K-símile.

Figura 39 – Análise do produto da hidrólise do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH pelo extrato aquoso do espinho de *E. lucunter*. (A) RP-HPLC com substrato íntegro e os fragmentos identificados nas setas, mostrando dois pontos de clivagem. (B) Espectro de massas de um fragmento analisado.

A

B

Fonte: Sciani (2012)

Figura 40 – (A) SDS-PAGE do extrato aquoso de espinho, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular pré-corado, E = espinho; (B) *Western blotting* do extrato aquoso de espinho incubado com anticorpos monoclonais anti-catepsina B e anti-catepsina K para humanos, em diferentes concentrações do extrato.

Fonte: Sciani (2012)

O mesmo anticorpo, anti-catepsina B, foi incubado com um corte transversal do espinho, a fim de localizar essa enzima no tecido. A figura 41 mostra que houve reconhecimento do anticorpo pelas estruturas correspondentes à porção celular (ver item 4.2.7), observado pela coloração em marrom. Em cortes controle (com o mesmo tratamento, porém sem o anticorpo anti-catepsina), não houve o reconhecimento.

Figura 41 – Corte transversal do espinho, incubado com anti-catepsina B, mostrando positividade ao anticorpo.

Fonte: Sciani (2012)

4.3 Morfologia dos espinhos

Estudos morfológicos do espinho do ouriço foram feitos a fim de se verificar a existência de uma possível estrutura secretora de toxinas, já que foram observados efeitos tóxicos que puderam ser atribuídos às moléculas e não somente ao trauma mecânico da entrada do espinho na pele das vítimas de acidentes com esse animal. Além disso, em virtude das observações de regeneração da ponta do espinho, como mostra a figura 42, foi especulada a existência de células no espinho, e não somente de uma estrutura rígida de carbonato de cálcio, como alguns trabalhos descrevem.

Quando observado sob lupa, o espinho apresenta uma estrutura externa formada por uma série de sulcos longitudinais (figura 43). Análises por microscopia eletrônica de varredura também mostram essa mesma estrutura externa contendo sulcos longitudinais, conforme mostrado na figura 44. Nessa mesma figura, em uma imagem transversal do espinho cortado ao meio, é possível visualizar a matriz calcificada, que além de estar disposta longitudinalmente, tem uma forma radiada, com um eixo central mais poroso. A porção mineralizada ocupa o maior volume do espinho. São observadas também fenestrações em meio à porção calcificada, onde está a porção celular (ver adiante). A figura 45 mostra uma ampliação dos sulcos longitudinais do espinho, onde também é possível observar pequenas fenestrações entre os sulcos.

Figura 42 – Fotografia da ponta do espinho de *E. lucunter*, regenerada após uma quebra

Fonte: Sciani (2012)

Figura 43 – Fotografia do espinho de *E. lucunter*, mostrando a estrutura externa, contendo sulcos longitudinais.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 44 – Microscopia de varredura de um espinho de *E. lucunter* cortado ao meio

Fonte: Sciani (2012)

Figura 45 – Microscopia eletrônica de varredura da lateral do espinho, com ampliação dos sulcos longitudinais.

Fonte: Sciani (2012)

Cortes transversais em diferentes pontos do espinho (base, meio e ponta), obtidos após a sua descalcificação, mostram uma estrutura radial formada por um eixo central, contendo material celular (figura 46A), disposto em uma rede de compartimentos interconectados longitudinalmente, como se fossem canais, contendo diferentes tipos celulares, alguns deles, repletos de grânulos citoplasmáticos (figura 46D). A descalcificação facilita a observação da estrutura celular, que está intercalada por espaços aparentemente vazios, anteriormente ocupados por material calcificado. Essa imagem transversal obtida por microscopia de luz se sobrepõe à imagem observada na microscopia de varredura. A mesma estrutura celular, de uma maneira geral, foi observada desde a ponta do espinho (figura 46A) até a base (figura 46B), sendo que a ponta do espinho apresenta uma quantidade maior de células quando comparado à base, na qual a porção calcificada predomina. Essa estrutura da base se deve provavelmente à necessidade de maior sustentação para manter o espinho rígido, enquanto a ponta deve necessitar de células para a regeneração e para a proteção química. Os cortes transversais ainda mostram que a periferia do espinho apresenta, em toda a sua extensão longitudinal, conjuntos de células formando estruturas bem organizadas, dispostas radialmente, que devem corresponder macroscopicamente às partes mais internas da estrutura sulcada (figura 46C), onde são encontrados os sulcos longitudinais, observados na figura 45.

Vários tipos celulares foram identificados, tanto pela observação morfológica quanto por diferentes respostas às reações histoquímicas empregadas. Muitos desses tipos celulares mostram grânulos de secreção citoplasmáticos que variam em forma e tamanho e também em relação ao seu grau de compactação no interior da célula. A histoquímica mostra que enquanto algumas células são fortemente positivas ao PAS (figura 46E), indicando um conteúdo polissacarídico, outras reagem ao azul de bromofenol, indicando conteúdo protéico (figura 46F). Parte das células ricas em grânulos também foi positivamente corada com azul de bromofenol, indicando a presença de proteínas no interior desses grânulos (figura 46F).

De acordo com análises por microscopia eletrônica de transmissão, também foram observadas células com citoplasma rico em grânulos eletrodensos, com complexo de Golgi bem desenvolvido (figura 47). Esse tipo celular foi encontrado em maior concentração na ponta do espinho. Além disso, foi identificada a estrutura localizada na periferia (figura 48), correspondente à parte celular dos sulcos longitudinais, mostrada na microscopia de luz da figura 46C. Essa estrutura, de alto grau de complexidade, possui forma de moringa, cuja boca apresenta microvilosidades voltadas para o exterior. No interior da estrutura predominam células com alto grau de desenvolvimento do complexo de Golgi, e células contendo grande

Figura 46 - (A e B) Cortes transversais da ponta (A) e da base (B) do espinho após a descalcificação para verificar a presença de células. Coloração azul de toluidina-fucsina. (C) Conjuntos de células organizados na periferia do espinho correspondentes aos sulcos longitudinais (setas). Coloração azul de toluidina-fucsina. (D) Ampliação evidenciando diversos tipos celulares. A seta mostra células contendo grânulos. Coloração azul de toluidina-fucsina. (E) Corte do meio do espinho, coloração com PAS que indica células contendo material polissacarídico; (F) Corte do meio do espinho, coloração com azul de bromofenol, indicando a presença de material protéico. Inserida uma imagem de ampliação de células contendo grânulos, corados com azul de bromofenol

Fonte: Sciani (2012)

quantidade de grânulos repletos de espículas densas. Esses grânulos parecem se unir à membrana apical, entre as microvilosidades, liberando essas espículas para o exterior do espinho. Mais internamente, a porção celular ocupa as regiões radiadas formando os canais localizados em meio à matriz calcárea. Esses canais parecem ser revestidos por células achatadas com citoplasma rico em mitocôndrias, que isolam a porção celular da rígida porção calcárea. São nesses canais que estão contidas as células ricas em grânulos (figura 47), além de uma série de outros tipos celulares, todos aparentemente sem conexão entre si e portanto transitando livremente, provavelmente em um meio fluido. Um desses tipos celulares, provavelmente células mesenquimais primárias, apresenta citoplasma rico em vesículas contendo espículas densas semelhantes àquelas presentes nas estruturas periféricas descritas acima.

Para a identificação de uma matriz extracelular, cortes histológicos transversais foram corados com picrosirius e observados em microscopia para a identificação de fibras colágenas. Foi observado que toda a estrutura correspondente à parte celular apresentou um brilho em tonalidade avermelhada, indicando positividade ao colágeno (figura 49).

Figura 47 – Microscopia eletrônica de transmissão de uma célula contendo grânulos eletrodensos. Go = complexo de Golgi; g = grânulos; Nu = núcleo.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 48 – Estrutura localizada na periferia do espinho, correspondentes aos sulcos longitudinais.

Fonte: Sciani (2012)

Figura 49 – Corte do meio do espinho mostrando positividade ao colágeno.

Fonte: Sciani (2012)

5 DISCUSSÃO

Os métodos para a coleta e obtenção das duas amostras provenientes do ouriço *Echinometra lucunter* foram eficientes, já que foram observadas diversas moléculas em diferentes frações. Essas moléculas, tanto do líquido celômico quanto do espinho, não provêm de um lisado celular, já que cuidados foram tomados para que as células não fossem rompidas e para que fosse possível identificar, neste primeiro momento, moléculas secretadas (possíveis toxinas) e não aquelas provenientes do interior das células, como metabólitos secundários, sem relação necessária com o processo de defesa do animal.

Para validar dados do nosso modelo, as células contidas tanto no líquido celômico quanto no extrato de espinho foram propositadamente lisadas, e foi feito um gel de eletroforese dos lisados de cada amostra para comparação dos perfis eletroforéticos com os obtidos anteriormente. Pôde-se observar que os lisados produziram perfis completamente distintos dos extratos obtidos (dados não mostrados), reforçando a hipótese de que não há moléculas intracelulares envolvidas nas atividades tóxicas estudadas aqui. A resistência das células destas espécies foi demonstrada por Santos-Gouveia e Freire (2007), em um trabalho que mostrou que o ouriço *E. lucunter* tolera bem variações de salinidade da água, tanto em água muito salina quanto em pouco salina. Após o animal permanecer 5 dias imerso em águas com concentrações variadas de salina, não houve morte em nenhum dos animais e nem alterações em qualquer estrutura, vista microscopicamente, de acordo com os autores.

Além disso, os efeitos biológicos observados neste trabalho não são devidos à presença de micro-organismos, uma vez que os extratos foram plaqueados e não houve crescimento de fungos e/ou bactérias.

As moléculas obtidas nas nossas extrações, tanto do líquido celômico quanto do espinho, tiveram presença constante após várias coletas, em diferentes locais e em diferentes épocas do ano, em um *pool* de animais machos e fêmeas, jovens e adultos. Mesmo em diferentes condições, foi verificado um mesmo perfil cromatográfico por RP-HPLC dos extratos, o que indica que não houve variação do conteúdo de secreção de moléculas. Esse dado reforça a hipótese de que há secreção constitutiva de moléculas, que são importantes para o animal, seja pra sua defesa ou manutenção.

Embora as moléculas tenham vindo de extratos aquosos, o fracionamento por extração em fase sólida em cartucho C18, que visa separação de acordo com a hidrofobicidade das moléculas, foi bastante eficiente. Como era esperado, as frações F0 e F25, tanto do líquido celômico quanto do espinho, continham um número maior de moléculas. Por outro lado, o

fracionamento por outras técnicas cromatográficas, como gel filtração e troca iônica não apresentaram um perfil adequado, em termos de resolução, para o fracionamento do extrato bruto.

5.1 Peptídeo desgranulador de mastócitos, isolado do líquido celômico de *E. lucunter*

Uma molécula isolada do líquido celômico pôde ser correlacionada ao efeito inflamatório e hipernociceptivo, por ter causado recrutamento de leucócitos, edema de pata e diminuição do limiar de dor. Foi observado um processo inflamatório com a injeção do p10B, devido ao aumento de células em *rolling* 1 hora após a injeção, um pico de células aderidas 2 horas após e a contagem de muitas células migradas 4 horas após a administração do peptídeo. Além desses efeitos na microcirculação, foi observado um significativo edema de pata e hipernocicepção.

A inflamação foi iniciada rapidamente após a injeção de p10B, o que sugere que mediadores estocados, como a histamina, poderiam iniciar esse tipo de efeito. Além disso, o tratamento dos camundongos com o cromoglicato mostrou a importância da desgranulação dos mastócitos na inflamação observada com a injeção de p10B, sendo a histamina o principal mediador estocado nos mastócitos. Sendo assim, é pouco provável que haja participação de mediadores lipídicos, que são de ação mais lenta, já que estes têm que ser sintetizados. O desenvolvimento de edema também sugere a ação de histamina, um mediador que causa aumento intenso da permeabilidade vascular.

O p10B foi caracterizado como um peptídeo de 8 aminoácidos (LRKLMLQR), que, segundo o banco de dados de proteínas e peptídeos descritos, é similar a um fragmento da vitelogenina do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Dessa forma, esse peptídeo se trata de um criptídeo. Criptídeos são peptídeos bioativos gerados a partir da clivagem de uma proteína, que podem ser biologicamente relacionados à proteína original, mas também podem ter efeitos biológicos completamente diferentes (PIMENTA; LEBRUN, 2007).

A vitelogenina é uma proteína abundante do líquido celômico, tanto de machos quanto de fêmeas, e é precursora da MYP (*major yolk protein*), outra proteína muito abundante, encontrada em ovas de várias espécies de ouriço-do-mar. Em fêmeas, a vitelogenina é incorporada dentro de fagócitos nutritivos, como um estoque temporário, e então é transportada para ovócito para ser acumulada como MYP. Em machos, a vitelogenina também é acumulada dentro de fagócito como uma fonte de nutrientes para a espermatogênese (CERVELLO et al., 1994; UNUMA et al., 2009). A MYP é clivada por

catepsinas B, gerando proteínas de baixa massa molecular, com função de desenvolvimento embrionário (YOKOTA et al., 2003). A catepsina B, observada neste trabalho, poderia ser a enzima responsável pela clivagem da vitelogenina de *E. lucunter*, gerando o peptídeo LRKLMLQR, já que essa enzima cliva depois de arginina (último aminoácido do peptídeo) e depois de glicina, aminoácido imediatamente antes da primeira leucina do peptídeo, segundo a vitelogenina de *S. purpuratus*, depositada no banco de dados.

Takei, Nakagawa e Endo. (1993) mostraram que toxinas protéicas das pedicelárias do ouriço *Toxopneustes pileolus* causaram liberação de histamina dos mastócitos peritoneais de ratos.

Além disso, já foram relatados casos de anafilaxia com o consumo de ovas de ouriço-do-mar (HICKEY, 2007). Rodrigues et al. (2007) identificou um possível antígeno nas ovas do ouriço *Paracentrotus lividus*, uma proteína de 118 kDa, que foi capaz de aumentar os níveis de IgE no soro de pacientes. Por outro lado, Yamasaki et al., (2010) verificaram que o principal alérgeno era uma proteína de 160 kDa, identificada por espectrometria de massas como uma proteína principal das ovas, a MYP. Nenhuma destas proteínas poderia estar atuante em nossos experimentos, já que o que foi analisado proveio de um cromatografia fase reversa em coluna C18, totalmente incompatível com proteínas deste tamanho.

Na desgranulação mediada por IgE, o anticorpo se liga em receptores específicos de alta afinidade (FcεRI), presentes na membrana dos mastócitos. A ligação da IgE dispara uma cascata de fosforilação de proteínas intracelulares, modifica a estrutura do citoesqueleto da célula, permitindo a migração das vesículas contendo histamina, além da fusão das vesículas com a membrana plasmática do mastócito e consequente liberação de histamina (MACEDO, 2009).

Peptídeos desgranuladores de mastócitos atuam isoladamente, liberando histamina dos mastócitos, mas pode atuar também em conjunto com a IgE. Quando IgE não está presente, o peptídeo liga-se aos receptores FcεRI, mimetizando a ligação da molécula de IgE nesse mesmo receptor. Dessa forma, uma única molécula de peptídeo faz uma ligação entre duas moléculas IgE em suas porções Fab, ativando os receptores FcεRI e causando a desgranulação da célula (BUKU, 1999).

Insetos possuem conhecidos peptídeos desgranuladores de mastócitos, como os mastoparanos, em vespas. Esses peptídeos interagem com fosfolipídeos de membranas, independentemente de receptores específicos, formando poros e entrando na célula. Por essa razão, também são peptídeos hemolíticos e antimicrobianos (CABRERA et al., 2009). O p10B, apresentado nesse trabalho, causou atividade desgranuladora de mastócitos, porém não

foi hemolítico e nem antimicrobiano (dados não mostrados). Isso mostra uma atividade específica do peptídeo, e não simplesmente uma atividade pela interação com membranas celulares.

O p10B, um criptídeo derivado da vitelogenina, é capaz de ativar a desgranulação dos mastócitos. De acordo com os nossos experimentos, a desgranulação não ocorre devido ao aumento sérico de IgE e uma consequente reação de anafilaxia, já que os animais testados receberam somente uma dose de p10B – para que ocorra uma reação anafilática, é necessário que o antígeno entre em contato com o indivíduo pela segunda vez ou mais (MACEDO, 2009).

Apesar de não termos um mecanismo de ação elucidado para a ação desgranuladora do p10B, acreditamos que ele entre livremente no mastócito, sem que a membrana celular seja rompida, e inicie a sinalização intracelular para a migração das vesículas e a desgranulação, atuando, assim, como um CPP.

5.2 Presença de toxinas pró-inflamatórias no espinho de *E. lucunter*

Foi verificado que o extrato aquoso de espinho possui uma atividade pró-inflamatória, com aumento de adesão e migração de leucócitos e edema de pata, além de hipernocicepção. Uma molécula pôde ser atribuída a esses efeitos. Neste trabalho foram identificadas moléculas pró-inflamatórias tanto do líquido celômico quanto do espinho, que de, acordo com análises bioquímicas, ficou demonstrado se tratarem de duas moléculas distintas, uma de cada origem tecidual.

Sintomas de dor e inflamação local são descritos em casos clínicos de pessoas vítimas de acidentes por *E. lucunter*, quando entram em contato com os espinhos (ROSSETO; MORA; HADDAD JR, 2006). Ao nosso conhecimento, ainda não foi descrita a presença de veneno (ou toxinas, mais precisamente) nessa espécie de ouriço, e esses sintomas vem sendo atribuídos exclusivamente ao trauma mecânico da penetração dos espinhos na pele. Nesse trabalho, mostramos que além do trauma mecânico dos espinhos, há, indubitavelmente, a presença de toxinas que ajudam no desenvolvimento da inflamação e dor, por um mecanismo ainda não elucidado (SCIANI et al., 2011). A presença de toxinas deve então ser considerada, uma vez que os acidentes por essa espécie de ouriço-do-mar representam 50% dos acidentes causados por animais marinhos, em São Paulo (HADDAD JR, 2003). Embora esse tipo de acidente não leve o paciente à morte, causa um grande desconforto à vítima.

De um ouriço, foram retirados os espinhos primários, que foram cerca de 60, para uma estimativa da quantidade da toxina inflamatória presente em um animal. Com esses espinhos, foi feito o extrato aquoso e o fracionamento, até que se chegasse à molécula pura (p3E). Dessa forma, foi visto que há 200 µg dessa molécula em um animal, sendo cerca de 3 µg por espinho, o que torna considerável a ação dessa toxina nos acidentes, já que nos nossos testes 10 µg foi capaz de causar reações inflamatórias por alterações na microcirculação e hipernocicepção. No acidente com esse animal, certamente mais de um espinho penetra na pele da vítima.

A molécula isolada foi identificada como fórmula molecular $C_{28}H_{42}N_{10}O_5$, cuja massa molecular é 598,3409. Essa molécula é bastante hidrofílica, pois é eluída por RP-HPLC no início do gradiente em coluna C18, porém apresenta alguma hidrofobicidade, já que foi eluída na fração 25% de acetonitrila da extração em fase sólida. Essas características facilitam a penetração da molécula na pele da vítima, quando o espinho penetra e se quebra na pele.

Essa molécula apresenta uma estrutura linear, sem a presença de anéis aromáticos, e absorve em comprimentos de onda baixos (próximos a 220 nm). Isso mostra que essa molécula não corresponde a pigmentos, muito abundantes nos espinhos do ouriço, que absorvem em comprimentos de onda mais altos (KUWAHARA et al., 2010), confirmando a existência de moléculas de defesa, ou seja, toxinas no espinho de *E. lucunter*.

5.3 Atividade enzimática de catepsina B /ou X no espinho de *E. lucunter*

Experimentos de atividade enzimática foram feitos para verificar a presença de peptidases, moléculas sabidamente pró-inflamatórias. Além disso, catepsinas são enzimas proteolíticas associadas a processos de remodelamento de matrizes, como digestão de proteínas de ovócitos, ovos fertilizados e desenvolvimento larval. O processo de regeneração do espinho de *E. lucunter* foi observado neste trabalho, e, por essa razão, foi cogitada a participação de enzimas do tipo cisteíno peptidases, também envolvidas no processo de remodelação de matrizes ósseas e calcárias.

Wang et al. (2011) verificaram a participação de uma catepsina B no desenvolvimento larval e embriogênico do molusco bivalve *Meretrix meretrix*. Essa enzima, quando inibida, reduziu significativamente o crescimento da concha dos animais. Em peixes, as catepsinas estão envolvidas da digestão proteolítica da vitelogenina dos ovos, mas também podem ter função de defesa, quando presentes no muco de peixes adultos (MAGNADÓTTIR et al., 2004). A digestão da vitelogenina por uma peptidase similar à catepsina B também foi

descrita para mosquitos *Aedes aegypti*. Em nemátodos, catepsinas têm a função de remodelar a cutícula e a parede dos ovos, por estarem envolvidas na degradação de proteínas cuticulares (GIULIANO et al., 2004).

De acordo com a literatura, catepsinas K estão envolvidas com o remodelamento de ossos, particularmente na quebra da rede de colágeno. A remodelação do osso depende de síntese e reabsorção, processo que conta com a participação de peptidases que removem a matriz orgânica (predominantemente colágeno) e solubilizam o material mineral inorgânico (LECAILLE; BRÖMME; LALMANACH, 2008).

Dados de cinética enzimática mostraram que o extrato aquoso de espinho foi capaz de clivar os substratos sintéticos Z-R-MCA e Abz-GIVRAK(Dnp)-OH, na presença de DTT e houve inibição desta atividade por E-64. Esses dados, associados ao perfil da curva de pH, apontam para a presença de cisteíno peptidases. A clivagem do substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH indica a participação de cisteíno-peptidases do tipo exopeptidases, já que esse é um substrato com a porção C-terminal livre. Para confirmar esse dado, o extrato de espinho foi incubado com o substrato GIVRAK, porém com a porção C-terminal bloqueada (Abz-GIVRAKQ-EDDnp), e não foi observada clivagem. Esse dado reforça a participação de catepsinas exopeptidases e exclui a participação de enzimas endopeptidases, como a catepsina L ou K.

Para confirmar a presença de catepsinas B, foi feito *Western blotting* com anticorpos monoclonais específicos para essa enzima. Foi verificado o reconhecimento do extrato de espinho pelo anti-catepsina B. Embora tenham aparecido bandas entre 70 e 110 kDa, acima da faixa de massa molecular característica de catepsinas B (37,822 kDa, no caso humano), já foram descritas catepsinas B com massas moleculares mais altas. Por exemplo, Jerlstrom-Hultqvist et al. (2010) sequenciaram o genoma do parasita *Giardia intestinalis*, e encontraram uma proteína similar à catepsina B, com 86,782 kDa. Nesse mesmo desenho experimental, Mitreva et al. (2011) encontraram uma catepsina B no nemátoda *Trichinella spiralis* de 65,836 kDa.

O ponto de clivagem para o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH foi então determinado, a fim de se classificar a família e o clã da enzima presente no extrato aquoso de espinho. Foram identificados dois pontos de clivagem, com as seguintes proporções: 60% após alanina (atividade de carboxi-mono-peptidilpeptidase) e 40% após arginina (carboxi-di-peptidilpeptidase). Cotrin et al. (2004) verificaram que algumas catepsinas resultam nesses mesmos pontos de clivagem, utilizando esse mesmo substrato: a catepsina X cliva 100% após alanina e a catepsina B cliva 100% após a arginina, os pontos de clivagem obtidos com o

extrato aquoso de espinho. Esses dados, então, apontam para a atividade de catepsinas B e X, do espinho. Além disso, os valores de parâmetros cinéticos calculados por Cotrin, para o substrato Abz-GIVRAK(Dnp)-OH, com as catepsinas B e X, foram similares àqueles obtidos nesse trabalho: Cotrin calculou um K_M de 5,9 μM para a catepsina X e nós, 8,57 μM . Outras clivagens apresentadas por Cotrin foram 55% após valina e 45% após arginina, correspondentes à atividade da catepsina L. Esse dado, somado à ausência de atividade endopeptidase, excluem a presença de catepsina L.

Dois pontos de clivagem, assim como foi observado nesse trabalho, podem ser explicados pela modificação do mecanismo catalítico da catepsina X, que apresenta atividade carboxi-mono-peptidilpeptidase, e também carboxi-di-peptidilpeptidase. De acordo com análises estruturais do cristal da catepsina X, foi sugerido que o anel imidazol da histidina 23, carregado positivamente, pode ficar em duas conformações. Na conformação observada no cristal, esse anel pode se ligar a um grupo carboxil de um resíduo P1' do substrato, e pode formar uma ligação de hidrogênio adicional com o hidrogênio do triptofano. Por outro lado, estudos de modelagem da catepsina B sugerem que o anel da histidina 23 pode ocupar a posição do anel da histidina 110, por uma simples rotação sobre os ângulos χ_1 e χ_2 . Com anel na posição de histidina 23, na conformação da catepsina B, a catepsina X pode se ligar ao grupo carboxil do resíduo P2' do substrato. Embora a ligação não seja a mesma da catepsina B, devido a falta de uma histidina 111 equivalente, ambas as clivagens (mono e di-peptidilpeptidase) podem ocorrer (KLEMENČIČ et al., 2000).

Sendo assim, é inequívoca a presença de uma enzima catepsina X e talvez a catepsina B, de acordo com as atividades enzimáticas e pontos de clivagem observados. Essas enzimas podem participar do processo de regeneração do espinho, quando quebrado, assim como descrito para outros animais. Além disso, essa catepsina pode estar presente no líquido celômico, e clivar a vitelogenina, como já descrito por outros grupos, gerando o peptídeo inflamatório encontrado neste trabalho.

5.4 Morfologia dos espinhos de *E. lucunter*

Foi verificada a presença de células no espinho, localizadas entre a porção calcificada, concentradas mais na ponta do que na base, fato pouco descrito, já que os trabalhos apontam para a porção calcificada, e não celular. A concentração de células na ponta do espinho provavelmente se deve à participação de células na secreção de toxinas, como um mecanismo

de defesa para o animal, além da regeneração do espinho, quando quebrado. Na base, é necessária uma porção calcificada em maior quantidade, para dar sustentação ao espinho.

As células ricas em grânulos foram observadas tanto por microscopia de luz quanto por microscopia eletrônica de transmissão, e apresentam, além dos grânulos eletrodensos, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, caracterizando-as como tipicamente secretoras (WILT, 2002). Em animais venenosos, a observação de tipos celulares com essas características geralmente corresponde a células secretoras de venenos, liberados para a defesa dos animais. Neste trabalho foi obtido um extrato aquoso de espinho de *E. lucunter* com atividade pró-inflamatória, efeito que pôde ser atribuído a uma molécula isolada. A presença dessas toxinas indica um conteúdo secretado pelo espinho, que provavelmente vem dessas células secretoras.

Neste trabalho, foi identificada uma atividade enzimática de catepsina B e/ou X. Essas moléculas devem ser secretadas pelo espinho através de sua porção celular. Dentre as células presentes nos canais celulares no interior do espinho, as células secretoras que foram observadas contendo grânulos densos são as mais prováveis fontes de secreção dessas moléculas, já que secretam material protéico, que pode ser identificado através da positividade ao azul de bromofenol.

Catepsinas estão frequentemente associadas a matrizes de colágeno, onde ficam ancoradas (LION et al., 2009). O espinho de *E. lucunter*, que possui enzimas do tipo catepsina B/X, teve uma resposta positiva à microscopia de polarização após a coloração com picrossirius, o que indica a presença de uma matriz de colágeno. Além da atividade enzimática observada, a catepsina B pôde ser localizada imunohistoquimicamente em toda a malha celular do espinho, pelo reconhecimento do anticorpo anti-catepsina B.

Foi identificada uma estrutura celular única por microscopia eletrônica de transmissão, que se abre para o exterior por meio de fenestrações localizadas entre os sulcos longitudinais do espinho. Essa porção que se exterioriza provavelmente tem a função de captar micro ou macronutrientes, a fim de se manter a hemostasia do animal, ou ainda liberar moléculas para a proteção química do animal. Vesículas contendo espículas também foram observadas nessa estrutura única, e provavelmente são células mesenquimais primárias. Essas células são responsáveis pela formação de espículas e da carapaça do animal, sequestrando o cálcio da água do mar, metabolizando e formando a porção calcárea, além de armazenar as espículas (WILT, 2002).

A participação de proteínas no processo de formação dessas espículas tem sido descrito, o que reforça a nossa hipótese da participação de uma enzima na regeneração. Essas

células parecem ser importantes não só para o crescimento, mas também para a regeneração do espinho, já que foram observadas em animais adultos.

Quadro 1 – Resumo dos resultados referentes ao líquido celômico.

Fração	Atividade	Purificação (HPLC)	Estrutura
F25	Pró-inflamatória	p10B	LRKLMLQR
F25	Hipernociceptiva	p10B	LRKLMLQR
F75	Pró-inflamatória	-	-

Fonte: SCIANI (2012)

Quadro 2 - Resumo dos resultados referentes ao extrato aquoso de espinho.

Fração	Atividade	Purificação (HPLC)	Estrutura
F25	Pró-inflamatória	p3E	$C_{28}H_{42}N_{10}O_5$
F25	Hipernociceptiva	p3E	$C_{28}H_{42}N_{10}O_5$
F50	Pró-inflamatória	-	-
-	Enzimática	-	Catepsina B/X

Fonte: Sciani (2012)

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi mostrado que o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* possui toxinas, localizadas nos espinhos e no líquido celômico, capazes de causar efeitos pró-inflamatórios e hipernociceptivos.

No líquido celômico, foi encontrado um peptídeo que causa desgranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina, causando as reações de anafilaxia, observadas na clínica.

Nos espinhos, foi encontrada uma molécula orgânica pequena, que certamente contribui para o desenvolvimento dos sintomas observados na clínica, que antes eram somente atribuídos a simples penetração mecânica na pele da vítima. A presença de toxinas deve então ser considerada, uma vez que os acidentes por essa espécie de ouriço-do-mar representam 50% dos acidentes causados por animais marinhos, em São Paulo. Embora esse tipo de acidente não leve o paciente à morte, causa um grande desconforto à vítima.

Foi identificada uma estrutura secretora (células contendo grânulos secretores) nos espinhos, por estudos microscópicos. Essa pode ser a estrutura que armazena toxinas, que são liberadas quando o espinho é introduzido na pele e se quebra.

Além disso, foi identificada a atividade de uma enzima no espinho de *E. lucunter*, uma catepsina B e/ou X, que pode participar do processo de regeneração do espinho, quando quebrado.

REFERÊNCIAS¹

- AL-SHARIF, W. Z.; SUNYER, J. O.; LAMBRIS, J. D.; SMITH, L. C. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. **J. Immunol.**, v. 160, p. 2983–2997, 1998.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, R. R. N.; DIAS, T. L. P. Usos de invertebrados na medicina popular no Brasil e suas implicações para conservação. **Tropical Conservation Science**, v.3, p.159-174, 2010.
- ARIZZA, V.; GIARAMITA, F. T.; PARRINELLO, D.; CAMMARATA, M.; PARRINELLO, N. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v. 147, p. 389–394, 2007.
- BADEN, H. P. Injuries from sea urchins. **Clin Dermatol.**, v. 5, p. 112–117, 1987.
- BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc Res.**, v. 5, p. 384–394, 1973.
- BARRET, A. J. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, R., BOND, J. S. (Ed.). **Proteolytic enzymes: practical approach**. 2nd ed. Oxford: Oxford University press, 2001. p. 1–21.
- BATTAGLENE, S. C. Culture of tropical Sea cucumbers for stock restoration and enhancement. **The ICLARM Quarterly**, v. 22, n. 4, p. 4–11, 1999.
- BRIX, K.; DUNKHORST, A.; MAYER, K.; JORDANS, S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. **Biochimie**, v. 90, p. 194–207, 2008.
- BUKU, A. Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. **Peptides**, v. 20, p. 415–420, 1999.
- CABRERA, M. P. S.; ARCISIO-MIRANDA, M.; COSTA, L. C.; SOUZA, B. M.; COSTA, S. T. B.; PALMA, M. S.; NETO, J. R.; PROCOPIO, J. Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: a comparative biophysical study. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 486, p. 1–11, 2009.
- CARNEIRO, L. S.; CERQUEIRA, W. R. P. Informações sobre o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) para o litoral de salvador e adjacências. **Sitientibus série ciências biológicas**, v. 8, p. 168–171, 2008.
- CASO, M. E. Ciencia y técnica de los equinodermos en relación con el hombre. **Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología**, v. 5, n. 1, p. 255–286, 1978.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CASTILLO, J. D.; SMITH, D. S.; VIDAL, A. M.; SIERRA, C. Catch in the primary spines of the sea urchin *Eucidaris tribuloids*: a brief review and a new interpretaion. **Biol. Bull.**, v. 188, p. 120-127, 1995.
- CERVELLO, M.; ARIZZA, V.; LATTUCA, G.; PARRINELLO, N.; MATRANGA, V. Detection of vetellogenin in a subpopulation of sea urchin coelomocytes. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 64, p. 314-319, 1994.
- CHAPMAN, H. A.; RIESE, R. J.; SHI, G. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 63–88, 1997.
- CHAVE, K. E. A solid solution between calcite and dolomite. **J. Geol.**, v. 60, p.190–192, 1952.
- COTRIN, S. S.; PUZER, L.; JUDICE, W. A. S.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K.; JULIANO, M. A. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. **Anal. Biochem.**, v. 335, p. 244–252, 2004.
- CUEVAS, J. M. **O ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) como potencial recurso pesqueiro na costa sul da Bahia**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia aplicada) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, 2005.
- DE LA TORRE, C.; TORIBIO, J. Sea-urchin granuloma: histologic profile - a pathologic study of 50 biopsies. **J. Cutan. Pathol.**, v. 28, n. 5, p. 223–228, 2001.
- DHEILLY, N. M.; HAYNES, P. A.; BOVE, U.; NAIR, S. V.; RAFTOS, D. A. Comparative proteomic analysis of a sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) antibacterial response revealed the involvement of apextrin and calreticulin. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 106, p. 223–229, 2011.
- DHEILLY, N. M.; NAIR, S. V.; SMITH, L. C.; RAFTOS, D. A. Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: proteomic analysis identifies diversity within and between individuals. **J. Immunol.**, v. 182, p. 2203–2212, 2009.
- DINCER, T. A.; CAKLI, S. Chemical composition and biometrical measurements of the turkish sea urchin (*Paracentrotus lividus*, Lamarck, 1816). **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 27, p. 21–26, 2007.
- DUBOIS, P.; AMEYE, L. Regeneration of spines and pedicellariae in echinoderms: a review. **Microsc. Res. Tech.**, v. 55, p. 427–437, 2001.
- DUBOIS, P.; GHYOOT, M. Integumentary resorption and collagen synthesis during regression of headless pedicellariae in *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea). **Cell Tissue Res.**, v. 282, p. 297–309, 1995.
- EBERT, T. A.; SOUTHON, J. R. Red sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus*) can live over 100 years: confirmation with A-bomb 14 carbon. **Fish Bull.**, v. 101, n. 4, p. 915-922, 2003.

- ERICKSON, A. A.; PAUL, V. J.; ALSTYNE, K. L. V.; KWIATKOWSKI, L. M. Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 1883–1895, 2006.
- FARIA, M. T.; SILVA, J. R. M. C. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 98, p. 58–62, 2008.
- GHOSH, J.; BUCKLEY, K. M.; NAIR, S. V.; RAFTOS, D. A.; MILLER, C.; MAJESKE, A. J.; HIBINO, T.; RAST, J. P.; ROTH, M.; SMITH, L. C. Sp185/333: a novel family of genes and proteins involved in the purple sea urchin immune response. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 34, p. 235–245, 2010.
- GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 662–675, 1994.
- GROSS, P. S.; AL-SHARIF, W. Z.; CLOW, L. A.; SMITH, L. C. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 429–442, 1999.
- GUILIANO, D. B.; HONG, X.; MCKERROW, J. H.; BLAXTER, M. L.; OKSOV, Y.; LIU, J.; GHEDIN, E.; LUSTIGMAN, S. A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 136, p. 227–242, 2004.
- GUYOT-DROUOT, M. H.; ROUINEAU, D.; ROLLAND, J. M.; SOLAU-GERVAIS, E.; COTTON, A.; FLIPO, R. M.; et al. Arthritis, tenosynovitis, fasciitis, and bursitis due to sea urchin spines - a series of 12 cases in Reunion Island. **Joint Bone Spine**, v. 67, p. 94–100. 2000.
- HADDAD JR, V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 591–597, 2003.
- HADEL, V. F.; MONTEIRO, A. M. G.; DITADI, A. S. F.; THIAGO, C. G.; TOMMASI, L. R. *Echinodermata*. In: MIGOTTO, A. C.; THIAGO C. G. **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil**: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 260–271.
- HAGEN, N. T. Echinoculture, from fishery enhancement to closed cycle cultivation. **World Aquac.**, v. 1, p. 7–19, 1996.
- HAUG, T.; KJUUL, A. K.; STYRVOLD, O. B.; SANDSDALEN, E.; OLSEN, O. M.; STENSVÅG, K. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 81, p. 94–102, 2002.
- HEATFIELD, B. M.; TRAVIS, D. F. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. II. Cell types with spherules. **J. Morphol.**, v. 145, p. 51–71, 1975.

HENDLER, G.; MILLER, J. E.; PAWSON, D.; KIER, P. M. **Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1995.

HICKEY, R.W. Sea urchin roe (uni) anaphylaxis. **Ann. Allergy Asthma. Immunol.**, v. 98, p. 493-494, 2007.

HOPP, S.; HERDING, B. The boreholes of the sea urchin genus *Echinometra* (Echinodermata: Echinoidea: Echinometridae) as a microhabitat in tropical South America. **Mar. Ecol.**, v. 13, p. 181-186, 1996.

JANCAR, S. Imunidade inata e inflamação. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2009. p.17-39.

JERLSTROM-HULTQVIST, J.; FRANZEN, O.; ANKARKLEV, J.; XU, F.; NOHYNKOVA, E.; ANDERSSON, J. O.; SVARD, S. G.; ANDERSSON, B. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. **BMC Genomics**, v. 11, p. 543-543, 2010.

JOHNSON, P. T. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) - III. In Vitro Reaction to Bacteria. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 13, p. 42-62, 1969.

KABIGTING, F. D.; KEMPIAK, S. J.; ALEXANDRESCU, D. T.; YU, B. D. Sea urchin granuloma secondary to *Strongylocentrotus purpuratus* and *Strongylocentrotus franciscanus*. **Dermatol. Online J.**, v. 15, p. 9, 2009.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon.**, v., 34, p. 627-642, 1996.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KELLY, M. S. Echinoderms: their culture and bioactive compounds. **Progr. Mol. Subcell. Biol.**, v. 39, p. 139-165, 2005.

KLEMENČIČ, I.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KRIZAJ, I.; TURK, V.; TURK, B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5404-5412, 2000.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, K.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 13, p. 43-52, 1960.

KUWAHARA, R.; HATATE, H.; CHIKAMI, A.; MURATA, H.; KIJIDANI, Y. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. **Food Sci. Technol.**, v. 43, p. 1185-1190, 2010.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAWRENCE, J. M. On relationships between marine plants and sea urchins. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 13, p. 213-286, 1975.
- LEATHERBARROW, R. J. Grafit Version 3.0, Erithacus Software Ltd., Staines, UK, 1992.
- LECAILLE, F.; BRÖMME, D.; LALMANACH, G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. **Biochimie.** v. 90, p. 208-226, 2008.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 4459-4488, 2002.
- LI, C.; HAUG, T.; MOE, M. K.; STYRVOLD, O. B.; STENSVÅG, K. Centrocins: isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 34, p. 959-968, 2010.
- LIN, W.; ZHANG, H.; BECK, G. Phylogeny of natural cytotoxicity: cytotoxic activity of coelomocytes of the purple sea urchin, *Arbacia punctulata*. **J. Exp. Zool.**, v. 290, p. 741–750, 2001.
- LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Arch.**, v. 459, p. 657-669, 2010.
- LION, J. M.; MENTAVERRI, R.; ROSSARD, S.; JULLIAN, N.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J.; BRAZIER, M.; MAZIÈRE, J. C.; KAMEL S. Oligogalacturonic acid inhibit bone resorption and collagen degradation through its interaction with type I collagen, **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, p. 1448-1455, 2009.
- MACEDO, M. S. Hipersensibilidade imediata. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009. p. 17-39.
- MAGNADÓTTIR, B.; LANGE, S.; STEINARSSON, A.; GUDMUNDSDÓTTIR, S. The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.), **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 139, p. 217-224, 2004.
- MALLING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 191, p. 300-310, 1974.
- MARIANTE, F. L. F.; LEMOS, G. B.; EUTRÓPIO, F.J.; GOMES, L.C. Biologia reprodutiva de *Echinometra lucunter* (Echinodermata: *Echinoidea*) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. **Zoologia**, v. 26, p. 641–646, 2009.
- McCLANAHAN, T. R.; MUTHIGA, N. A. Ecology of *Echinometra*. In: LAWRENCE, J. M. **Edible sea urchins: biology and ecology**. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. v. 37, p. 297-317.

- McPHERSON, B. F. Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. **Bull. Mar. Sci.**, v. 19, p. 194-213, 1969.
- McWILLIAM, L.J.; CURRY, A.; ROWLAND, P.L.; WATSON, J.S. Spinous injury caused by a sea urchin. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 428, 1991.
- MITREVA, M.; JASMER, D. P.; ZARLENGA, D. S.; WANG, Z.; ABUBUCKER, S.; MARTIN, J.; TAYLOR, C. M.; YIN, Y.; et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Nature Genetics.**, v. 43, p. 228-235, 2011.
- MOUREAUX, C.; PEREZ-HUERTA, A.; COMPERE, P.; ZHU, W.; LELOUP, T.; CUSACK, M.; DUBOIS, P. Structure, composition and mechanical relations to function in sea urchin spine. **J. Struct. Biol.**, v. 170, p. 41-49, 2010.
- PANCER, Z. Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 97, p. 13156-13161, 2000.
- PHILLIPS, K.; HAMID, N.; SILCOCK, P.; DELAHUNTY, C.; BARKER, M.; BREMER, P. Effect of season on the sensory quality of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe. **J. Food Sci.**, v. 75, p. 20-30, 2010.
- PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: buried secrets in proteins. **Peptides.**, v. 28, p. 2403-2410, 2007.
- RANDALL, O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 111, p. 409-419, 1957.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 343-350, 2012.
- ROCHA, R.M. Echinodermata. In: RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2006. p. 198-213.
- ROCHA, G.; FRAGA, S. Sea urchin granuloma of the skin. **Arch. Dermatol.**, v. 85, p. 146-148, 1962.
- RODRIGUES, V.; BARTOLOMÉ, B.; ARMISÉN, M.; VIDAL, C. Food allergy to *Paracentrotus lividus* (sea urchin roe). **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 98, p. 393-396, 2007.
- ROSSETTO, A. L.; MORA, J. M.; HADDAD JR, V. Sea urchin granuloma. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 48, p. 303-306, 2006.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. (Ed.) **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SALVESEN, G. S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R.; BOND, J. S. (Ed.). **Proteolytic enzymes: practical approach**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 123-125.

SANTOS, R.; FLAMMANG, P. Morphometry and mechanical design of tube foot stems in sea urchins: a comparative study. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 315, p. 211-223, 2005.

SANTOS-GOUVEA, I. A.; FREIRE, C. A. Effects of hypo- and hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. **Zool. Stud.**, v. 46, p. 203-215, 2007.

SCHILLACI, D.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, N.; STEFANO, V. Di; FANARA, S.; MUCCILLI, V.; CUNSOLO, V.; HAAGENSEN, J. J. A.; MOLIN, S. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 17-24, 2009.

SCIANI, J. M.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R. C.; NOGUEIRA, T. O.; GIORGI, R.; PIMENTA, D. C. Pro-inflammatory effects of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* sea urchin spines. **Exp. Biol. Med.**, v. 236, p. 277-280, 2011.

SMITH, L. C.; BRITTEN, R. J.; DAVIDSON, E. H. Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 19, p. 217, 1995.

SMITH, L. C.; CHANG, L.; BRITTEN, R. J.; DAVIDSON, E. H. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. **J. Immunol.**, v. 156, p. 593-602, 1996.

SMITH, L. C.; DAVIDSON, E. H. The echinoderm immune system: characters shared with vertebrate immune systems, and characters arising later in deuterostome phylogeny. In: **Primordial immunity: foundations for the vertebrate immune system**. New York: Academy of Sciences, 1994, v. 712, p. 213-226.

SMITH, L. C.; SHIH, C. S.; DACHENHAUSEN, S. G. Coelomocytes specifically express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. **J. Immunol.**, v. 161, p. 6784-6793, 1998.

STACHOWIAK, K.; TOKMINA, M.; KARPIŃSKA, A.; SOSNOWSKA, R.; WICZK, W. Fluorogenic peptide substrates for carboxydipeptidase activity of cathepsin B. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, p. 81-92, 2004.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Filo Echinodermata: Echinodermos. In: _____. **Zoologia geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2007. v. 8, p. 546-564.

SUMAGIN, R.; SARELIUS, I. H. TNF- α activation of arterioles and venules alters distribution and levels of ICAM-1 and affects leukocyte-endothelial cell interactions. **Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 291, p. 2116-2125, 2006.

TAKEI, M.; NAKAGAWA, H.; ENDO, K. Mast cell activation by pedicellarial toxin of sea urchin, *Toxopneustes pileolus*. **FEBS**, v. 328, p. 59-62, 1993.

TAVARES, Y. A. G. **Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral**

paranaense, Brasil. 2004. 190 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

THERRIEN, C.; LACHANCE, P.; SULEA, T.; PURISIMA, E. O.; QI, H.; ZIOMEK, E.; ALVAREZ-HERNANDEZ, A.; ROUSH, W. R.; MÉNARD, R. Cathepsins X and B can be differentiated through their respective mono- and dipeptidyl carboxypeptidase activities. **Biochemistry**, v. 40, p. 2702-2711, 2001.

TWINING, S. S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. **Anal. Biochem.**, v.143, p. 30-34, 1984.

UNUMA, T.; KONISHI, K.; KIYOMOTO, M.; MATRANGA, V.; YAMANO, K.; OHTA, H.; YOKOTA, Y. The major yolk protein is synthesized in the digestive tract and secreted into the body cavities in sea urchin larvae. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 76, p. 142–150, 2009.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Ther.**, v. 112, p. 116-138, 2006.

YAMASAKI, A.; HIGAKI, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAMOTO, O.; HEIN, K.Z.; TAKAHASHI, H.; CHINUKI, Y.; MORITA, E. Identification of a major yolk protein as an allergen in sea urchin roe. **Acta. Derm. Venereol.**, v. 90, p. 235–238, 2010.

YOKOTA, Y.; UNUMA, T.; MORIYAMA, A.; YAMANO, K. Cleavage site of a major yolk protein (MYP) determined by cDNA isolation and amino acid sequencing in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v.135, p. 71-81, 2003.

WADA, T.; SOMA, T.; GAMAN, K.; USUI, M.; YAMASHITA, T. Sea urchin spine arthritis of the hand. **J. Hand Surg. Am.**, v. 33, p. 398-401, 2008.

WANG, X.; LIU, B.; TANG, B.; XIANG, J. Potential role of cathepsin B in the embryonic and larval development of clam *Meretrix meretrix*. **J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.**, v. 316, p. 306-312, 2011.

WARIN, A. P. Sea-urchin granuloma. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 2, p. 405-407, 1977.

WEINER, S. Organic matrix-like macromolecules associated with the mineral phase of sea-urchin skeletal plates and teeth. **J. Exp. Zool.**, v. 234, p. 7–15, 1985.

WEINER, S.; ADDADI, L.; WAGNER, H.D. Materials design in biology. **Mat. Sci. and Eng. C**, v. 11, p. 1-8, 2000.

WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem. J.**, v. 80, p. 324-332, 1961.

WILT, F. H. Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos. **Zool. Sci.**, v. 19, p. 253–261, 2002.

APÊNDICE A - Artigo publicado em periódico, no tema da tese

SCIANI, J.M.; ZYCHAR, B.C.; GONÇALVES, L.R.C.; NOGUEIRA, T.O.; GIORGI, R.; PIMENTA, D.C. Pro-inflammatory effects of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* sea urchin spines. **Exp. Biol. Med.**, v. 236, p. 277-280, 2011.

Pro-inflammatory effects of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* sea urchin spines

Juliana Mozer Sciani^{1,2}, Bianca Cestari Zychar³, Luis Roberto de Camargo Gonçalves³, Thiago de Oliveira Nogueira³, Renata Giorgi³ and Daniel Carvalho Pimenta^{1,2}

¹Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo; ²Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo, 11600-000, São Sebastião; ³Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author: Daniel Carvalho Pimenta, Avenida Vital Brazil, 1500, São Paulo – SP, Brazil. Email: dcpimenta@butantan.gov.br

Abstract

The sea urchin, *Echinometra lucunter*, can be found along the Western Central Atlantic shores. In Brazil, it is responsible by circa 50% of the accidents caused by marine animals. The symptoms usually surpass trauma and may be pathologically varied and last differently, ranging from spontaneous healing in a few days, to painful consequences lasting for weeks. In this work, we have mimicked the sea urchin accident by administering an aqueous extract of the spine into mice and rats and evaluated the pathophysiological developments. Our data clearly indicate that the sea urchin accident is indeed a pro-inflammatory event, triggered by toxins present in the spine that can cause edema and alteration in the leukocyte–endothelial interaction. Moreover, the spine extract was shown to exhibit a hyperalgesic effect. The extract is rich in proteins, as observed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, but also contains other molecules that can be analyzed by reversed phase high-performance liquid chromatography. Altogether, these effects corroborate that an *E. lucunter* encounter is an accident and not an incident, as frequently reported by the victims.

Keywords: *Echinometra lucunter*, toxins, inflammation, hyperalgesia

Experimental Biology and Medicine 2011; **236**: 277–280. DOI: 10.1258/ebm.2010.010257

Introduction

Echinometra lucunter (Echinodermata: Echinoidea) (Linnaeus, 1758) is an edible widespread sea urchin species, commonly found in the Western Central Atlantic. In Brazil, it is the most abundant sea urchin species.¹ The outer bodies of sea urchins are covered by appendages (calcified spines, in the case of *E. lucunter*) that are mainly involved in the passive and/or active defense of the animal.² This characteristic, associated to its human beloved habitat, makes this urchin responsible by circa 50% of the accidents caused by marine animals in Brazil.³

Symptoms from sea urchin accidents usually surpass trauma and may be pathologically varied. Spine penetration causes intense and immediate pain, bleeding, erythema, edema and local myalgia.^{4–6} Without treatment, these acute symptoms usually spontaneously heal in a few days, or weeks in the worst cases. However, injuries may complicate due to secondary infections or the development of a chronic inflammatory response, normally associated to the presence of spine fragments and a resultant granuloma formation.^{7–9}

Taking into account the clinical reports of often painful Brazilian sea urchin accidents, we have assessed the pro-inflammatory activities of the aqueous spine extract of *E. lucunter*. In order to achieve this, initial biochemical characterization was performed and the main symptoms observed in the victims were mimicked by *in vitro* and *in vivo* assays.

Material and methods

Sea urchins and aqueous extract collection

Specimens of *E. lucunter* were collected in São Paulo, Brazil (23°49'53"S; 45°31'18"W), under license number 13852-1 from the Brazilian Environmental Agency (IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Animals were collected without distinction of sex, age or size. A hundred and fifty spines were removed from five animals, washed very quickly with distilled water and immediately immersed in ammonium acetate (100 mmol/L, pH 7.5) for 24 h, at 4°C. The solution was centrifuged and the supernatant was lyophilized and diluted in

sterile saline solution or in compatible buffers, depending on the subsequent assay.

Biochemical characterization

In order to assess the protein contents of the *E. lucunter* spine extract, a 12% polyacrylamide gel electrophoresis, containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), was performed, in reducing conditions, according to Laemmli.¹⁰ The aqueous extract also was analyzed by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a binary HPLC system (20A Prominence, Shimadzu Co, Kyoto, Japan), in a C18 column (ACE C18, 5 μ m, 100 Å, 50 mm $\times$ 4.6 mm) with trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O (1:1000) and TFA/acetonitrile (ACN)/H₂O (1:900:100) solvents (A and B, respectively). The column was eluted at a constant flow rate of 1.2 mL/min with a 0–100% gradient of solvent B over 10 min.

Biological assay

Male Swiss mice (20–25 g) and male Wistar rats (180 g) used in experiments were treated and maintained under ethical conditions at animal housing facilities of Instituto Butantan (protocol 438/07).

Leukocyte responses within mouse cremaster venules were assessed by intravital microscopy. Aqueous extract (10 μ g/100 μ L) or sterile saline (control) were injected in mice ($n = 5$), into the subcutaneous tissue of the scrotal bag. After 2, 4, 24 or 48 h, animals were anesthetized with injection (subcutaneously) of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and the cremaster muscle was exteriorized for microscopic examination *in situ* as previously described by Baez.¹¹

Paw edema was induced by intraplantar injection of 10 and 20 μ g of aqueous extract (diluted in 30 μ L of sterile saline), into the footpad of mice ($n = 5$). The contralateral paw received the same volume of saline (control paw). Paw edema was evaluated by a plethysmometer (Letica, Barcelona, Spain) at 15, 30 min, 1, 2, 3 and 4 h after injection. The results were expressed as the difference (%) of volume between paws injected with extract and saline.

Rats ($n = 8$) were evaluated by the paw pressure test before and at different times (1, 2 and 4 h) after intraplantar injection of the spine aqueous extract (10 and 20 μ g) or sterile saline (control). The pain threshold was measured using an Ugo Basile® pressure apparatus, essentially as described elsewhere.¹²

The hemorrhagic activity of aqueous extract was verified, according to the modified method described by Kondo *et al.*¹³ Briefly, 10 and 20 μ g of the spine aqueous extract were injected (intradermic route) into the abdominal skin of mice ($n = 5$). Three hours after injection, animals were euthanized, and the skin was removed in the area of injection to determine hemorrhagic spots in the internal face of the skin.

The results are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). Statistical evaluation of data was carried out by Student's *t*-test or repeated-measures two-way analysis of variance followed by Bonferroni post-test

(GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc, LaJolla, CA, USA). Differences of results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Biochemical characterization

The aqueous extract of *E. lucunter* spines presented a number of proteins, ranging from ~ 15 to ~ 150 kDa (Figure 1a). One must take into account that it is a buffered aqueous extract and not a cell lysate; therefore, the presence of such numerous proteins is noteworthy. RP-HPLC analysis (Figure 1b) shows that the vast majority of the extract eluted at the void volume, which reaches up to 1 AU, but there are several molecules eluting along the gradient, which are very likely not to be proteins. Except for peaks eluting at ~ 6 to $\sim 8'$ that present some 254–280 nm

Figure 1 Biochemical characterization of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* spines. (a) Silver-stained 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of 50 μ g extract. MMS, Molecular mass standards (Broad range; Amersham Biosciences, Waukesha, WI, USA). Some of the bands of the marker are indicated by arrows. (b) C18 RP-HPLC profile of aqueous extract from *E. lucunter* spine, monitored at 214 nm

absorbance, all other peaks presented maximum absorbance at 214–222 nm (data not shown, photodiode array detection).

Biological assay

Significant cell recruitment could be observed two hours after the 10 μ g spine aqueous extract administration, as assessed by the increased rolling cells count that also significantly adhered and migrated (Figure 2). At four hours, rolling had diminished, while adhesion and migrated cells were still increasing. Adhesion and migration reached a maximum after 24 h, while rolling decreased, once all adhered cells migrated. After 48 h, rolling cells have returned to the basal state, indicating the end of inflammation; nevertheless, few adhered and migrated cells could still be observed.

Intraplantar administration of the aqueous extract (10 and 20 μ g) was able to induce a dose-dependent paw edema

Figure 2 Alterations on leukocyte–endothelium interactions induced by aqueous extract from *Echinometra lucunter* spine (10 μ g). The counting of rolling, adhered and migrated cells are represented in 2, 4, 24 and 48 h after injection. Data are present as mean $\pm$ SEM ($n = 5$). *Indicates $P < 0.05$ compared with the respective control group

Figure 3 Edematogenic effect caused by aqueous extract from *Echinometra lucunter* spine on mice ($n = 5$). Data are present as mean $\pm$ SEM of the difference (%) in volumes of paw inject with extract and saline. Black circles correspond to 10 μ g and white circles correspond to 20 μ g. *Indicates $P < 0.05$

(Figure 3). Although not intense (28%, in comparison to saline administration), this event was both rapidly triggered and dose dependent ($P < 0.05$).

The pain threshold significantly diminished one hour after the aqueous extract injection for both groups (10 and 20 μ g), in comparison to the control group, as depicted in Figure 4. After two hours, the animals that received 20 μ g of extract still presented a diminished pain threshold. Only four hours after the aqueous extract administration did the pain threshold value return to the initial level for the 20 μ g group.

No hemorrhagic effect could be observed for 10 and 20 μ g of the aqueous extract, at the tested conditions (data not shown).

Discussion

The protein nature of the *E. lucunter* aqueous extract indicates that the spine is a rich environment in which active and seemingly constitutive secretory pathways take place. It is noteworthy that these proteins are present in the

Figure 4 Effects of aqueous extract from *Echinometra lucunter* spine (10 and 20 μ g) on mechanical hyperalgesia of rats. Pain threshold in response to mechanical stimulation was measured before (basal measurement) and after treatment using the paw pressure test. Data are present as mean $\pm$ SEM. *Indicates $P < 0.05$

aqueous extract and are not originated from a cell lysate. Furthermore, the RP-HPLC analysis indicates that there is also a number of non-protein components present in the spine aqueous extract.

Our experimental model successfully reproduced the main pharmacological symptoms usually described by the sea urchin victims, as reported by the coastal medical facilities and the scientific literature.^{3,7} According to our results, the main pathological effect observed was inflammation, by alterations in the leukocyte-endothelial interactions, edema as well as hyperalgesia. It is noteworthy to mention that the spines' extraction buffer was inoculated in both bacterium and fungus-specific growth media and no colony formation could be observed, corroborating the fact that all pharmacological effects reported here originated from the urchin itself.

In this work, we demonstrated for the first time, that the aqueous extract of *E. lucunter* spines is rich in toxins, e.g. molecules that may take part in the protection of the animal, as an additional defense mechanism to the spine puncturing itself. Identification of the toxins secreted into the spine, responsible for the effects observed in this work is currently ongoing. Altogether, these results may lead to the development of proper treatment for the sea urchin victims, one that could cause faster relief and better recovery, in addition to the recommended precocious removal of the spines.

Author contributions: All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; JMS and DCP were responsible for collection of sea urchins and obtainment of aqueous extract of spines, conducted biochemical experiments and wrote the manuscript; BCZ and LRCG conducted experiments of leukocyte-endothelium interaction and hemorrhagic studies; TON and RG performed paw pressure test and paw edema experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by funds provided by FAPESP (2007/02476-1 [DCP], 2007/08478-6 [JMS]) and CNPq 470873/2007-8 (DCP). DCP is also a CNPq fellow researcher 302405/2008-9 and member of the INCTTOX PROGRAM - CNPq/FAPESP.

REFERENCES

- Hiratsuka Y, Uehara T. Feeding rates and absorption efficiencies of four species of sea urchins (genus *Echinometra*) fed a prepared diet. *Comp Biochem Physiol Part A* 2007;**148**:223-9
- Dubois P, Ameye L. Regeneration of spines and pedicellariae in echinoderms: a review. *Microsc Res Tech* 2001;**55**:427-37
- Haddad V Jr, Lupi O, Lonza JP, Tyring SK. Tropical dermatology: marine and aquatic dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2009;**61**:733-50
- Cracchiolo A, Goldberg L. Local and systemic reactions to puncture injuries by the sea urchin spine and the date palm thorn. *Arthritis Rheum* 1977;**20**:1206-12
- Smith ML. Skin problems from marine echinoderms. *Dermatol Ther* 2002;**15**:30-3
- Nassab R, Rayatt S, Peart F. The management of hand injuries caused by sea urchin spines. *J Hand Surg Br* 2005;**30**:432-3
- Rossetto AL, Mora JM, Haddad V Jr. Sea urchin granuloma. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006;**48**:303-6
- Rocha G, Fraga S. Sea urchin granuloma of the skin. *Arch Derm* 1962;**85**:406-8
- Kabigting FD, Kempia SJ, Alexandrescu DT, Yu BD. Sea urchin granuloma secondary to *Strongylocentrotus purpuratus* and *Strongylocentrotus franciscanus*. *Dermatol Online J* 2009;**15**:9
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-5
- Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by *in vivo* microscopy. *Microvasc Res* 1973;**5**:384-94
- Randall O, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;**111**:409-19
- Kondo H, Kondo S, Ikezawa K, Murata R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol* 1960;**13**:43-52

(Received August 25, 2010, Accepted December 15, 2010)

APÊNDICE B - Artigo submetido para periódico, no tema da tese

SCIANI, J. M.; ANTONIAZZI, M. M.; NEVES, A. C.; PIMENTA, D. C. Cathepsin B/X is secreted by *Echinometra lucunter* sea urchin spines, a structure rich in granular cells and toxins.

APÊNDICE C - Matéria de revista

FIORAVANTI, C. Venenos mutantes. **Revista FAPESP**; v. 182, p. 52-55, 2011.

Venenos mutantes

Animais da
mesma espécie
têm peçonhas
diferentes

CARLOS FIORAVANTI

U ma mesma espécie de sapo, a *Rhinela granulosa*, produz venenos diferentes quando vive na caatinga ou em florestas como a mata atlântica. Uma jararaca da região amazônica, a *Bothrops atrox*, fabrica venenos de composição distinta no Maranhão ou no noroeste do Amazonas. Em um mesmo local, jararacas machos e fêmeas injetam em suas presas venenos com componentes distintos. A composição e, portanto, a letalidade dos venenos podem variar em um mesmo animal: uma espécie de anfíbio – a cobra-cega *Siphonops annulatus* – produz toxinas diferentes na cabeça e na cauda, por onde é mais atacada quando se enterra ou entra em buracos. Já as abelhas produzem venenos com cheiro que lembra o de mel e ingredientes que variam de acordo com a temperatura e a estação do ano.

Antes pouco diferenciadas, essas misturas de toxinas estão ganhando identidades próprias, à medida que seus ingredientes e as prováveis funções biológicas de cada um deles se tornam mais conhecidos nos laboratórios do Instituto Butantan, o centro nacional de referência na produção de soros contra animais peçonhentos. A eficácia dos tratamentos, agora está claro, poderá ser ampliada à medida que se agregarem informações sobre a origem, o ambiente, a idade e a dieta do animal peçonhento: o soro para a picada de uma jararaca de São Paulo pode não servir para aplacar totalmente os efeitos da picada de uma espécie do norte do país. As *Bothrops* respondem por cerca de 80% dos 20 mil acidentes com cobras registrados por ano no Brasil, com uma mortalidade de 10% entre as pessoas que não tomaram soro, enquanto as cascavéis são responsáveis por cerca de 10% dos casos, embora com 75% de mortalidade.

O conhecimento crescente sobre os componentes dos venenos pode ser útil para tratar até mesmo acidentes com animais menos perigosos como os ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*, causa comum de ferimentos no litoral. “O veneno desse ouriço não mata, mas merece respeito”, diz Daniel Carvalho Pimenta, pesquisador do Butantan. Sob sua orientação, Juliana Sciani analisou o veneno liberado pelo espinho do ouriço e verificou que o inchaço – ou granuloma – do local da espetada é um sinal de uma reação inflamatória intensa, que pode durar dias, embora geralmente não mereça muita atenção. Por essa razão, diz ele, “receitar um anti-inflamatório e um analgésico pode ajudar muito depois da picada”.

Para os animais, os venenos expressam as estratégias de sobrevivência. “O veneno facilita a vida das cobras venenosas, que podem ser magrinhas, enquanto as jiboias, que não são

Esqueleto e
veneno
(ao lado)
de
cascavel

Variação mensal da produção de melitina e fosfolipase A2

FONTE: DANIEL C. PIMENTA / INSTITUTO BUTANTAN

**Abelhas:
composição do
veneno varia ao
longo do ano**

peçonhentas, têm mais trabalho para se alimentar: elas matam as presas enrolando-se nelas e sufocando-as”, observa Carlos Jared, biólogo do Butantan que há duas décadas investiga a origem e as prováveis funções dessas misturas de toxinas que representam a continuidade da vida para uns e o fim da vida – ou ao menos muita dor – para outros.

Matar ou apenas espantar - Jared sabe bem o que uma cobra pode causar: já foi picado três vezes, na primeira por uma cascavel e nas outras duas por jararacas. Por sorte, estava no próprio Butantan e o atendimento foi rápido. Em 1984, ele demonstrava para um grupo de visitantes como um par de botas recém-importadas poderia evitar a picada de uma cascavel. Ele esticou a perna, a cascavel atacou, mas a bota não barrou a picada, como todos esperavam. “Senti os dentes da cascavel injetando o veneno na minha perna. Eu sempre dizia que temos de manter a calma nessas horas, mas naquele momento não consegui. Nunca corri tão rápido até o hospital.”

O veneno é uma forma de defesa de que muitos animais se valem para caçar ou evitar que sejam caçados. Enquanto cobras, escorpiões e aranhas atacam ao menor sinal de perigo ou de

**Por mecanismos
ainda pouco
conhecidos, um
gambá brasileiro
é imune ao veneno
da jararaca e
parcialmente imune
ao da cascavel**

alimento por perto, os anfíbios – sapos, rãs e pererecas – preferem afugentar em vez de matar, adotando o que Jared chama de veneno pedagógico. Jared e sua equipe têm visto que as *Rhinella*, diante de possíveis predadores, enchem os pulmões de ar, estufam o corpo e deixam as glândulas chamadas paratoides prontas para esguichar veneno. Ao morder os sapos, os animais da floresta ou os cães domesticados apertam as glândulas, que liberam um líquido leitoso tóxico diretamen-

te na boca do predador, causando taquicardia e vômitos. Uma perereca-verde do grupo das *Phyllomedusa* adota uma tática defensiva mais refinada: ela se deixa comer e, enquanto o predador a engole, libera substâncias que provocam o vômito; em menos de um minuto a perereca sai pulando enquanto o predador permanece entorpecido e faminto.

Às vezes o veneno depende da dieta. Os dendrobates – rãs de pele de cor azul, verde ou amarela de no máximo três centímetros que vivem principalmente na Amazônia – se alimentam de formigas, besouros ou ácaros que, por sua vez, se alimentam de fungos venenosos. Os dendrobates sequestram esse veneno, que se acumula nas glândulas da pele. É assim que uma espécie de dendrobates, a *Phylllobates terribilis*, incorpora a poderosa batracotoxina, produzida por besouros e talvez por outros insetos. Jared comparou a letalidade dos venenos da *Phylllobates* e da jararaca e concluiu que o primeiro, da rã, é 8.750 vezes mais letal. Um pássaro da Papua-Nova Guiné, o *Pitohui dichrous*, também come desses besouros e libera essa toxina pe-

la pele e penas. Se a alimentação muda, o veneno desaparece. Os dendrobates mantidos nos viveiros do Butantan, que comem baratinhas, são inócuos. “Na verdade”, diz Jared, “eles eram venenosos, mas não estão venenosos”.

Nem sempre é assim. Pimenta analisou o veneno de cinco grupos de espécies-irmãs das *Rhinella*, que viviam na caatinga, na Amazônia ou em cativeiro. Externamente, todos são amarelados, com uma consistência próxima à do látex da seringueira, e secam rapidamente. A composição geral era a mesma. Já as abelhas *Apis mellifera*, provavelmente em resposta a variações de temperatura, produzem venenos de composição distinta no inverno e no verão, podendo causar diferentes tipos de reações alérgicas. Somente no inverno é que fazem uma variante – ou isoforma – do antígeno predominante, a melitina, em uma proporção maior que os principais componentes do veneno de verão. “Os soros experimentais contra as picadas de *Apis* só funcionam às vezes, talvez por não levarem em conta essas variações”, diz Pimenta.

Dos gosmentos aos diáfanos – A composição do veneno de dois representantes da mesma espécie de jararaca, uma do Maranhão e outra do Amazonas, também pode variar e induzir à produção de diferentes grupos de anticorpos, de acordo com um estudo de Maria de Fátima Furtado e outros pesquisadores do instituto paulista. Como explicar as variações de venenos em seres da mesma espécie que vivem em lugares diferentes? “Esse pode ser um sinal de que o bicho está mudando e outra espécie se formando”, comenta Jared. “Em alguns milhares de anos, talvez sejam espécies completamente distintas.”

Pimenta está vendo que venenos evoluem, passando de misturas rudimentares como a gosma amarelada e insolúvel de um anfíbio como a cobra-cega para líquidos transparentes e cristalinos como o veneno de pererecas, aranhas e escorpiões. “Os venenos dos animais mais primitivos consistem principalmente de proteínas, cuja produção exige um alto custo energético, e de alcaloides, moléculas bem menores que as proteínas”, diz ele. É o caso do veneno da jararaca, amarelo viscoso por causa da elevada quantidade de

Ouriço: depois de uma espetada, um anti-inflamatório pode ser útil

JULIANA SCIANI / INSTITUTO BUTANTAN

proteínas. “Na outra ponta, temos venenos com muitos peptídeos, de custo energético menor, e esteroides, cuja estrutura química permite muitas variações”, acrescenta, exemplificando com o veneno de escorpião, líquido incolor e fluido, formado principalmente por peptídeos.

Ainda não há regras claras sobre a variabilidade química dos venenos dentro das mesmas espécies. O da cascavel varia pouco e apresenta cerca de 10 componentes básicos, principalmente enzimas que, em segundos, paralisam os músculos e o sistema nervoso de outros animais, de acordo com um estudo de Airton Lourenço Jr., da Universidade Estadual Paulista (Unesp), com base em 112 amostras, colhidas de serpentes jovens e adultas de diferentes regiões do país ou de cativeiro.

No entanto, verificou Pimenta, o da jararaca é uma mistura de centenas de componentes de proporção variável, principalmente peptídeos e enzimas que corroem a pele e o tecido conjuntivo das presas, iniciando a digestão. “A composição dos venenos pode ser redundante, com muitas moléculas com a mesma função, de modo a compensar as variações dos mecanismos de defesa das presas”, diz ele. Às vezes aparecem moléculas sem uma função biológica clara. Podem ser resquícios de outros tempos, na avaliação de Osvaldo Augusto Sant’Anna, pesquisador do Butantan e coordenador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas. “Componentes dos venenos hoje sem uma função biológica aparente podem ter sido essenciais para a sobrevivência de uma espécie, tendo

se conservado ao longo da evolução, e talvez um dia voltem a ser necessários”, diz ele. “Do mesmo modo que reconhecemos a diversidade entre os *Homo sapiens*, identificando os indivíduos com suas características próprias, devemos reconhecer que há diversidade em uma mesma espécie de *Bothrops*.”

Os mecanismos de defesa que permitem a aves, às próprias cobras e a alguns mamíferos resistir a venenos normalmente letais também permanecem incertos. A boipeva (*Xenodon merremii*), uma serpente agressiva, embora não venenosa, especializou-se em comer sapos venenosos, os corpulentos *sapos-cururus*, do gênero *Rhinella*, antes chamado de *Bufo*. Um gambá brasileiro, o *Didelphis aurita*, da mata atlântica, é totalmente imune ao veneno das jararacas e parcialmente imune ao da cascavel. Quando não têm imunidade, os animais adotam outro comportamento. Os quatis (*Nasua nasua*) escalpelam os sapos, raspando-os em pedras até tirarem a pele com as glândulas de veneno, comendo só a carcaça – mesmo quando estão em viveiros, longe da mata. ■

Artigos científicos

1. JARED, C. *et al.* Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defense. *Toxicon*, v. 54, p. 197-207. 2009.
2. FURTADO, M.F. *et al.* Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. *Toxicon*, v. 55, p. 881-7. 2010.
3. FERREIRA JR., R.S. *et al.* Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, v. 56, p. 355-62. 2010.

APÊNDICE D - Artigos publicados em periódicos, em colaboração

PRATES, I.; ANTONIAZZI, M. M.; SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F.; JARED, C. Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. **J. Morphol.**, v. 273, p. 279-290, 2012.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO JR, A.; ORSI, R. O.; FERREIRA JR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptides**, v. 31, p. 1473-1479, 2010.

FERREIRA JR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. **Toxicon**, v. 56, p. 355-362, 2010.

PICOLO, G.; HISADA, M.; MOURA, A. B.; MACHADO, M. F.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; MELO, R. L.; OLIVEIRA, V.; LIMA-LANDMAN, M. T.; CURY, Y.; KONNO, K.; HAYASHI, M. A. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. **Biochem Pharmacol.**, v. 79, p. 478-486, 2010.

Skin Glands, Poison and Mimicry in Dendrobatid and Leptodactylid Amphibians

Ivan Prates,¹ Marta M. Antoniazzi,¹ Juliana M. Sciani,² Daniel C. Pimenta,² Luís Felipe Toledo,³ Célio F.B. Haddad,⁴ and Carlos Jared^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

²Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

³Museu de Zoologia Prof. Adão José Cardoso, Universidade de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil

⁴Departamento de Zoologia, IB, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, Brazil

ABSTRACT In amphibians, secretions of toxins from specialized skin poison glands play a central role in defense against predators. The production of toxic secretions is often associated with conspicuous color patterns that warn potential predators, as it is the case of many dendrobatid frogs, including *Ameerega picta*. This species resembles the presumably nontoxic *Leptodactylus lineatus*. This study tests for mimicry by studying the morphology and distribution of skin glands, components of skin secretion, and defensive behavior. Dorsal skin was studied histologically and histochemically, and skin secretions were submitted to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, reversed phase high performance liquid chromatography and assays for proteolytic activity. We found that poison glands in *A. picta* are filled with nonprotein granules that are rich in carbohydrates, while *L. lineatus* glands present protein granules. Accordingly, great amounts of proteins, at least some of them enzymes, were found in the poison of *L. lineatus* but not in that of *A. picta*. Both species differ greatly on profiles of gland distribution: In *L. lineatus*, poison glands are organized in clusters whose position coincides with colored elements of the dorsum. These regions are evidenced through a set of displays, suggesting that poison location is announced to predators through skin colors. In contrast, *A. picta* presents lower densities of glands, distributed homogeneously. This simpler profile suggests a rather qualitative than quantitative investment in chemical defense, in agreement with the high toxicity attributed to dendrobatids in general. Our data suggest that both species are toxic or unpalatable and transmit common warning signals to predators, which represents a case of Müllerian mimicry. *J. Morphol.* 273:279–290, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: amphibia; defensive behavior; skin morphology; poison glands; mimicry

INTRODUCTION

In amphibians, cutaneous secretion of toxins is one of the main defense mechanisms against predators (Toledo and Jared, 1995; Jared et al., 2009; Toledo et al., 2010, 2011). The characteristic chemical defense of these animals depends on skin

glands, especially granular or poison glands, which are mainly related to toxins against microorganisms and predators, while mucous glands are usually related to other vital functions, such as respiration and water balance (Fox, 1986, 1994; Clarke, 1997; Rollins-Smith et al., 2002, 2005). Poison glands secrete a wide diversity of peptides, biogenic amines, steroids and alkaloids, which present a broad spectrum of biological activity (Daly et al., 1987; Schwartz et al., 2007). The morphology and the patterns of gland distribution along the body vary among species, sometimes as a function of its ecology and natural history (Toledo and Jared, 1995). For example, some amphibians exhibit clusters of poison glands in certain body regions, strategically positioned to be activated through the predator's bite (Lenzi-Mattos et al., 2005; Jared et al., 2009).

Some organisms present patterns of bright and contrasting skin colors, associated to the presence of toxins or unpalatable substances. Such aposematic patterns indicate danger to potential aggressors and may confer protection against predation (Mallet and Joron, 1999; Servedio, 2000; Ruxton et al., 2004; Toledo and Haddad, 2009). Aposematic coloration may favor the evolution of mimicry (Sherratt, 2002, 2008), because mimicry depends on immediate recognition of an organism by its predators (Wüster et al., 2004). In Batesian mimicry (Bates, 1861), possibly the most widespread form, potential predators avoid an undefended species due to its resemblance to an aposematic one (Pasteur, 1982). Among vertebrates, the classic

Contract grant sponsors: FAPESP; CAPES; CNPq-INCTTOX; CNPq.

*Correspondence to: Carlos Jared, Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, São Paulo 1500 05503-000, SP, Brazil. E-mail: jared@butantan.gov.br

Received 25 April 2011; Revised 20 June 2011; Accepted 20 July 2011

Published online 24 October 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/jmor.11021

example is that of coral snakes (Elapidae), whose venom presents a high lethality. Several species of nonvenomous dipsadids and colubrids resemble coral snakes, suggesting the possibility of numerous Batesian relationships (Greene and McDiarmid, 1981; Brodie, 1993). Mullerian mimicry (Müller, 1878) occurs when a single color pattern developed in several nonrelated, poisonous species. In this case, similarity benefits the entire group of species, referred to as comimics (Sherratt, 2008). Wickler (1968), taking into account the toxicity present in all comimics, cast doubt on the term mimicry, as in Mullerian mimicry the predator is not truly deceived, differently of Batesian mimicry.

Among amphibians, the highest diversity of aposematic color patterns is found in poisonous frogs of the Dendrobatidae family, whose skin secretions are composed of a variety of dietary alkaloids, some of which are highly toxic to vertebrates (Daly et al., 2005). Dendrobatids were repeatedly suggested as anuran model system to study evolution of mimicry (Lynch, 1985; Symula et al., 2001; Toledo and Haddad, 2009; Vitt and Caldwell, 2009). For example, the Amazonian poison-dart frog *Ameerega picta*, presumably is imitated by the sympatric leptodactylid *Leptodactylus lineatus*. Although *L. lineatus* was repeatedly assumed as a nontoxic anuran (Nelson and Miller, 1971; Duellman, 1978; Lamar and Wild, 1995), no data are available about the biochemical properties of the skin secretion of this species. Toledo and Haddad (2009) discussed a similar case (with *Allobates femoralis* instead of *A. picta*), suggesting a Batesian (although not concluding which species is the model and which is the mimic) or a Müllerian mimicry ring.

In this article, we present a comparative study on poison gland morphology, glands distribution, basic toxinology, and defensive behavior in the poison-dart frog *A. picta* and in its possible mimic, the frog *L. lineatus*.

MATERIAL AND METHODS

Animal Collection and Behavioral Observations

A. picta (Fig. 1a) and *L. lineatus* (Fig. 1b) were observed and collected in Jacareacanga (Pará State) and Paranaíta (Mato Grosso State) at the Brazilian Amazon during June and November 2008 and February 2009. Additionally, 15 individuals of each species were maintained in the Laboratory of Cell Biology, Instituto Butantan, for additional observations of defensive behavior and extraction of skin secretions. Frogs were kept in terraria (40 × 50 × 60 cm) containing leaf litter, bark and pots as shelters. Water was offered ad libitum and animals were fed two times a week with young crickets. Temperature was kept between 22–28°C and high air humidity was maintained by manual spray of water three times a week.

The frogs were handled according to the procedures indicated in the Guidelines for Animal Experimentation established by the Brazilian College for Animal Experimentation.

Fig. 1. Studied animals. (a) *A. picta*. (b) *L. lineatus*. (c) *L. lineatus*, defensive behavior: full body-rising with legs vertically stretched. Exposing the posterior portion of the dorsum, this posture exposes and emphasizes colored stripes and spots. Bars: 1 cm.

Histological Study of the Skin and Glandular Distribution

Adult specimens of both species ($N = 8$) and young *L. lineatus* ($N = 2$; <3.4 cm; Bernarde et al., 2009) were sacrificed with an overdose of thionembutal (30 mg/kg) and fixed by immersion and injection with paraformaldehyde (4%) in phosphate buffer saline (PBS) buffer (0.1 mol l^{-1} , pH 7.2) for 8–10 h. Transversal

stripes of skin were removed with blade at five points along the dorsum (including head) and three points of the dorsal surface of the right thigh (Fig. 2), sampling regions of black (dorsum and thigh), yellow (dorsum) and orange (thigh) color. Whole heads from both species were decalcified in a solution of 4% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.2, in constant agitation for 2–3 months. The skin fragments and the decalcified heads were dehydrated in ethanol series (70–100%) and embedded in paraffin. Skin fragments were also embedded in historesin (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch/Heidelberg, Germany). Material embedded in paraffin was sectioned at 5 μm thickness and used for histochemical reactions and histological study. Material embedded in historesin was sectioned at 2 μm , stained with toluidine blue-fuchsin and studied histologically. Photomicrographs were obtained in an Olympus BX52 microscope coupled to an Olympus charge-coupled device (CCD) camera, using Image Pro Express software (Media Cybernetics, Bethesda) for image capture.

Histochemical Study

Sections were submitted to the following reactions: bromophenol blue for protein identification, periodic acid-Schiff (PAS) for identification of carbohydrates in general and alcian blue pH 2.5 for identification of acid carbohydrates (Bancroft and Stevens, 1996; Kiernan, 1999).

Quantitative Analysis of Glandular Distribution

Paraffin sections of both species were subjected to a quantitative analysis in order to evaluate differences in the number of poison glands at different body regions. We studied the dorsum skin at the level of forelimb insertion and the skin of the right thigh at the midpoint between knee joint and pelvis (Fig. 2). At the dorsum, we sampled the skin at the trunk centre and that of the right yellow dorsal stripe. At the thigh, we sampled skin from the centre of the orange femoral spot and the black skin anterior to the spot. We used skin fragments of $3 \times 3 \text{ mm}$ of five individuals of each species. For each individual, we sampled six sections of 5 μm in each of the four regions, spaced 25 sections (125 μm) apart from each other in order to avoid sampling of a given gland in different sections. We photographed each section and positioned a bar of 1 mm on its central point using Image Pro Express software. Then, we counted the number of poison glands contained in the interval delimited by the bar.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Fragments of dorsal and thigh skin of 2–3 specimens of each species were removed and fixed in Karnovsky fixative (5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in cacodylate buffer, 0.1 mol l^{-1} , pH 7.2; Karnovsky, 1965). The material was post fixed in osmium tetroxide (1%) in cacodylate buffer (0.1 mol l^{-1}), contrasted with aqueous uranyl acetate (1%), dehydrated in ethanol series (70–100%) and embedded in Epon resin using propylene oxide as an intermediary (Bozzola and Russell, 1999). For prior examination by light microscopy, semi thin sections were obtained in a Sorvall MT6000 ultramicrotome, (Du Pont Company, Wilmington) and stained with toluidine blue (1%) solution in borax (1%). The ultrathin sections were obtained in a Sorvall MT6000 ultramicrotome using a diamond knife. After contrast in uranyl acetate and lead citrate (1%), sections were examined in a TEM LEO 906E (LEO Electron Microscopy, Cambridge, England).

Extraction of Skin Secretions

Crude skin secretions were collected through glandular stimulation by manual compression of *A. picta* and *L. lineatus*

Fig. 2. Skin regions studied. 1–8 indicate points along the body at which transversal stripes of the skin of *L. lineatus* and *A. picta* were removed for histological study. Circles and squares indicate regions used in the quantitative analysis of poison glands' density. Circles: black skin (dorsum and thigh), squares: yellow stripe (dorsum) and orange spot (thigh).

within a beaker containing distilled water. The resulting solution was lyophilized and the dry matter was diluted to 1 mg ml^{-1} for biochemical analyses.

Electrophoresis (SDS-PAGE)

The presence of proteins in skin secretions was evaluated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel (PAGE) containing sodium dodecyl sulfate (SDS) under reducing conditions. The gel was then stained with coomassie brilliant blue and/or silver stained, following Laemmli (1970).

Chromatography (RP-HPLC)

Aqueous extracts of skin secretions were analyzed by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a binary system (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan). Samples were injected in a C18 column (ACE C18, 5 mm, 100 $\text{\AA}$, $50 \times 4.6 \text{ mm}$), using solvents (A) trifluoroacetic acid (TFA)/ H_2O (1:1,000) and (B) TFA/acetonitrile/ H_2O (1:900:100) at a constant flow of 1.2 ml min^{-1} , with a gradient of 0–100% of solvent B in 20 min, after isocratic elution at 0% for 5 min. Eluted content was monitored by a detector Shimadzu SPD-M20A (Photo Diode Array detection). The wavelength of 245 nm was selected for presentation due to the larger number of components detected when compared to the other typical wavelengths (214/220/222, 280 and 339 nm).

Enzymology

For detection of proteolytic activity, particularly of the serinopeptidase type, we determined the V_{max} of hydrolysis of the fluorogenic peptidic substrate Z-Arg-MCA. Titration 96-well plates containing 100 μl of Z-Arg-MCA solution (100 mmol l^{-1}) in ammonium acetate buffer (100 mmol l^{-1} , pH 7.5) were placed for 5 min in a thermally controlled chamber (37°C). We then added a solution (1 $\mu\text{g l}^{-1}$) of *A. picta* or *L. lineatus* skin secretions. Changes in fluorescence were recorded over 60 min through a spectrofluorimeter Spectra Max Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale). For detection, we used $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$.

Data Analysis

Data on the distribution of poison glands on dorsal surfaces were analyzed using analysis of variance, modeling species and skin region as fixed factors and individual and section (nested within individual) as random factors. In all analysis, normality of data was determined graphically through distribution of dependent variables and residuals in histograms and q-q plots, as well as through values of skewness and kurtosis, between +2

Fig. 3. *A. picta*. Distribution of poison glands at the dorsal surface. (a) Head skin. Glands present homogeneous distribution in similar densities to that of the dorsum. Hematoxylin-eosin. (b) Dorsum skin. Glands have uniform distribution, with no evidence of glandular accumulations. Toluidine blue-fuchsin. (c) Thigh skin. Glandular distribution follows the pattern observed at the rest of the dorsal surface. Toluidine blue-fuchsin. D, dermis; E, epidermis; G, poison (granular) glands; m, mucous glands; v, blood vessels. Bars: 50 μ m.

and -2 . Homogeneity of variances among groups was evaluated using Levene's test. Analyses were performed in statistical package for the social sciences, IBM (SPSS) 17.

RESULTS

Natural History Observations

A. picta (Fig. 1a) is a diurnal species that occurs mainly at the banks of streams, where they are found in high numbers and often vocalizing. Their conspicuous colors contrast with occupied substrates, mainly bare rocks presenting small herbaceous vegetation and rocks covered by a thin layer of leaf litter. Individuals are territorial and occupy a fixed area close to one or more shelters, mainly crevices between rocks.

L. lineatus (Fig. 1b) was captured by pitfall traps only, especially at rainy nights. Observations on its behavior come strictly from captivity, where it proves to be a nocturnal species that remains under leaf litter or inside cracks and narrow holes during the day. Individuals are excellent jumpers and present characteristic displays of defense (sensu Toledo et al., 2011) when threatened: fleeing, or full body-rising with legs vertically stretched (Fig. 1c), puffing up the body, and body-tilting toward the attacker's direction. When

captured, individuals can produce short and shrill distress calls. When manipulated, *L. lineatus* produces an abundant foamy, viscous skin secretion with an intense bitter smell. Even after 18 months in captivity, this secretion continues to present such characteristics.

Distribution of Poison Glands

In *A. picta* poison glands are distributed uniformly across the dorsal surface (Fig. 3a,b). There is no significant difference in the density of glands between the midpoint of the dorsum (black skin) and the right yellow stripe ($F_{1, 29} = 3.6$, $P = 0.068$. See Table 1). By contrast, the distribution of poison glands in the dorsum of *L. lineatus* is very heterogeneous. Glands are concentrated in two dorsolateral bands whose position corresponds to that of the yellow stripes, also encompassing the bordering black skin (Fig. 4b). These bands are extremely rich in poison glands, extending from the postorbital region to the base of the hindquarters. Conversely, such glands are very rare in the central region of the dorsum (Fig. 4c), with a significantly lower density than that of the stripes region ($F_{1, 29} = 890.24$, $P < 0.001$. Table 1). Histologically, these bands reveal a juxtaposed array of

TABLE 1. Mean values $\pm$ standard deviation on the number of glands in different regions of the dorsal skin of *L. lineatus* and *A. picta*

	Dorsum	Stripe	Spot	Ant spot
<i>A. picta</i>	3.23 ± 1.5	3.97 ± 2.02	1.97 ± 1.35	2.7 ± 1.51
<i>L. lineatus</i>	0.3 ± 0.53	11.33 ± 1.82	0.13 ± 0.34	8.5 ± 1.79

Dorsum: black skin at the centre of the dorsum; Stripe: yellow skin of the right dorsal stripe; Spot: orange skin from the right femoral spot; Ant Spot: black skin of anterior position to the femoral orange spot.

elongated poison glands, measuring about 150 μm in height and 110 μm in width (Fig. 4b). Likewise, there is a high density of glands in the head skin (Fig. 4a). Although the only two juvenile individuals of *L. lineatus* that we found were not included in this quantitative analysis, the histological study

reveals an identical distribution of skin glands when compared to adults.

Histological analysis of the skin at the tights of *A. picta* shows a uniform distribution of glands, like the rest of the dorsum (Fig. 3c). In contrast, the skin at the tights of *L. lineatus* exhibit glandular clusters distributed according to skin colors, in a fashion similar to the dorsum region. Each side of the orange femoral spot is bordered with elongated glandular aggregates that extend from the cloacae to the knee joint, while the spot itself presents significantly lesser and almost no poison glands ($F_{1, 29} = 655.08$, $P < 0.001$, Table 1). The histology of these aggregates is the same as the glandular bands associated with the dorsal yellow stripes (Fig. 4d). Also in *A. picta*, the incidence of glands is higher in the black skin adjacent to the

Fig. 4. *L. lineatus*. Distribution of poison glands at the dorsal surface. (a) Head skin. Note a large incidence of poison glands. Hematoxylin-eosin. Bar: 200 μm . (b) Dorsal skin at the yellow stripes. Note a large concentration of poison glands, slightly elongated dorsoventrally, juxtaposed side by side. Hematoxylin-eosin. Bar: 200 μm . (c) Skin at the center of the dorsum. Poison glands when present are very scarce and isolated. There are epidermal protuberances (p) in which the outermost epidermal layer, the *stratum corneum*, is thicker than in the rest of the skin. Toluidine blue-fuchsin. Bar: 50 μm . (d) Black thigh skin anterior to the orange spot. A large concentration of poison glands is arranged in a similar fashion to that of dorsum clusters in (b). Toluidine blue-fuchsin. Bar: 100 μm . D, dermis; E, epidermis; G, poison (granular) glands; m, mucous glands; v, blood vessels.

Fig. 5. Morphology of poison glands. (a) *A. picta*. The glandular alveolus is filled with large granules of heterogeneous size and shape. Nuclei (n) occupy the periphery of the secretory syncytium. There is a duct (d) for extrusion of glandular content. A myoepithelial layer (arrow) surrounds the alveolus. Toluidine blue-fuchsin. Bar: 20 μ m. (b) *A. picta*. Secretory granules react to alcian blue pH 2.5, indicating acid carbohydrates in skin secretions. Bar: 10 μ m. (c) *L. lineatus*. Densely juxtaposed spherical granules fill the alveolar glands. Nuclei (n) occupy the periphery of the secretory syncytium. A myoepithelial layer surrounds the alveolus (arrow). Toluidine blue-fuchsin. Bar: 20 μ m. (d) *L. lineatus*. Differently from *A. picta*, glands strongly react to bromophenol blue, indicating the massive presence of proteins. The duct (d) is visible in this section. Bar: 20 μ m. D, dermis; E, epidermis; m, mucous glands.

femoral spot rather than in the spot itself ($F_{1, 29} = 4.59$, $P = 0.041$).

Morphology of the Poison Glands

Granular glands of *A. picta* and *L. lineatus* are located in the stratum spongiosum of the dermis, along with a large number of chromatophores and blood vessels. The secretory epithelium is syncytial, with nuclei situated at the alveolus periphery and secretion granules filling the central region (Fig. 5a,c). The alveolus is surrounded by a single layer of myoepithelial cells and has a duct that communicates it with the skin surface. Despite these similarities, the glands of both species differ in the morphology of secretory granules and in the affinity for histochemical treatments. In *A. picta*, poison glands are elliptical, with the largest diameter parallel to the epidermis and maximal diameter of about 80 μ m (Fig. 5a). Its granules are negative to bromophenol blue, indicating absence of protein material, but react to PAS and alcian blue pH 2.5 (Fig. 5b), indicating the presence of acidic

mucosubstances. In *L. lineatus*, glands generally present spherical shape but may be laterally compressed in the gland clusters of dorsum and thighs. Well defined secretion granules are spherical and homogeneous in appearance, although presenting assorted sizes (Fig. 5c). Unlike *A. picta*, a high protein secretion in *L. lineatus* is indicated by intense affinity of poison glands for bromophenol blue (Fig. 5d), while the lack of affinity for PAS and alcian blue at pH 2.5 indicates absence of both neutral and acidic mucosubstances.

In TEM, the poison glands of *A. picta* present a prominent rough endoplasmic reticulum (RER) and a high density of mitochondria, concentrated at the peripheral portion of the secretory syncytium (Fig. 6a,b). The Golgi apparatus abounds, with dictyosomes enclosing electron-dense structures of spherical shape among an electron-transparent medium (Fig. 6a,c). More internally, secretory granules contain an electron-transparent matrix among which electron-dense particles of circular, elongated or irregular shape are observed (Fig. 6d). These particles are remarkably similar to those observed in vesicles derived from

Fig. 6. *A. picta*. Transmission electron microscopy of the secretory syncytium of poison glands. (a) Nuclei (N), mitochondria and rough endoplasmic reticulum (RER) occupy the periphery of the glandular alveolus. Golgi dictyosomes (go) exhibit spherical electron-dense particles (arrows). Bar: 1 μm . (b) High density of mitochondria (m) with lamellar cristae, close to a secretory granule (g). The RER occurs sparsely. Bar: 0.5 μm . (c) Golgi dictyosomes (go), with several budding vesicles (arrows) around it. A large electron-transparent granule encloses circular particles, with aspect similar to those within Golgi budding vesicles. Bar: 0.5 μm . (d) Part of large juxtaposed secretory granules full of particles with circular or elongated shape and apparently surrounded by membrane. Bar: 1 μm . ct, cytoplasm; g, secretory granules; mi, myoepithelial layer.

the Golgi apparatus. In contrast, the glands of *L. lineatus* have few mitochondria, concentrated at the periphery of the secretory syncytium. At this same region, a high density of expanded RER lamellae suggests high activity of protein synthesis (Fig. 7b). The Golgi apparatus is moderately developed, with several vesicles budding from its trans face (Fig. 7b). Toward the interior of the syncytium, a high number of immature secretory granules occur. These granules are characterized by an electron-transparent matrix containing portions of electron-dense material at different levels of aggregation (Fig. 7c). The inner portion of the syncytium exhibits a large number of mature secretory granules of spherical shape and various sizes, filled with an electron-dense content (Fig. 7a,b).

Biochemistry of Skin Secretions

Electrophoresis analysis reveals few proteins in the skin secretion of *L. lineatus* (Fig. 8a). Namely, one major band at ~ 25 kDa and two faint bands at ~ 50 and ~ 15 kDa, besides some unresolved mate-

rial at the low molecular mass region, probably peptides. These results are supported by the presence of an intense nonretained fraction present in the RP-HPLC chromatographic analysis ($\lambda = 214$ nm, data not shown). By contrast, the secretion of *A. picta* has virtually no protein content (Fig. 8a,b). Even an overstained silver SDS-PAGE revealed no proteins, at 1 mg ml⁻¹ (data not shown). The RP-HPLC profiles of both species were also markedly different. Although not complex, *L. lineatus* skin secretion presented a series of peaks with more hydrophilic behavior, whereas *A. picta* skin secretion was very poor, with few components eluting in the more hydrophobic region of the chromatogram. In spite of the low protein contents, enzymatic activity (serinopeptidase type), could be detected. We found a marked difference among species: 1 mg ml⁻¹ solution of *A. picta* skin secretion was able to hydrolyze the fluorogenic substrate at 270 AUF (arbitrary units of fluorescence)/min. On the other hand, a solution of *L. lineatus* skin secretion, at the same concentration, hydrolyzed the same substrate at a velocity of 720 AUF/min.

Fig. 7. *L. lineatus*. Transmission electron microscopy of the secretory syncytium of poison glands. (a) Mature secretory granules of highly electron-dense content fill the central portion of the syncytium, while nuclei and electron-transparent immature granules (asterisks) occur at peripheral portions. Bar: 5 μm . (b) The peripheral RER often presents expanded lamellae, suggesting high activity of protein synthesis. The Golgi apparatus (go) is moderately developed, with many vesicles in its trans face, which often encloses electron-dense particles (arrows). Bar: 1 μm . (c) The heterogeneous levels of aggregation of poison content seems to represent stages of maturation of glandular secretions, indicated by the presumed sequence I–IV. Bar: 0.5 μm . g, mature secretory granules; mi, myoepithelial layer; N, nuclei; RER, rough endoplasmic reticulum.

DISCUSSION

Due to the great morphological similarity, a Batesian association involving the poison-dart frog *A. picta* and the allegedly non-toxic frog *L. lineatus* was proposed by several researchers (Nelson and Miller, 1971; Duellman, 1978; Toledo and Hadad, 2009; Vitt and Caldwell, 2009), despite the

Fig. 8. Biochemistry of the skin secretions. (a) SDS-PAGE. L1 and L2 represent secretions of a group of four adult *L. lineatus* each, while A1 to A4 represent secretions of a group of three adult *A. picta* each. MMS is the standard for molecular mass markers. In *L. lineatus*, a major protein band at ~ 25 kDa can be observed. By contrast, *A. picta* secretions have no observable protein bands. (b) C18-RP-HPLC, monitored at 254 nm, *L. lineatus* skin secretion presents peaks with hydrophilic behavior, whereas *A. picta* skin secretion contains few components eluting in the hydrophobic region of the chromatogram.

lack of specific studies on this topic. Some authors also noted that *L. lineatus* is similar to other anuran species, such as the poison-dart frogs *Ameerega hahneli* and *Ameerega trivittata* and the arboreal toad *Allobates femoralis* (Lamar and Wild, 1995; Toledo and Haddad, 2009), suggesting that *L. lineatus* could develop a Batesian mimetic relationship with these species as well.

Amphibian skin is a remarkable organ that serves multiple vital functions, such as respiration, water economy and defense against predators and microorganisms (Toledo and Jared, 1995; Rollins-Smith et al., 2002, 2005; Lillywhite, 2006; Schädlich, 2009). The morphological and toxinological study of this organ, coupled with behavioral observations at the field and in captivity, may contribute to the elucidation of aspects of amphibian biology and natural history that are inaccessible by other methods. Here, we applied this approach as an effort to contribute to the elucidation of a case of mimicry between anuran species.

We observed that the skin of *L. lineatus* and *A. picta* presents the morphological structure found in anurans as a whole (Delfino et al., 1998, 1999; Terreni et al., 2003; Alvarez et al., 2005). However, with regard to poison glands, these two species exhibit marked differences in relation to gland shape, distribution and concentration in specific body parts, as well as size and aspect of secretory granules. Taken together, these features indicate that these two amphibians make use of chemical defenses in quite a different manner.

Based on previous information (Fox, 1986, 1994; Clarke, 1997; Rollins-Smith et al., 2002, 2005) and on our own morphological and histochemical results, we presumed that proteins, alkaloids and other potential toxic compounds here found are mainly secreted by the skin poison glands. However, very little is known about the presence of toxic compounds (together with polysaccharides) in the mucous glands.

Histochemical and biochemical data show that the skin secretion of *L. lineatus* has a high concentration of proteins, although it seems to be not very diverse, as shown by the SDS-PAGE experiment, which presents just one intense band. This was also evidenced ultrastructurally by the intense presence of RER in the secretory syncytium of its poison glands. In fact, proteins are important components of the skin secretions of leptodactylids as a whole (Bevins and Zasloff, 1990; Pukala et al., 2006; Schwartz et al., 2007). By contrast, proteins have virtually no expression in the poison of *A. picta*. In this species, the poison is probably composed of alkaloids, as in other dendrobatids. These substances come from amphibian dietary items such as ants, beetles, millipedes and mites, but their primary source is probably plants or fungi ingested by these invertebrates (Saporito et al., 2003, 2004, 2007; Dumbacher et al., 2004;). Moreover, our histochemical data show that

A. picta have a skin secretion rich in mucosubstances. This fact is supported ultrastructurally by the presence of a well-developed Golgi apparatus, an organelle that acts in the synthesis of carbohydrate chains and in their incorporation into proteins (Farquhar and Palade, 1998). Since carbohydrates often have allergenic properties (Paschinger et al., 2005), it is possible that they contribute to the toxicity of *A. picta*. The indication of carbohydrates in the poison of a dendrobatid deserves attention, since this group has been studied toxinologically exclusively from the perspective of its alkaloids. Nevertheless, the ultra-violet high performance liquid chromatography (UV HPLC) detection and the technique employed (reversed phase) would not be the best for detecting either alkaloids or sugars. Hydrophilic interaction chromatographic (HILIC) coupled to mass spectrometry (MS) and/or capillary electrophoresis (CE) - MS experiments could yield better results in the investigation of the skin secretion components. Both in *A. picta* and *L. lineatus*, we observed patterns of poison maturation at the ultrastructural level that involve fusion of vesicles, growth of secretory granules, aggregation, and progressive compression of granule contents. Similar patterns have been described for a diversity of anurans (Delfino et al., 1999, 2002; Angel et al., 2003; Terreni et al., 2003).

In general anurans exhibit a homogeneous distribution of skin glands along the dorsal surface (Toledo and Jared, 1995). This is indeed the case of *A. picta*, in contrast with *L. lineatus*, whose poison glands are concentrated in the head and in bands associated with colored elements of the dorsum. Thus, although very similar regarding color patterns, dorsal skin in these two species appears to represent distinct strategies for defense against predation. In *L. lineatus*, the association between skin colors, high concentration of poison glands and a characteristic display of defense strongly indicate that colored stripes and spots signalize regions where the poison is in fact concentrated. Similarly, in the frog *Eupemphix nattereri* two circular gland clusters at the lumbar region are evidenced by an intense black pigmentation surrounded by a white band, composing an arrangement that simulate eyes. This structure, able to secrete a poison with high lethality, is exposed at the time of attack through behavioral display (Lenzi-Mattos et al., 2005). Moreover, the high density of glands in the dorsal surface of the head of *L. lineatus* may be related to the fact that birds and snakes usually start ingesting anurans from the head. Similar cephalic aggregates have been reported for other anurans, such as the toad *Melanophryniscus cambarae* (Santos and Grant, 2011).

Our data on behavior, skin morphology and toxinology suggest that the defense of *L. lineatus* is based on skin secretions with a pronounced toxicity or unpalatability. Its skin is rich in proteins and peptides and some of them might have toxic effects. Moreover, the peptidase activity identified in the skin secretions, may indicate that the active

peptides can be processed in the skin, or that the enzyme itself can be involved in the toxic or defensive processes. These observations suggest that the mimetic relationship between *L. lineatus* and *A. picta* is Mullerian in nature. The toxinological set presented by *L. lineatus* could lead an attacker to learn to avoid the color pattern shared by these species, benefiting also *A. picta* (or other similar dart-poison frogs). Our findings provide a more complex character for this mimicry pair, since *L. lineatus* is no longer regarded as a passive species that would defend itself only by exposing skin colors to predators, accordingly to that proposed by Toledo and Haddad (2009).

The natural history of these two species is poorly known, and our fieldwork showed important ecological differences between them. Thus, the characteristic glandular distribution in the skin of each species is probably related to their specific ecology (Erspamer, 1994). In fact, *A. picta* has an intense diurnal activity, being very conspicuous in the environment both visually and acoustically. In contrast, *L. lineatus* is very difficult to observe and was captured only in traps. Adults are solitary and nocturnal, spending the day sheltered. These characteristics may impair the efficiency of its color as a warning signal and hence its supposed mimetic defense. In an attempt to explain this incongruence, it was suggested that mimicry might be effective only for young *L. lineatus*, which are not just nocturnal but also diurnal (Regos and Schluter, 1984; Lamar and Wild, 1995). However, reaffirming the hypothesis of Schluter and Regos, (1981), we suggest that adults can also take advantage of mimicry in the case of being surprised by potential aggressors during the day, or during their reproductive period, about which little is known. On such occasions, *L. lineatus* would have the same picnotic characteristics as *A. picta*, its likely diurnal comimic. This hypothesis has support in the fact that, from a morphological standpoint, we did not observe differences between adults and young with regard to the structure of skin, poison glands or poison granules. However, it is important to note that differences in the secretory content of poison glands along ontogeny were described by Schädich et al. (2010) for the Ewing's Tree Frog (*Litoria ewingii*).

Considering the notorious toxicity reported for dendrobatid frogs, a comparison on the dimensions and quantity of poison glands between *A. picta* and *L. lineatus* proves to be surprising. These glands are much smaller in the dart-poison frog, presenting considerably lower concentration. As an effect, it could be expected that the glands of *A. picta* possess a higher efficiency than those presented by the leptodactylid. It is possible that, through the course of the evolutionary history of *A. picta*, there have been a major investment in gland efficiency and quality, which may actually

characterize the toxic lineages of Dendrobatidae as a whole. Conversely, due to the high concentration of glands and their pronounced dimensions, the chemical defense of *L. lineatus* may be more dependent on quantitative glandular characteristics. In this species, the presence of a concentrated distribution of glands along the yellow stripes and orange spots is an unprecedented finding. It is possible that this arrangement represents an initial stage in the evolution of cutaneous macroglands. This hypothesis finds support in the defensive behavior of this species, which includes the display of dorsal contrasting colored elements, confirmed to be aposematic in this case as it is related to toxic secretions. Accordingly, several anuran species exhibit similar defensive displays directly associated with the presence of macroglands (e.g., parotoid or inguinal), as it is the case of most bufonids and some leiuperids and hylids (Toledo and Jared, 1995; Lenzi-Mattos et al., 2005; Jared et al., 2009; review in Toledo et al., 2011).

This work aimed to open a range of topics for future studies able to penetrate deeper into the knowledge about the skin morphology and poison biochemistry and pharmacology of the two species here studied. We are convinced that only through a detailed multidisciplinary approach, concomitantly with field studies, the mimetic relationship here exposed can be further elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

Daniel C. Pimenta, Marta M. Antoniazzi, Célio F.B. Haddad and Carlos Jared are fellows of CNPq. IBAMA provided animal collection permits n° 14272 to Luís F. Toledo.

LITERATURE CITED

- Alvarez BB, Delfino G, Nosi D, Terreni A. 2005. Ultrastructure of poison glands of South American frogs: A comparison between *Physalaemus albonotatus* and *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae). *J Morphol* 263:247–258.
- Angel R, Delfino G, Parra GJ. 2003. Ultrastructural patterns of secretory activity in poison cutaneous glands of larval and juvenile *Dendrobates auratus* (Amphibia, Anura). *Toxicon* 41:29–39.
- Bancroft JD, Stevens A. 1996. Theory and Practice of Histological Techniques, Edinburgh: Churchill and Livingstone.
- Bates HW. 1861. Contributions to an insect fauna of the Amazon Valley. Lepidoptera: Heliconidae. *Trans Entomol Soc* 23:495–566.
- Bernarde PS, Kokubum MNC. 2009. Seasonality, age structure and reproduction of *Leptodactylus (Lithodytes) lineatus* (Anura, Leptodactylidae) in Rondônia state, southwestern Amazon, Brazil. *Iheringia Ser Zool* 99:368–372.
- Bevins CL, Zasloff M. 1990. Peptides from frog skin. *Annu Rev Biochem* 59:395–414.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1999. Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists, Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Brodie ED. 1993. Differential avoidance of coral snake banded patterns by free-ranging avian predators in Costa Rica. *Evolution* 47:227–235.

- Clarke BT. 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev* 72:365–379.
- Daly JW, Myers CW, Whittaker N. 1987. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon* 25:1023–1095.
- Daly JW, Spande TF, Garraffo HM. 2005. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. *J Nat Prod* 68:1556–1575.
- Delfino G, Brizzi R, Alvarez BB, Kracke-Berndorff R. 1998. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae) secretory patterns during ontogenesis. *Tissue Cell* 30:30–40.
- Delfino G, Brizzi R, Alvarez BB, Taddei L. 1999. Secretory polymorphism and serous cutaneous gland heterogeneity in *Bufo granulosus* (Amphibia, Anura). *Toxicon* 37:1281–1296.
- Delfino G, Brizzi R, Nosi D, Terreni A. 2002. Serous cutaneous glands in New World hylid frogs: an ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. *J Morphol* 253:176–186.
- Duellman WE. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Misc Publ Univ Kans Mus Nat Hist* 65:1–352.
- Dumbacher JP, Wako A, Derrickson SR, Samuelson A, Spande TF, Daly JW. 2004. Melyrid beetles (Choresine): A putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and passerine birds. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15857–15860.
- Ersparmer V. 1994. Bioactive secretions of the amphibian integument. In: Heatwole H, editor. *Amphibian Biology: The Integument*, Vol. 1. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons. pp 178–350.
- Farquhar MG, Palade GE. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 8:2–10.
- Fox H. 1986. Dermal glands. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS, editors. *Biology of the Integument, Vertebrates*, Vol. 2. Berlin: Springer. pp 116–135.
- Fox H. 1994. The structure of the integument. In: Heatwole H, editor. *Amphibian Biology, The Integument*, Vol. 1. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons. pp 1–32.
- Greene HW, McDiarmid RW. 1981. Coral snake mimicry: Does it occur? *Science* 213:1207–1212.
- Jared C, Antoniazzi MM, Jordão AEC, Silva JRMC, Greven H, Rodrigues MT. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon* 54:197–207.
- Karnowsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138.
- Kiernan JA. 1999. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lamar WW, Wild ER. 1995. Comments on the natural history of *Lithodytes lineatus* (Anura: Leptodactylidae) with a description of the tadpole. *Herpetol Nat Hist* 3:135–142.
- Lenzi-Mattos R, Antoniazzi MM, Haddad CFB, Tambourgi DV, Rodrigues MT, Jared C. 2005. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): Structure, toxic secretion and relationship with deimatic behaviour. *J Zool* 266:385–394.
- Lillywhite HB. 2006. Water relations of tetrapod integument. *J Exp Biol* 209:202–226.
- Lynch JD. 1985. Mimetic and nonmimetic populations of *Eleutherodactylus gaigeae* (Dunn) in lower Central America and Colombia (Amphibia: Anura, Leptodactylidae). *Stud Neotrop Fauna Environ* 20:195–202.
- Mallet J, Joron M. 1999. Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 30:201–233.
- Müller JF. 1878. Über die Vortheile der Mimicry bei Schmetterlingen. *Zool Anz* 1:54–55.
- Nelson CE, Miller GA. 1971. A possible case of mimicry in frogs. *Herpetol Rev* 3:109.
- Paschinger K, Fabini G, Schuster D, Rendić D, Wilson IB. 2005. Definition of immunogenic carbohydrate epitopes. *Acta Biochim Pol* 52:629–632.
- Pasteur G. 1982. A classification review of mimicry systems. *Annu Rev Ecol Syst* 13:169–199.
- Pukala TL, Bowie JH, Maselli VM, Musgrave IF, Tyler MJ. 2006. Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: Structure and activity. *Nat Prod Rep* 23:368–393.
- Regös J, Schlüter A. 1984. Erste Ergebnisse zur Fortpflanzungsbiologie von *Lithodytes lineatus* (Schneider, 1799) (Amphibia: Leptodactylidae). *Salamandra* 20:252–261.
- Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblin JC, Carey C, Zasloff MA. 2002. Antimicrobial peptide defences against pathogens associated with global amphibian declines. *Dev Comp Immunol* 26:63–72.
- Rollins-Smith LA, Reinert LK, O'Leary CJ, Houston LE, Woodhams DC. 2005. Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integr Comp Biol* 45:137–142.
- Ruxton GD, Sherratt TN, Steed MP. 2004. *Avoiding Attack: the Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals, and Mimicry*. Oxford: Oxford Biology.
- Santos RR, Grant T. 2011. Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evol Ecol* 25:249–258.
- Saporito RA, Donnelly MA, Hoffman RL, Garraffo HM, Daly JW. 2003. A siphonotid millipede (*Rhinotus*) as the source of spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. *J Chem Ecol* 29:2781–2786.
- Saporito RA, Garraffo HM, Donnelly MA, Edwards AL, Longino JT, Daly JW. 2004. Formicine ants: An arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8045–8050.
- Saporito RA, Donnelly MA, Norton RA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW. 2007. Oribatid mites: A major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8885–8890.
- Schadich E. 2009. Skin peptide activities against opportunistic bacterial pathogens of the African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) and three *Litoria* frogs. *J Herpetol* 43:173–183.
- Schadich E, Cole ALJ, Squire M, Mason D. 2010. Skin peptides of different life stages of Ewing's tree frog. *J Exp Zool* 313:1–6.
- Schluter A, Regös J. 1981. *Lithodytes lineatus* (Schneider, 1799) (Amphibia: Leptodactylidae) as a dweller in nests of the leaf cutting ant *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Attini). *Amphibia-Reptilia* 2:117–121.
- Schwartz CA, Castro MS, Pires OR Jr, Maciel NM, Schwartz ENF, Sebben A. 2007. Princípios ativos da pele de anfíbios: Panorama atual e perspectivas. In: Nascimento LB, Oliveira ME, editors. *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. pp 146–168.
- Servedio MR. 2000. The effects of predator learning, forgetting, and recognition errors on the evolution of warning coloration. *Evolution* 54:751–763.
- Sherratt TN. 2002. The evolution of imperfect mimicry. *Behav Ecol* 13:821–826.
- Sherratt TN. 2008. The evolution of Müllerian mimicry. *Naturwissenschaften* 95:681–695.
- Symula R, Schulte R, Summers K. 2001. Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *Proc R Soc Lond B* 268:2405–2421.
- Terreni A, Nosi D, Greven H, Delfino G. 2003. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): Patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. *Tissue Cell* 35:274–287.

- Toledo LF, Haddad CFB. 2009. Colors and some morphological traits as defensive mechanisms in anurans. *Int J Zool* 2009 910892:1–12.
- Toledo RC, Jared C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp Biochem Physiol* 111:1–29.
- Toledo LF, Sazima I, Haddad CFB. 2010. Is it all death feigning? Case in anurans. *J Nat Hist* 44:1979–1988.
- Toledo LF, Sazima I, Haddad CFB. 2011. Behavioral defenses of anurans: An overview. *Ethol Ecol Evol* 23:1–25.
- Vitt LJ, Caldwell JP. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Wickler W. 1968. *Mimicry in Plants and Animals*. New York: McGraw Hill.
- Wuster W, Allum CSE, Bjargardottir IB, Bailey KL, Dawson KJ, Guenioui J, Lewis J, McGurk K, Moore AG, Niskanen M, Pollard CP. 2004. Do aposematism and Batesian mimicry require bright colours? A test, using European viper markings. *Proc Natl Acad Sci USA* 271:2495–2499.

Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom

Juliana Mozer Sciani^a, Rafael Marques-Porto^a, Ailton Lourenço Junior^b, Ricardo de Oliveira Orsi^c, Rui Seabra Ferreira Junior^{b,d}, Benedito Barraviera^{b,d}, Daniel Carvalho Pimenta^{a,d,*}

^a Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

^b Faculdade de Medicina – UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18603-970, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil

^d Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP – UNESP, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Botucatu, SP P.O. Box 577 18610-307, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 5 May 2010

Accepted 5 May 2010

Available online 21 May 2010

Keywords:

Apis mellifera

Melittin

Venom

Seasonal variation

Peptides

Natural peptides

ABSTRACT

Apis mellifera, the European honey bee, is perhaps the most studied insect in the *Apidae* family. Its venom is comprised basically of melittin, phospholipase A₂, histamine, hyaluronidase, catecholamines and serotonin. Some of these components have been associated to allergic reactions, among several other symptoms. On the other hand, bee mass-stinging is increasingly becoming a serious public health issue; therefore, the development of efficient serum-therapies has become necessary, with a consequent better characterization of the venom. In this work, we report the isolation and biochemical characterization of melittin-S, an isoform of melittin comprising a Ser residue at the 10th position, from the venom of Africanized *A. mellifera*. This peptide demonstrated to be less hemolytic than melittin and to adopt a less organized secondary structure, as assessed by circular dichroism spectroscopy. Melittin-S venom contents varied seasonally, and the maximum secretion occurred during the (southern) winter months. Data on the variation of the honey bee venom composition are necessary to guide future immunological studies, aiming for the development of an efficient anti-serum against Africanized *A. mellifera* venom and, consequently, an effective treatment for the victims of mass-stinging.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The European honey bee, *Apis mellifera*, is one of the most studied insects [20,21,30,41]. As a consequence, its venom is probably the best characterized venom in the *Apidae* family, which includes both social and solitary species of bees and bumblebees. Among the primary and most important functions of the venom is the defense of the colony, mainly against insects, including other Hymenoptera, such as ants, wasps, bumblebees and bees from other colonies, to which the venom is generally fatal, but also against larger animals such as mammals.

The main component, ~50% by dry weight, in honey bee venom is melittin [15]. The active 26 amino acid peptide is released from its precursor, promelittin, during biosynthesis and presents a hemolytic activity, other than being the primary allergen in bee venom [9]. It is an amphiphilic peptide, with a predominantly hydrophobic N-terminal region and a hydrophilic C-terminal region, with the characteristic structure of membrane

bound cytolytic, channel-forming peptides and trans-membrane protein helices [8,32]. It acts synergistically [29,38] with phospholipase A₂ (PLA₂), being this enzyme correspondent to circa 11% of the venom dry weight [23].

It has been shown that the levels of different honey bee venom components, such as histamine [24], hyaluronidase [23], dopamine and noradrenaline [25], 5-hydroxytryptamine (5-HT) [28] and phospholipase A₂ [27] may change with the age of the individuals or the season of the year [6,24]. Specifically, Owen and Bridges [25] showed that melittin content changes as the summer progresses.

Toxic bee stinging effects have been mostly associated to allergic reactions; however, massive bee attacks can be toxic per se, e.g., large amounts of venom are inoculated into the victim that can even die as a consequence of the direct action of the toxins (melittin, PLA₂, etc). The initial symptoms from mass envenomation include edema, fatigue, dizziness, nausea, vomiting, fever, and unconsciousness. Response to the release of endogenous histamine includes diarrhea and incontinence. Systemic damage may develop from within 24 h to 6 days, including hemolysis, hemoglobinemia, levels of creatinine phosphatase elevated up to 500-fold and acute tubular necrosis. Other symptoms include muscular aches, cramps, hyperglycemia, and hypertension. Complete recovery require from 3 to 6 weeks, but death can occur within 6 h to 12

* Corresponding author at: Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil.
Tel.: +55 11 3726 7222x2101; fax: +55 11 3726 7222x2018.

E-mail address: dcpimenta@butantan.gov.br (D.C. Pimenta).

days, generally as a result of renal failure due to breakdown products of hemolysis, myonecrosis, and the consequent renal damage; or from cardiac arrest due to complications of the venom toxicity (for further information see the review of Vetter et al. [37] and the stinging simulations of Francese et al. [7]).

The present work will focus on the biochemical characterization of the seasonal variation of the major components of the Africanized honey bee (AHB) venom. AHB was introduced in Brazil in 1956, in an attempt to find a subspecies of *A. mellifera* that was more adapted to a tropical climate. In 1957, 26 swarms escaped and started spreading through South and Central Americas [20] and have become a serious public health issue. Molecular homogeneity is a crucial requirement for the development of efficient serum-therapies, employed in massive-attack cases. In this work, we have analyzed the venom composition of one specific hive for 1 year and have been able to identify both a seasonal variation in the contents of the venom and the presence of a novel melittin isoform secreted only during the southern winter. These data will serve as guidance for subsequent immunology studies.

2. Material and methods

2.1. Reagents

All the employed reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

2.2. Bees

Africanized honey bee (*A. mellifera*) workers, aging 30–40 days, were obtained from a specific hive at the Apiary of Botucatu School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry – UNESP (Brazil) once a month every 3rd week of the month, from October 2007 to September 2008.

2.2.1. Venom obtainment by means of electric stimulation

Venom was collected according to a slight modification of the Benton et al. protocol [3]. Briefly, a wired glass plated was placed in the entrance of the hive so that the homing bee had to land on the plate in order to gain access to the interior of the colony. The wires are electrified and apply mild shocks to the bees that respond by stinging the surface on which they are walking. Once it is unlikely that a bee will eject all the contents of its venom sac in one single attack, successive stinging occurs, typically 10 times, yielding approximately 1 μ L per attack. The venom dries rapidly on the glass plate and can be scraped off and processed as described above. Approximately 100 bees were allowed to land on the plate.

2.3. Chromatographic analyses

2.3.1. RP-HPLC profiling and purification

A reversed-phase binary HPLC system (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan) was used for sample profiling and separation. The lyophilized crude venom powder was solubilized into 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and the 12-month collections were normalized to 1 mg mL⁻¹ solutions, based on sample mass. These solutions were centrifuged and the supernatant was separated for subsequent chromatographic analyses. Twenty-microliter aliquots were loaded in an ACE C8 column (ACE 3 μ m, C8, 300 Å, 100 mm $\times$ 2.1 mm) in a two-solvent system: (A) trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O (1:1000) and (B) TFA/acetonitrile (ACN)/H₂O (1:900:100). The column was eluted at a constant flow rate of 0.2 mL min⁻¹ with a 10–100% gradient of solvent B over 31 min,

after a 5 min isocratic elution with 10% B. The HPLC column eluates were monitored by a Shimadzu SPD-M20A PDA detector scanning from 200 to 500 nm (1 nm steps). Background subtraction was performed for chromatogram superimposition and integration.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry analyses were performed in an ESI mass spectrometer (LCQDuo™, ThermoFinnigan, USA), equipped with a nanospray source and connected to nanoHPLC system (UltiMate HPLC System, LC Packings, Dionex, USA). The samples were diluted in a 5% ACN containing 0.2% formic acid, and were introduced in the spectrometer at a flow rate of 1 μ L min⁻¹. The spray voltage was kept at 1.8 kV, the capillary voltage at 46 V, the capillary temperature at 180 °C and the tube lens offset was kept at –5 V. MS spectra were collected in the 50–2000 *m/z* range. Instrument control, data acquisition and data processing were performed with the Xcalibur Suite.

2.5. Peptide sequencing

Complete peptide sequencing was performed by Edman degradation using a Shimadzu PPSQ-21 automated protein sequencer, following the manufacturer's standard instructions. Amino acid analyses were performed to quantify the different peptide batches used throughout this work.

2.6. Circular dichroism (CD)

CD measurements were carried out on a J-810 Circular Dichroism Spectropolarimeter (Jasco Inc.) coupled to a Peltier Jasco PFD-425S system for temperature control. Far-UV spectra were recorded in the spectral range 181–260 nm and averaged over 10 scans at 20 °C, using a 1-mm path-length quartz cell, 0.5 nm step resolution, 50 nm/min speed, 8 s response time, and 1 nm bandwidth. Spectral correction was performed by subtracting the blank. Measured ellipticity θ (mdegree) was converted to molar ellipticity $[\theta]$ (degree cm² dmol⁻¹) for structural calculations performed by CDSSTR algorithm [4,19,34] hosted at Dichroweb website (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) [17,39,40].

2.7. Biological assays

2.7.1. Hemolysis

The hemolytic assay was performed following the method described by Al-Badri et al. [1], with some modifications. Erythrocytes were obtained by centrifuging fresh whole blood (3000 rpm, 10 min), to remove plasma and white blood cells. One mL of red blood cells (RBC) was diluted with 9 mL of PBS buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7 and 150 mM NaCl). The suspension was further diluted to give a RBC 4%. Melittin and melittin-S (3 μ M in 50 μ L, diluted in the assay buffer) were incubated with RBC 4% (20 μ L) and PBS buffer (50 μ L) at 37 °C for 1 h. The tube was centrifuged at 4000 rpm for 5 min and 60 μ L of supernatant were transferred to 96-well plate, and the hemoglobin released was measured at 414 nm. Data were compared with negative control (100 μ L PBS buffer and 20 μ L RBC 4%) and a positive control (50 μ L PBS buffer, 50 μ L Triton X-100 0.1% and 20 μ L RBC 4%). Experiments were performed in triplicate. Percent hemolysis was calculated as follows: (%) = $(A_{\text{sample}} - A_{\text{buffer}}) / (A_{\text{triton}} - A_{\text{buffer}}) \times 100$.

Fig. 1. Representative RP-HPLC profiles ($\lambda = 214$ nm) of Africanized *A. mellifera* venoms obtained by electrical stimulation. Melittin and phospholipase A₂ are annotated and the arrow denotes the peak varying according to the months.

2.8. Data fitting, statistical analyses and sequence alignment

When data fitting was performed, results are presented as the calculated value $\pm$ standard deviation (S.D.). Otherwise; data correspond to the mean of three individual experiments. Pep-

tide sequence alignment was performed using ClustalW software [16].

2.9. Molecular modeling and visualization

Molecular modeling was performed with SWISS-MODEL [2,10,33] and the figure was generated with Swiss-PdbViewer [10] (both features available at <http://www.expasy.org/>). Briefly and according to the SWISS-MODEL documentation, the homology modeling builds the three-dimensional protein structure models using experimentally determined structures of related family members as templates, on the basis of a sequence alignment between the target protein and the template structure. Besides, there are model quality assessment tools that estimate the reliability of the resulting models.

3. Results

The monthly venom solutions were normalized to 1 mg mL^{-1} and $20 \mu\text{L}$ aliquots were analyzed by reversed-phase HPLC, according to Section 2. Background subtracted chromatograms were individually integrated and analyzed, as the representative chromatograms pictured in Fig. 1 show. On average, 100 different peaks could be detected in each month solution, of which less than 10 (the major peaks) would serve for quantitative-based comparison. Moreover, from our previous studies [6], we are aware that the largest peak in the chromatogram corresponds to melittin and the second largest, to PLA₂. However, depending on the month, there was a different second largest peak, as indicated by the arrow in Fig. 1, AUG/08. This peak, together with melittin, were purified and analyzed by MS (Fig. 2) and Edman degradation, and the chemically determined sequence is presented on Table 1. Since it differs from melittin only by a Ser residue at the 10th position, it was termed *melittin-S*.

Fig. 2. Mass spectrometry profiles of melittin and melittin-S. The parent ion envelopes for both peptides are annotated. Other evident ions for melittin: $m/z = 812.13$ corresponds to $[y_{13}]^{2+}$; $m/z = 893.20$ corresponds to $[\text{PALISWIK-NH}_3]^+$ and $m/z = 542.00$ corresponds to $[y_4\text{-NH}_3]^+$. For melittin-S: $m/z = 812.33$ corresponds to $[\text{STGLPALIS-28}]^+$; $m/z = 625.27$ is $[\text{LKVLSST-NH}_3]^+$; $m/z = 669.27$ is $[\text{KRKRQ-28}]^+$; $m/z = 757.4$ corresponds to $[\text{ISWIKR-28}]^+$; $m/z = 537.33$ to $[\text{GLPALI-28}]^+$ and $m/z = 581.27$ to $[\text{IGAVLK}]^+$.

Table 1
Bee and wasp melittins alignment.

		↓
Melittin-S	GIGAVLKVL	S TGLPALISWIKRKRQQ
P01501	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
P01502	GIGAILKVL	S TGLPALISWIKRKRQE
P01504	GIGAILKVL	A TGLPTLISWIKNRKQ
P59261	GIGAVLKVL	A TGLPALISWIKRKRQQ
P59262	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
P68407	GIGAVLKVL	T TGLPALIGWIKRKRQQ
P68408	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
P68409	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
Q8LW54	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
Q95Z19	GIGAVLKVL	T TGLPALISWIKRKRQQ
Consensus	****:****:****:*.***.***:	
	10	20

Uniprot accession numbers: P01501: *A. mellifera*; P01502: *A. dorsata*; P01504: *A. florea*; P059261: *Polistes hebraeus*; P59262: *Vespula maculifrons*; P68407: *A. cerana cerana*; P68408: *Vespa magnifica*; P68409: *Vespa velutina nigrithorax*; Q8LW54: *A. cerana*; Q95Z19: *Polistes* sp. Consensus sequence as calculated by ClustalW. (*) identity; (:) conserved substitution and (.) semi-conserved substitution, according to [16] and <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>.

In light of the apparent monthly variation of the novel peptide content, its normalized percent area was plotted as a function of the month of the year, as presented in Fig. 3. As one can see, melittin-S secretion remains constant during the year and suddenly rises during the (southern) winter, and then gets back to its normal values. Data are presented as normalized peak area percent ± S.D.

Next, in order to assess whether this conservative amino acid substitution would arouse any conformation change, CD analyses were performed with both melittin and melittin-S, as depicted in Fig. 4 that contains the spectra obtained in 25% TFE. One can observe that the global shape of the spectra is the same, but there are changes that indicate possible structural variation (the valley at 222 nm, for instance). These variations were confirmed by the calculation of the secondary structure content and its fractions, as presented in Table 2 that shows that there is a major change from helix to unordered structures in melittin-S, rather than a change from helices to strands.

Once melittin has had its 3D structure determined and it is available at the PDB (DOI:10.2210/pdb2mlt/pdb), the effect of such

Fig. 3. Normalized monthly percent peak area variation of melittin-S.

Fig. 4. Superimposed circular dichroism (CD) spectra of 7 μM melittin (solid line) and 7 μM melittin-S (dashed line), in the presence of 25% trifluoroethanol.

amino acid substitution could be probed by means of molecular modeling, as presented in Fig. 5. This figure shows the melittin model, with the Ser substitution as in melittin-S, calculated by the SWISS-MODEL. Peptide structure is presented as sticks, and surface potential is represented by the wireframe. In yellow, the substituted amino acid showing the high degree of exposure to the solvent and the particular ‘hinge’ region that it occupies.

Once the major toxic effect known to melittin is hemolysis, basically due to membrane penetration and pore formation, this assay was performed comparing both the natural and the novel melittin variant. These results are presented in Table 3 that shows a much greater reduction in the hemolysis level (95–35%) than in alpha-helix content (82–64%, Table 2), suggesting a complementary mechanism.

4. Discussion

The development of an anti-serum against *A. mellifera* venom would provide a faster and more efficient treatment for victims of mass stinging. But an effective anti-serum must take into account that it has to be the outcome of the immunization of animals with a representative venom pool of honey bee venoms from the very different ambient conditions, developmental stages, season of milking and diet that the insect may be subjected to.

Venom components variation has been described by Neumann et al. [22], Habermann [11,12] (in the 60s) and more recently, by

Table 2
Calculated secondary structure fractions.

	TFE 25%				Total
	Total ^a helix	Total ^a strand	Turns	Unordered	
Melittin	0.82	0.05	0.02	0.10	0.99
Melittin-S	0.64	0.09	0.05	0.21	0.99
	TFE 100%				Total
	Total helix	Total strand	Turns	Unordered	
Melittin	0.85	0.06	0.03	0.06	1
Melittin-S	0.81	0.07	0.02	0.11	1.01

^a Total corresponds to the sum of both helices or strands contents (regular and distorted) as calculated by the software.

Fig. 5. 3D representation, as calculated by SWISS-MODEL, of the spatial structure of melittin-S. In yellow the substituted residue, indicating its high degree of exposition to the solvent and particular hinge region that it occupies. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 3
Hemolysis parameters.

A_{414}	Controls ^a		Melittin ^b	
	+	–	W.T. ^c	S ^d
AVG ^e ± S.D. (%) ^f	0.079 ± 0.007 (100)	0.044 ± 0.007 (0)	0.077 ± 0.002 (95)	0.056 ± 0.002 (35)

^a Positive control was triton X-100, negative control was sterile PBS solution.

^b Melittin concentration (both) was 3 μ M.

^c Wild-type melittin (Uniprot P01501).

^d Melittin-S.

^e Results correspond to data from independent triplicates.

^f Percent hemolytic activity compared to control.

Owen (in the 90s) [26,27]; however, no current study has been performed employing contemporary analytical tools such as those depicted here and in another recent work by our group [6].

In this way, knowledge of the presence and possible variation of the lesser components become important. Mainly, when one considers the massive attacks that AHB is likely to originate. When a bee stings the mammalian skin it will probably inject the whole contents of its venom sac (0.15–0.3 mg), due to the loss of the sting apparatus, including the venom sac, and its accessory muscles and nerve tissues that will keep contracting until the venom sac becomes empty [5]. In a true massive attack, 500–1000 stings are likely to occur. As a consequence, the victim would receive approximately 0.5 g of venom. At this level, minor components or isoforms start playing significant roles.

This may be the case for melittin-S, which remains in the low 1–2% level throughout the year, but abruptly rises to 10% during the southern winter months, thus becoming a ‘new’ major component, in the same level of PLA₂ (Fig. 1). Due to the close proximity of this new peak to melittin, and the similar molecular mass (Fig. 2), we have performed Edman degradation in order to assess whether this could be a melittin variation or isoform. Table 1 shows the chemically determined amino acid sequence that confirms the 16 Da mass difference observed in the MS spectra (Fig. 2).

Interestingly, the 10th position of melittin has already been probed by Nature (Table 1): *Apis dorsata* has the same Ser residue at this position, but has a Gln/Glu substitution. On the other hand *A. florea* and *Polistes hebraeus* (the common paper nest wasp, belonging to another superfamily of the suborder Apocrita of the Hymenoptera family) have opted for a neutral (in all senses) substitution by putting Ala at this position. All other known insect

melittins (up to this date and excluding the *Rana*’s melittin-like peptides) have Thr at the 10th position.

Kreil [14] has commented on the presence of the Ser residue in *A. dorsata* melittin when discussing the close relationship, molecularly and phylogenetically, between *A. mellifera* and *A. cerana* when compared to the other bees, and the possibility of the cross breeding between these *Apis*. However, that would not be the case for this work, once the hives were extremely homogeneous and the variation was clearly seasonal. Moreover, *wild-type* melittin content has not varied (data not shown), indicating that the bee is responding to some environmental change by synthesizing melittin-S.

The chosen biological assay performed in this work for melittin-S was hemolysis and this peptide showed very different lytic levels as compared to melittin. Moreover, according to the interpretation of the 3D structure of melittin performed by Terwilliger and Eisenberg [36], there is a water soluble tetramer that is stabilized by the interactions of the hydrophobic residues that face each other and that are coated by polar residues. All interactions seem to be maintained by helix–helix contacts. Once the –OH groups present either in naturally occurring Thr or the novel Ser residues of melittins are known to be key players in the stabilization of helical structures due to their ability to participate in hydrogen bonds, and that Ser and Thr share a different χ_1 rotamer probabilistic distributions, it would be expected the secondary structure of melittin-S would be compromised. Stapley and Doig [35] data corroborate ours as those authors demonstrate that, based on compiled PDB data, Thr is more thermodynamically favored to assume a g^- rotamer in an α -helical structure than Ser, which rotates equally both ways, not constraining any preferential structure. Furthermore, this particular substitution occurs in a naturally present hinge region of melittin (Fig. 5), making any subtle change even more pronounced.

Data we have obtained corroborate this idea: the CD spectra of melittin-S obtained in 25% TFE (Fig. 4) clearly presents that there is a difference, in terms of secondary structure contents, between these two melittins. Interestingly, this change seems to be highly dependent on the environment (buffer) in which the experiment was performed. The secondary structure fraction distribution for melittin-S, determined at 25% TFE, is the same as that obtained in 100% aqueous buffer (data not shown), but is significantly different from those measured at 100% TFE (Table 2). TFE is commonly used in CD experiments not because it creates any secondary structure, but because it stabilizes pre-conditioned structures that, for some reason, would not form at those specific conditions [18].

The reason for the secretion of a melittin isoform is, yet, unknown. However, two factors must be taken into account: (i) melittin-S does exist, although in low levels, throughout the year. It is not suddenly synthesized as a completely new product. Therefore, the genetic repertoire and rationale behind its synthesis is already present; and (ii) this variation is not age-based. The worker bees (the ones harvested in this work) only live for a few weeks in mild climates (such it is in Botucatu) due to constant harsh work (no hibernation during winter).

The presence of isoforms of venom components in *A. mellifera* has been previously reported by Kettner et al. [13], when describing the allergen Api m 6. This molecule can be found in four different (iso)forms in the venom, which share a common 67 amino acid kernel and the three variants possess either a N-terminal tetra-peptide extend or a C-terminal dipeptide or both. These authors postulate that unidentified proteases would process Api m 6, resulting in its shedding into the venom sac lumen and subsequent formation of the isoforms. Later, in a subsequent study by Peiren et al. [31], authors showed that Api m 6 is derived from a single locus and that the protein-level variation has a simple genome-level cause, without the need to invoke multiple loci or alternatively spliced exons, nor different proteolytic processing pathways.

Although noteworthy, Api m 6 isoforms secretion into the venom follow a completely different rationale than melittin and melittin-S. The bee venom contains 1–2% Api m 6 at approximately equimolar amounts [13] and its secretion represents a ‘choice’ taken at the nucleic acid level. Melittin and melittin-S, on the other hand, ought to be constitutively secreted as parallel independent gene products and their contents vary significantly and seasonally (this work and Ferreira Junior et al., respectively [6]) throughout the year. Moreover, despite Api m 6 three-dimensional structure is not available, the kind of amino acid substitution among its isoforms is not likely to cause as significant structural changes (Api m 6 is highly constrained by S–S bridges) as those described in this work for melittin-S.

All together, these results indicate that the full comprehension of any given venom mechanism of action will rely on the thorough identification of the venom components. This becomes more important when the envenomation accident is caused by the injection of fairly large amounts of venom, such as biting of an adult *Bothrops jararaca*, in which 3–4 g of venom will be injected, or can also be the case for *A. mellifera* massive attacks, when 1000 bees will inject up to half a gram of venom. In either case, efficient neutralization of the toxic components must be quickly achieved in order to save lives. Such effectiveness will only be possible once every toxic component of the venom is characterized, including isoforms and variants.

Acknowledgments

Supported by funds provided by FAPESP (2007/02476-1 [DCP], 2007/08478-6 [JMS], 2006/55545-8 [RSFjr], 2007/05159-7 [BB]) and CNPq 470873/2007-8 [DCP]. DCP is a CNPq fellow researcher (302405/2008-9) and is also supported by funds of the INCTOX PROGRAM - CNPq/FAPESP.

References

- [1] Al-Badri ZM, Som A, Lyon S, Nelson CF, Nüsslein K, Tew GN. Investigating the effect of increasing charge density on the hemolytic activity of synthetic antimicrobial polymers. *Biomacromolecules* 2008;9:2805–10.
- [2] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006;22:195–201.
- [3] Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom collection from honeybees. *Science* 1963;142:228–30.
- [4] Compton LA, Johnson Jr WC. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem* 1986;155:155–67.
- [5] Crane E. Bees and beekeeping: science, practice and world resources. New York: Cornstock Publ.; 1990.
- [6] Ferreira Junior RS, Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Junior A, Orsi RO, Barraviera B, et al. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. *Toxicon* 2010, doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.023.
- [7] Francese S, Lambardi D, Mastrobuoni G, Marca G, Moneti G, Turillazzi S. Detection of honeybee venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009;20:112–23.
- [8] Glättli A, Chandrasekhar I, van Gunsteren WF. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. *Eur Biophys J* 2006;35:255–67.
- [9] Graaf DC, Aerts M, Danneels E, Bee Devreese B. Wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics* 2009;72:145–54.
- [10] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 1997;18:2714–23.
- [11] Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972;177:314–22.
- [12] Habermann E, Kowallek H. Modifications of amino group and tryptophan in melittin as an aid to recognition of structure–activity relationships. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1970;351:884–90.
- [13] Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, et al. Api m 6: a new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:914–20.
- [14] Kreil G. The structure of *Apis dorsata* melittin: phylogenetic relationships between honey bees as deduced from sequence data. *FEBS Lett* 1975;54:100–2.
- [15] Kreil G, Bachmayer H. Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Detection of a possible precursor. *Eur J Biochem* 1971;20:344–50.
- [16] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [17] Lohley A, Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 2002;18:211–2.
- [18] Luo P, Baldwin RL. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* 1997;36:8413–21.
- [19] Manavalan P, Johnson Jr WC. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* 1987;167:76–85.
- [20] McKenna WR. The Africanized honey bee. *Allergy Proc* 1992;13:7–10.
- [21] Meller VH, Davis RL. Biochemistry of insect learning: lessons from bees and flies. *Insect Biochem Mol Biol* 1996;26:327–35.
- [22] Neumann W, Habermann E, Hansen H. Differentiation of two hemolytic factors in bee venom. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol* 1953;217:130–43.
- [23] Owen MD. Relationship between age and hyaluronidase activity in the venoms of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Toxicon* 1979;17:94–8.
- [24] Owen MD, Braidwood JL. A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Can J Zool* 1974;52:387.
- [25] Owen MD, Bridges AR. Catecholamines in honey bee (*Apis mellifera*) and various vespid (Hymenoptera) venoms. *Toxicon* 1982;20:1075–84.
- [26] Owen MD, Pfaff LA. Melittin synthesis in the venom system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon* 1995;33:1181–8.
- [27] Owen MD, Pfaff LA, Reisman RE, Wypych J. Phospholipase A₂ in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon* 1990;28:813–20.
- [28] Owen MD, Sloley BD. 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honeybee (*Apis mellifera* L.): variation with season and with insect age. *Toxicon* 1988;26:577–81.
- [29] Ownby CL, Powell JR, Jiang MS, Fletcher JE. Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon* 1997;35:67–80.
- [30] Page Jr RE, Peng CY. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol* 2001;36:695–711.
- [31] Peiren N, de Graaf DC, Evans JD, Jacobs FJ. Genomic and transcriptional analysis of protein heterogeneity of the honeybee venom allergen Api m 6. *Insect Mol Biol* 2006;15:577–81.
- [32] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution. *Biopolymers* 2006;83:111–21.
- [33] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1381–5.
- [34] Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 2000;287(2):252–60.
- [35] Stapley BJ, Doig AJ. Free energies of amino acid side-chain rotamers in α -helices, β -sheets and α -helix N-caps. *J Mol Biol* 1997;272:456–64.

- [36] Terwilliger TC, Eisenberg D. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J Biol Chem* 1982;257:6016–22.
- [37] Vetter RS, Visscher PK, Camazine S. Mass envenomations by honey bees and wasps. *West J Med* 1999;170:223–7.
- [38] Vogt W, Patzer P, Lege L, Oldigs HD, Wille G. Synergism between phospholipase A and various peptides and SH-reagents in causing haemolysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1970;265:442–54.
- [39] Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 2004;32:W668–73.
- [40] Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 2008;89:392–400.
- [41] Williams DL. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet J* 2000;160:61–73.

Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels

Rui S. Ferreira Junior^{a,d}, Juliana M. Sciani^b, Rafael Marques-Porto^b, Airton Lourenço Junior^d, Ricardo de O. Orsi^c, Benedito Barraviera^{a,d}, Daniel C. Pimenta^{b,d,*}

^a Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^d Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP, UNESP, P.O. box 577, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2009

Received in revised form 19 March 2010

Accepted 23 March 2010

Available online 18 April 2010

Keywords:

Apis mellifera

Africanized honey bee

Melittin

Seasonal variation

Natural peptides

ABSTRACT

Apis mellifera venom is comprised basically of melittin, phospholipase A₂, histamine, hyaluronidase, catecholamine and serotonin. Some of these components have been associated with allergic reactions, amongst several other symptoms. On the other hand, bee mass stinging, caused by Africanized honey bee (AHB), is increasingly becoming a serious public health issue in Brazil; therefore, the development of efficient serum-therapies has become necessary. In this work, we have analyzed the venom composition of AHB in Brazil through one year. In order to verify the homogeneity of this venom, one specific hive was selected and the correlation with climatic parameters was assessed. It was possible to perceive a seasonal variation on the venom contents of melittin and phospholipase A₂. Moreover, both compounds presented a synchronized variation of their levels, with an increased production in the same months. This variation does not correlate or synchronize with any climatic parameter. Data on the variation of the AHB venom composition is necessary to guide future intra and inter species studies.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In October 1957, 26 swarms of African honey bees – *Apis mellifera scutellata* previously *A. m. adansonii* – escaped from an apiary in Rio Claro, Brazil (22°24'48"S; 47°34'10"W). Due to their defensive behavior (among other successful characteristics of these strains), they have spread through the Americas at a rate of 250–300 Km per year, having reached Mexico in 1985, the Lower Rio Grande Valley (Texas, USA) in October 1990, and Phoenix (Arizona, USA) in October 1993 (33°26'54"N; 112°04'26"W) (França et al., 1994; Schumacher et al., 1995). This event made cross-breeding

between the already introduced European bees and the free African bees possible, leading to the appearance of the Africanized honey bee (AHB). These bees are more aggressive and able to release higher amounts of venom upon stinging, which, in an accident, may cause significant injuries to humans and domestic animals (Brizola-Bonacina et al., 2006).

Studies conducted by Schumacher et al. (1989) showed differences in the lethality of this venom in comparison with two populations of European honey bees (EHB). Nevertheless, Schumacher et al. (1990) also demonstrated that the lethality among mice treated with AHB venom may be similar to those treated with the EHB venom. Moreover, Schumacher et al. (1992) showed that AHB tends to carry slightly less venom in their venom reservoirs than the EB (98.2 ± 35.9 and 134.1 ± 53.5 µg, respectively). This corroborates the findings that the AHB possesses smaller

* Corresponding author. Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3726 7222x2101; fax: +55 11 3726 7222x2018.

E-mail address: depimenta@butantan.gov.br (D.C. Pimenta).

venom glands and lower hyaluronidase content (Owen, 1983). Funari et al. (2001) verified that, upon stinging, the AHB is able to release more venom than the EB, despite the smaller capacity of its venom reservoir.

The main component, ~50–60% by dry weight, in AHB venom is melittin (Brochetto-Braga et al., 2006), which has also been shown to be the main lethal component in the venom (Schmidt, 1995). The active 26 amino acid peptide is released from its precursor, promelittin, during biosynthesis and has hemolytic activity, as well as being the primary allergen in bee venom (de Graaf et al., 2009). It is an amphiphilic peptide, with a predominantly hydrophobic N-terminal region and a hydrophilic C-terminal region, with the characteristic structure of membrane bound cytolytic, channel-forming peptides and trans-membrane protein helices (Glättli et al., 2006; Raghuraman and Chattopadhyay, 2006). It acts synergistically (Vogt et al., 1970; Ownby et al., 1997) with phospholipase A₂ (PLA₂), an enzyme constituting approximately 11% of the venom dry weight (Owen, 1979). It has been shown that the levels of different *A. mellifera* venom components, such as histamine (Owen and Braidwood, 1974), hyaluronidase (Owen, 1979), dopamine and noradrenaline (Owen and Bridges, 1982), 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Owen and Soley, 1988) and PLA₂ (Owen et al., 1990) may change with the age of the individuals or the season of the year (Owen and Braidwood, 1974). Specifically, Owen and Pfaff (1995), showed that melittin content changes as the summer (Northern hemisphere) progresses.

Bee venom composition has been studied previously. However, the literature deals mainly with inter-race differences, quantity and quality (e.g., composition) of the venom, and influence of the method of collection on the venom composition. There has been no longterm (12 months) study comparing the venom composition within the same beehive and its possible correlations with climatic parameters. The present work focused on the biochemical characterization of the seasonal variation of the major components of the AHB venom, by analyzing the pooled venom composition of individuals pertaining to one specific hive for the course of one year. Here we report the seasonal variation of melittin and PLA₂ in the contents of the venom. The relevance of dealing with venom composition variation lies on the need of the development of an effective serum-therapy for the increasing bee mass-stinging accidents.

2. Material and methods

2.1. Reagents

All reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma Co (St Louis, MO, USA).

2.2. Venom collection

AHB (*A. mellifera*) workers, age 30–40 days, were obtained from a specific hive at the Apiary of Botucatu School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry (UNESP, State of São Paulo, Brazil) once a month, every 3rd week of the month, from October 2007 to September 2008.

2.2.1. Manual stimulation

Manual (or reservoir disrupting) venom extraction, was performed as follows: one hundred foraging bees were captured near the entrance of the colony and immobilized by quick freezing at –20 °C. After that, each individual was dissected and the sting apparatus and the venom reservoirs were removed and the venom was collected through reservoir disruption, i.e., venom reservoirs (or sacs) were carefully opened onto a glass slide, rinsed out in distilled water, centrifuged, lyophilized and stored at –20 °C.

2.2.2. Electrical stimulation

Venom was collected according to a slight modification of the Benton protocol (Benton et al., 1963). Briefly, a wired glass plate was placed in the entrance of the hive so that the homing bee had to land on the plate in order to gain access to the interior of the colony. The wires are electrified and apply mild shocks to the bees that respond by stinging the surface on which they are walking. The venom dries rapidly on the glass plate and can be scraped off and processed as described above. Approximately one hundred bees were allowed to land on the plate.

2.3. Chromatographic analyses

2.3.1. RP-HPLC profiling and purification

A reversed-phase binary HPLC system (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan) was used for sample profiling and separation. The lyophilized crude venom powder was solubilized into 0.1% trifluoroacetic acid and the twelve-month collections were normalized to 1 mg mL^{–1} solutions, based on sample mass. These solutions were centrifuged and the supernatant was separated for subsequent chromatographic analyses. Twenty-microliter aliquots were loaded in an ACE C8 column (ACE 3 µm, C8, 300 Å, 100 × 2.1 mm) in a two-solvent system: (A) trifluoroacetic acid/H₂O (1:1000) and (B) trifluoroacetic acid/acetonitrile/H₂O (1:900:100). The column was eluted at a constant flow rate of 0.2 mL min^{–1} with a 10–100% gradient of solvent B over 31 min, after a 5 min isocratic elution with 10% B. The HPLC column eluates were monitored by a Shimadzu SPD-M20A PDA detector scanning from 200 to 500 nm (1 nm steps). Background subtraction was performed for chromatogram superimposition and integration.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry analyses were performed in an ESI mass spectrometer (LCQDuo™, ThermoFinnigan, USA), equipped with a nanospray source and connected to nanoHPLC system (UltiMate HPLC System, LC Packings, Dionex, USA). The samples were introduced in the spectrometer by flow rate at 1 µL/min and diluted in a solution of 5% acetonitrile and 0.2% formic acid. The spray voltage was kept at 1.8 kV, the capillary voltage at 46 V, the capillary temperature at 180 °C and the tube lens offset was kept at –5 V. MS spectra were collected in centroid mode in the 50–2000 *m/z* range. Instrument control, data acquisition and data processing were performed with the Xcalibur Suite.

Fig. 1. Superimposed RP-HPLC profiles ($\lambda = 214$ nm) of *A. mellifera* venoms obtained by manual (continuous trace) and electrical (dashed traced) stimulations. The arrows at 35.8' and 40.4' denote the most abundant peaks detected in venom collected by the electrical stimulation and that were analyzed through this work.

Molecular mass analyses were performed on an Ettan MALDI-TOF/Pro system (Amersham Biosciences, Sweden), using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix, under positive reflectron mode, using external calibrants.

2.5. Peptide sequencing

Complete peptide sequencing and/or N-terminal protein determinations were/was performed by Edman degradation using a Shimadzu PPSQ-21 automated protein sequencer, following the manufacturer's standard instructions. Amino acid analyses were performed to quantify the different peptide batches used through this work.

2.6. Climatic parameters

Data used in the present work were collected in Botucatu, SP, Brazil (22°51'S, 48°26'W, elevation 786 m) at the UNESP Agrometeorological station (Environmental Sciences Department; Agronomic Sciences Faculty) that continuously monitor the region. The chosen parameters were: air temperature in Celsius degrees (°C) (minimal, maximal and average), precipitation rate (in mm of rain), relative humidity of air (percent) and hours daylight (measured by a photocell).

2.7. Data fitting, statistical analyses and sequence alignment

When data fitting was performed, results were presented as the calculated value $\pm$ standard deviation (SD). Otherwise, data correspond to the mean of three individual experiments. Peptide sequence alignment was performed using ClustalW software (Larkin et al., 2007).

3. Results

Collection by means of electrical stimulation provided a much more consistent and clearer venom solution than manual collection. Significant differences in the shape, distribution, intensity and presence or absence of peaks are also outstanding when comparing the two venom collection methodologies (Fig. 1). Therefore, electric was the

methodology selected for the venom analyses comparisons performed through this work.

The monthly venom solutions were normalized to 1 mg mL⁻¹ (dry venom weight) and 20 μ L aliquots were analyzed by reversed-phase HPLC. Background subtracted chromatograms were individually integrated and analyzed at $\lambda = 214$ nm. This wavelength was selected because it represents the condition in which the most peaks were detected, as depicted in Fig. 2A, in a 3D-view of the PDA-scanning chromatogram.

The 12-month superimposed composite image is presented in Fig. 2, panel B. On average, one hundred different peaks could be detected on each sample. However, there are less than 10 major peaks that would serve for quantitative-based comparison; we have chosen the two major peaks clearly identified at 35.67' and 40.38'. The insert in Fig. 2 shows the same twelve chromatograms in a 3D-zoomed style in order to show the myriad of minor peaks present in the venom solution.

There is a clear major peak eluting at 40.38' (Fig. 2B), and a second most intense peak at 35.67' (Fig. 2B). These are consistent peaks through the year and, therefore, were selected for molecular characterization. Mass spectrometric analyses (Fig. 3) and Edman degradation were performed for these peaks and yielded two peptidic sequences, as presented on Table 1. Not surprisingly, the major peak (40.38') corresponds to melittin, the known main component of the bee venom, and the second major peak, to PLA₂.

Next, the peak areas were analyzed. Table 2 presents the monthly variation of the percent area of the 2 major peaks analyzed, a constant peak eluting at RT 32.1' and a random choice of a peak eluting at 15' to serve as controls for the data analyses. The bottom section of this table contains the climatic parameters measured at the hive location, namely: average monthly air temperature, total precipitation rate (mm), mean percent air humidity, and mean daily hours daylight.

As observed in Fig. 2B, there was an apparent significant variation in the areas of the bee venom major peaks, which is presented in detail in Table 2. In order to verify whether this variation was seasonal or related to any climatic

Fig. 2. (A) 3D RP-HPLC profile containing the wavelength scan of *A. mellifera* venom obtained by electrical stimulation. Note the intense absorbance at $\lambda = 214$ and, secondarily, at 280 nm. (B) Superimposition of the twelve monthly RP-HPLC profiles of Africanized honey bee venoms solutions obtained by electrical stimulation, at $\lambda = 214$ nm. Insert: 3D-style depiction of the same data, with greater magnification, starting from October/07 sample (bottom).

parameter, the monthly peak areas of melittin and PLA₂ were plotted as function of the month (Fig. 4, panel A). Due to the data distribution undulating pattern and the fact that half of the values were outside the 1σ range, a periodic-function non-linear regression was performed for these data using $f(x) = BL + A \cdot \sin(F \cdot x + \varphi_0)$, where BL represents the base line, i.e., horizontal displacement, A is the amplitude of the variation, F is the frequency ($t = 2 \cdot \pi / F$, t is the frequency correction for time) and φ_0 the phase shift. Melittin and PLA₂ content in the venom seems to follow a semestral synchronized variation, with frequencies of

5.89 ± 0.65 and 5.28 ± 0.57 months for melittin and PLA₂ respectively (Fig. 4, panel B).

Next, an analysis of the melittin production as a function of the climate was attempted. However, the only climatic parameters that adjusted to a periodic-function non-linear regression were the air temperature ($\square$) and percent relative air humidity (x), as presented in Fig. 5. It seems clear that melittin production ($\bullet$) does not correlate with the analyzed climatic parameters, for the calculated frequencies do not synchronize (8.72 ± 0.53 and 11.42 ± 3.43 , temperature and humidity monthly

Fig. 3. Mass spectrometric profiles and deconvoluted data of the two compounds selected for investigation in this work. (A) MS^2 profile of the peptide eluting at 40.4' and daughter ion assignment as performed by SEQUEST. Insert: the MS profile of the purified peptide, indicating the ionic envelope. (B) MS profile of the protein eluting at 35.8'. Insert: deconvoluted data.

Table 1 Peptidic sequences obtained from *A. mellifera* venom.

RT (min)	Determined sequence	Match (UniProt ref.)
40.38	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ–NH ₂	Melittin (P01501)
35.67	IIPGTLWCGHGKSSGPNELGRFKHT...	Phospholipase A2 (P00630)

frequencies, respectively). It is noteworthy to mention that, although the humidity variation frequency could be a harmonic of the melittin production frequency, they are out of phase by almost 4 months ($\Delta\phi_0 = 3.80$ months). This would be the same for PLA₂ production, once its production is synchronized with melittin.

4. Discussion

The remarkable differences observed between the manual and the electrical stimulation venom collections are probably caused by damaged tissue, intestinal contents leakage and other venom duct contents (e.g., contamination). Probably, manual venom collection is subjected to larger intrinsic variations caused more by the collection conditions than the venom composition itself. On the other hand, the electrical stimulation is likely to generate larger amounts of a purer sample, without the need to sacrifice the bees in the collection process. As a consequence, the electrical stimulation venom collection was selected for this work. Fig. 1 contains the superimposition of the two collection methodologies. One should notice the much larger void peak present in the manually stimulated collection, which may represent intestinal contents and other undistinguishable contaminants. Moreover, for the manual stimulation procedure, both melittin and PLA₂ lose their 'major peaks' status (Fig. 1, arrows).

Fig. 2B presents a superimposition of a year of collected venoms. The main profile suits well to depict the high system stability and reproducibility as well as the sample homogeneity and representativeness. However, in terms of visual comparison it lacks clarity. In order to make it clear, a zoomed 3D-style superimposition is presented in the insert, in which one can see that the venom does contain other components than melittin and PLA₂, and that these components do vary as well. However, this study focused on the variation of the two major venom components and their possible correlation to climatic parameters. Further studies are necessary in order to identify more subtle variation present in the other components.

Despite the fact that the AHB typically possess less venom in the reservoir than the EHB (Carniolan and Italian) (Schumacher et al., 1992), they are able to release larger amounts of venom upon extraction (Funari et al., 2001). Moreover, it was observed that the electric produced venom that is cleaner and presents no debris. Fig. 1 points this out accordingly. Both profiles are scaled and one can observe that the manual stimulation not only contains a myriad of peaks eluting in the 25'–45' region, but also more hydrophilic peaks that were not observed in the electric (dashed line). Also noteworthy is the size of the unbound fraction in the manual stimulation. The void peak is approximately 10 times larger than the same peak for

Table 2
Percent chromatographic peaks areas of Africanized honey bee venom analyzed monthly and climatic parameters.

Peak	Monthly percent chromatographic area												Mean ± SD ^a
	2007						2008						
	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	
PLA ₂	185 ^b	10.3	9.1	8.4	8.6	13.2	11.9	17.0	8.9	13.1	12.5	14.6	12.2 ± 3.2
Melittin	55.2	38.0	41.3	23.6	32.9	54.4	43.0	54.2	53.1	40.0	41.8	40.1	43.1 ± 9.3
CTRL ^c	1.2	0.8	1.0	0.9	1.6	1.3	1.4	1.3	1.0	1.1	1.1	1.0	1.1 ± 0.2
RND ^d	0.005	–	–	0.497	–	0.097	–	–	–	–	0.112	0.030	0.1 ± 0.2
Monthly average/totals climatic parameters													
°C ^e	23.9	22.0	22.8	22.5	23.5	23.0	21.6	18.3	17.6	19.1	20.3	20.3	– ⁱ
mm rain ^f	77.7	177.0	180.6	279.3	94.6	60.9	102.8	115.7	30.8	0	104.1	29.9	–
% hum ^g	57.5	67.3	65.4	72.5	68.3	61.1	68.9	54.7	60	40.5	53.3	63.4	–
Ins. hrs. ^h	7.38	6.31	7.81	3.92	5.83	7.34	6.06	7.02	6.6	9.07	7.52	7.78	–

^a Mean ± standard deviation.^b Gray boxes indicate values outside the 1σ range.^c CTRL stands for the control peak, e.g., a peak that is constant in area and consistent during the period (RT = 32.10').^d RND stands for a random peak, e.g., an arbitrarily chosen peak monitored during the period (RT = 15.00').^e Temperature in Celsius.^f Total monthly rain, measured in mm.^g Average daily percent humidity of the air.^h Average hours daylight.ⁱ Not detected/not calculated.

Fig. 4. (A) Normalized monthly percent peak area variation of melittin (black bars); phospholipase A₂ (white bars) and a control peak (32.1 min; gray bar). Variations larger than 1σ are indicated. (B) Data-fitted sinoidal variation of monthly production of melittin (●) and PLA₂ (○). Dashed lines represent the average value.

electric (data not shown, although it can be inferred from the profile). This material may correspond to feces and/or other damaged tissue fragments.

Venom components age (and seasonal, in a lesser degree) variation is not a novelty. In fact, for honey bees, this phenomenon was described almost right after the identification of the venom components themselves. However, in spite of those classical works by Neumann et al. (1953) and Habermann (1972) and more recently, by Owen et al. (1990) and Owen and Pfaff (1995), no current study has been performed, employing contemporary analytical tools such as those depicted here. Mainly, what

has been analyzed are PLA₂ and hyaluronidase production in terms of the bee age (Owen et al., 1990; Owen, 1979). Also, the total amount of protein seems to vary together with the insect age, as studied by Abreu et al. (2000). Melittin production as a function of age and season of the year was analyzed by Owen and Pfaff (1995), but by means of assessing the hemolytic activity of this peptide. More recently, Peiren et al. (2005), performed a proteomic approach to the bee venom by performing 2D gels in which peptides such as melittin cannot be detected.

Finally, the production of specific AHB antivenom should take into account the possible regional variability of

Fig. 5. Data-fitted sinoidal variation of the monthly production of mellitin (●) and humidity (×) and temperature (□) values.

the venom composition due to climatic, seasonal and feeding factors. These variations could be either quantitative or qualitative. The compounds analyzed in this work presented a quantitative variation, but a closer inspection in Fig. 2B can reveal peaks that undergo qualitative variation through the year. The possible qualitative variations still need to be investigated compared with other bees colonies, and other regions. And so does the expected changes in the venom production profile over the year for different hives. All these factors, in addition to the ones studied here in which we describe changes in the proportion of bee venom components as a function of time, need to be thoroughly studied in order to obtain an effective serum-therapy against bee mass-venomation.

Acknowledgments

The authors thanks to Prof. Dr. Dinival Martins by Climatic Parameters Data kindly provided (Environmental Sciences Department; Agronomic Sciences Faculty, UNESP, Brazil).

Supported by funds provided by FAPESP (2006/55545-8 [RSFjr], 2007/05159-7 [BB], 2007/02476-1 [DCP], 2007/08478-6 [JMS]) and CNPq 470873/2007-8 [DCP]. DCP is also a CNPq fellow researcher 302405/2008-9 and member of the INCITOX PROGRAM - CNPq/FAPESP.

Conflict of interest statement

None declared.

References

- Abreu, R.M.M., Silva de Moraes, R.L.M., Malaspina, O., 2000. Histological aspects and protein content of *Apis mellifera* L. worker venom glands: the effect of electrical shocks in summer and winter. *J. Venom. Anim. Toxins* 6, 87–98.
- Benton, A.W., Morse, R.A., Stewart, J.D., 1963. Venom collection from honey bees. *Science* 142, 228–230.
- Brizola-Bonacina, A.K., Alves Júnior, V.V., Moraes, M.M.B., 2006. Relation between the size of the acid gland and the quantity of venom

- produced in Africanized bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in the region of Dourados, MS, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 35, 210–214.
- Brochetto-Braga, M.R., Palma, M.S., Carmona, E.C., Chaud-Netto, J., Rodrigues, A., Da Silva, G.P., 2006. Influence of the collection methodology on the *Apis mellifera* venom composition: peptide analysis. *Sociobiology* 47, 761–770.
- de Graaf, D.C., Aerts, M., Danneels, E., Devreese, B., 2009. Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J. Proteomics* 72, 145–154.
- França, F.O., Benvenuti, L.A., Fan, H.W., Dos Santos, D.R., Hain, S.H., Picchi-Martins, F.R., Cardoso, J.L., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Warrell, D. A., 1994. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees – *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Q. J. Med.* 87, 269–282.
- Funari, S.R.C., Zeidler, P.R., Rocha, H.C., Sforzin, J.M., 2001. Venom production by Africanized honey bees (*Apis mellifera*) and Africanized-European hybrids. *J. Venom. Anim. Toxins* 7, 190–198.
- Glättli, A., Chandrasekhar, I., Van Gunsteren, W.F., 2006. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. *Eur. Biophys. J.* 35, 255–267.
- Habermann, E., 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177, 314–322.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Neumann, W., Habermann, E., Hansen, H., 1953. Differentiation of two hemolytic factors in bee venom. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 217, 130–143.
- Owen, M.D., 1979. Relationship between age and hyaluronidase activity in the venoms of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Toxicon* 17, 94–98.
- Owen, M.D., 1983. The venom system and venom hyaluronidase of the African honey bee (*Apis mellifera adansonii*). *Toxicon* 21, 171–174.
- Owen, M.D., Braidwood, J.L., 1974. A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Can. J. Zool.* 52, 387.
- Owen, M.D., Bridges, A.R., 1982. Cathecolamines in honey bee (*Apis mellifera*) and various vespids (Hymenoptera) venoms. *Toxicon* 20, 1075–1084.
- Owen, M.D., Pfaff, L.A., 1995. Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Toxicon* 33, 1181–1188.
- Owen, M.D., Sloley, B.D., 1988. 5-hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L.): variation with season and with insect age. *Toxicon* 26, 577–581.
- Owen, M.D., Pfaff, L.A., Reisman, R.E., Wypych, J., 1990. Phospholipase A₂ in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon* 28, 813–820.
- Ownby, C.L., Powell, J.R., Jiang, M.S., Fletcher, J.E., 1997. Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon* 35, 67–80.
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., De Graaf, D.C., Devreese, B., Van Beeumen, J., Jacobs, F.J., 2005. The protein composition of honey bee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1752, 1–5.
- Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2006. Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution. *Biopolymers* 83, 111–121.
- Schmidt, J.O., 1995. Toxinology of venoms from the honey bee genus *Apis*. *Toxicon* 33, 917–927.
- Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., Egen, N.B., 1989. Lethality of "killer" bee stings. *Nature* 337, 413.
- Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., Egen, N.B., Lowry, J.E., 1990. Quantity, analysis and lethality of European and Africanized honey bee venoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 79–86.
- Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., Egen, N.B., Dillon, K.A., 1992. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honey bees. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 59–65.
- Schumacher, M.J., Schmidt, J.O., Egen, N.B., 1995. Significance of Africanized bees for public health. A review. *Arch. Intern. Med.* 155, 2038–2043.
- Vogt, W., Patzer, P., Lege, L., Oldigs, H.D., Wille, G., 1970. Synergism between phospholipase A and various peptides and SH-reagents in causing haemolysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 265, 442–454.

Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*

Gisele Picolo^a, Miki Hisada^b, Analuê B. Moura^c, Maurício F.M. Machado^d, Juliana M. Sciani^e, Isaltino M. Conceição^e, Robson L. Melo^f, Vitor Oliveira^d, Maria Teresa R. Lima-Landman^c, Yara Cury^a, Katsuhiko Konno^{f,1}, Mirian A.F. Hayashi^{c,f,*}

^a Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

^b Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto, Osaka 618-8503, Japan

^c Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP 04044-020, Brazil

^d Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP 04044-020, Brazil

^e Laboratory of Pharmacology, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

^f Center for Applied Toxinology (CAT/CEPID), Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2009

Accepted 20 August 2009

Keywords:

Solitary wasp venom
Bradykinin
Ileum contraction
ACE inhibition
Hyperalgesia

ABSTRACT

Bradykinin (BK) and its related peptides are widely distributed in venomous animals, including wasps. In fact, we have previously purified a novel BK-related peptide (BRP) named Cd-146 and the threonine⁶-bradykinin (Thr⁶-BK) from the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. Further survey of this same wasp venom extract allowed the structural characterization of two other novel BRPs, named here as fulvonin and cyphokinin. Biochemical characterization performed here showed that although the high primary structure similarity observed with BK, these wasp peptides are not good substrates for angiotensin I-converting enzyme (ACE) acting more likely as inhibitors of this enzyme. In pharmacological assays, only those more structurally similar to BK, namely cyphokinin and Thr⁶-BK, were able to promote the contraction of guinea-pig ileum smooth muscle preparations, which was completely blocked by the B₂ receptors antagonist HOE-140 in the same way as observed for BK. Only fulvonin was shown to potentiate BK-elicited smooth muscle contraction. Moreover, the 2 new wasp BRPs, namely fulvonin and cyphokinin, as well as Cd-146 and Thr⁶-BK, showed hyperalgesic effect in the rat paw pressure test after intraplantar injection. This effect was shown here to be due to the action of these peptides on BK receptors, since the hyperalgesia induced by both Cd-146 and fulvonin was blocked by B₁ receptor antagonist, while the effect of both cyphokinin and Thr⁶-BK was reversed by B₂ antagonist. This data give support to a better understanding of the function and targets of the kinin-related peptides widely found in several insect venoms.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: BK, bradykinin; ACE, angiotensin I-converting enzyme; Thr⁶-BK, threonine⁶-bradykinin; FRET, fluorescence resonance energy transfer; Fmoc, N-9-fluorenylmethoxycarbonyl; TFA, trifluoroacetic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; CPY, carboxypeptidase Y; APM, aminopeptidase M; CPB, carboxypeptidase B; CID, collision-induced dissociation; PSD, post-source decay; HOE-140, icatibant.

* Corresponding author at: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Department of Pharmacology, Rua 3 de maio 100, Ed. INPAR – 3rd floor, CEP 04044-020, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4499; fax: +55 11 5576 4499.

E-mail address: mhayashi@unifesp.br (Mirian A.F. Hayashi).

¹ Present address: Institute of Natural Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan.

1. Introduction

Bradykinin (BK) [RPPGFSPFR] and its related peptides are widely distributed in venomous animals such as frogs and wasps. In the case of wasp, the first component found in social wasp venom was a kinin-like or BK-related peptide (BRP) that was described as a pain-producing substance [1]. Since then, many peptides of this class have been found in social wasp venoms, which are collectively known as wasp kinins [2].

BRPs have also been found in solitary wasp venoms as neurotoxins. The venoms of two scoliid wasps, *Megascolia flavifrons* and *Colpa interrupta*, contain both threonine⁶-bradykinin (Thr⁶-BK) and megascoliakinin, which act presynaptically blocking the nicotinic acetylcholine receptors in the insect central nervous system [3–5].

In particular, the Thr⁶-BK is one of the most widely distributed kinin-related peptide [6]. It has been isolated and characterized from different species, including frogs, alligators, turtle, snake, and mainly from insects, as wasp and ant [3–5,7–15]. However, up to now, little is known about the Thr⁶-BK pharmacological activity and its mechanism of action in mammals, with some few reports of paw oedema and nociceptive behavioural responses after local (intraplantar) injection in unanaesthetized rats [12], and a central anti-nociceptive effects after intracerebroventricular injection to rats [15].

Our survey of solitary wasp venoms allowed identifying Thr⁶-BK peptide in four species of wasp inhabiting Japan [16]. Of these, the venom of *Cyphononyx fulvognathus* (formerly known as *Cyphononyx dorsalis* [17]) contained a novel type of BRP, e.g., Cd-146 [SETGNTVTVKGFSPRLR], besides the well-known Thr⁶-BK [RPPGFTPFRR] [18]. In addition, three new proteins were further identified in this venom: an arginine kinase-like protein that was highly homologous to that of honeybee, an elastase-like protein that was homologous to that of fire ant, and an unknown protein that was not homologous to any protein in the database [19]. In the present work, we further surveyed the extract of this same wasp venom and found two other completely novel BRPs, named fulvonin [SIVLRGKAPFRR] and cyphokinin [DTRPPGFTPFRR]. Herein we report the chemical, biochemical and pharmacological characterization of these new peptides found in the *C. fulvognathus* venom besides the known Cd-146 and Thr⁶-BK peptides.

Interestingly, we verified that, in fact, those peptides showing the highest structural similarity to BK, which were the case of Thr⁶-BK and cyphokinin, were able to contract smooth muscle preparation, while the other two peptides studied here, namely fulvonin and Cd-146, could not. On the other hand, all these peptides were able to inhibit ACE as well as to induce the hyperalgesic effect in living rats after intraplantar injection. The use of specific BK-receptors antagonists also allowed the identification of BK-receptors as the target of these wasp peptides.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Rabbit lung angiotensin I-converting enzyme (ACE), carboxypeptidase B (CPB), captopril, bradykinin, BPP-5a and BK-receptor antagonists [Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK and HOE-140] were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid was purchased from Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI, USA). Carboxypeptidase Y (CPY) was obtained from Applied Biosystems (Framingham, MA, USA), while Sequazyme kit and aminopeptidase M (APM) were from Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN, USA). HPLC grade acetonitrile (AcN), trifluoroacetic acid (TFA) and all other chemical reagents were from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The internally quenched fluorescent substrate Abz-FRK(2,4-dinitrophenol)P-OH was kindly provided by Dr. Adriana Carmona (Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, Brazil).

2.2. Animals

Male guinea pigs (150–250 g body weight) and Wistar rats (170–190 g body weight), which were bred in the animal care facility of the Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil) were used throughout this study. Animals were housed in a temperature- $(21 \pm 2^\circ\text{C})$ and light-controlled (12/12 h light/dark cycle) room and were allowed to have water and food *ad libitum*. All behavioural tests were performed between 9:00 a.m. and 4:00 p.m. All animals were caged and handled under ethical conditions according to interna-

tional rules of animal care, stated by the International Animal Welfare Recommendations, and in accordance with the Guidelines for the Use of Animals in Biochemical Research [20]. All *in vivo* experiments were in accordance with the Guidelines for the Ethical Use of Conscious Animals in Pain Research published by the International Association for the Study of Pain [21] and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Butantan Institute (CEUAIB, protocol number 532/2008).

2.3. Purification

Two *C. fulvognathus* female wasps were collected in Kyoto (Japan), and immediately frozen in dry ice and stored at -75°C . The venom sacs were dissected from the freshly thawed wasp abdomens, lyophilized and kept at -20°C until use.

The lyophilized venom sacs were extracted ($5 \times 0.5\text{ ml}$) with 1:1 AcN–water solution containing 0.1% TFA (AcN/H₂O/0.1% TFA) and the extracts were subjected to reverse-phase HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) using CAPCELL PAK C₁₈, 10 mm $\times$ 250 mm (Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a linear gradient from 5 to 65% of AcN/H₂O/0.1% TFA, at a flow rate of 2.5 ml/min, over 30 min. The observed peaks were manually collected and further submitted to the identification of the primary structure of the peptide.

2.4. Mass spectrometry

All mass spectra were acquired on a Voyager Elite MALDI-TOF MS spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), equipped with a delayed extraction system and 337 nm pulsed nitrogen laser. The accelerating voltage was 20 kV. Argon gas was used as the collision gas for the CID/PSD experiment. A matrix, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was prepared at a concentration of 10 mg/ml in 1:1 AcN/0.1%TFA. The sample (0.5 μl) spotted onto the MALDI sample plate was mixed with the matrix (0.5 μl) and allowed to dry at room temperature.

2.5. Ladder sequencing

On-plate exopeptidase digestion was used for peptide ladder sequencing. The C- and N-terminals were sequenced using CPY (in 30 mM ammonium citrate buffer pH 6.0) and APM (in 10 mM Tris–HCl buffer pH 7.5, 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), respectively. The sample (0.5 μl) was mixed with the enzyme solution (0.5 μl) on the MALDI sample plate at room temperature. To compensate evaporation during digestion process, 0.5 μl of water was added to the solution. After 7 min, 0.5 μl of matrix was added and dried at room temperature.

2.6. Amino-acid sequencing

The amino-acid sequence of the peptides was analyzed by a gas-phase sequencer PPSQ-10 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) based on automated Edman degradation.

2.7. Peptides synthesis

Peptides were synthesized on an automated PSSM-8 peptide synthesizer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) by stepwise solid-phase method using *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. All the resins and Fmoc-L-amino acids were purchased from Nova Biochem (UK). Cleavage of the peptide from the resin was achieved by treatment with a mixture of TFA/1,2-ethanedithiol/ethyl methyl sulfide, at room temperature for 2 h. After removal of the resin by filtration and washing twice with TFA, the combined filtrate was added, dropwise, to diethyl ether at 0°C , and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Then, the crude synthetic

peptide was purified by preparative reverse-phase HPLC using YMC-Pack ODS, 20 mm $\times$ 150 mm (YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan), with isocratic elution of 18–24% of AcN/H₂O/0.1% TFA, at a flow rate of 7 ml/min. Both the homogeneity and the sequence of each synthetic peptide were confirmed by analytical HPLC and MALDI-TOF MS.

2.8. Enzyme activity assay and determination of kinetic parameters

The ACE enzymatic activity was measured using the internally quenched fluorescent substrate Abz-FRK(2,4-dinitrophenol)P-OH [22], in 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, containing 0.05 M NaCl and 10 μ M ZnCl₂ buffer, at 37 °C, in a spectrofluorometer RF-5301-PC (Shimadzu, Tokyo, Japan). The relative inhibition constants (K_i) were determined using the fluorogenic substrates described above in a concentration equal to the previously determined K_m , with increasing concentrations of the analyzed peptides as competitive inhibitors. To determine the K_i values, five solutions with nonfluorogenic synthetic peptides concentrations ranging from 0.1 to 100 μ M were used to construct the graph (V_0/V_i) versus $[I]$ (Fig. 2A, C, E, and G). In the (V_0/V_i) – 1 versus $[I]$ plot, the slope represents $1/K_{i,app}$. The following equations were used to calculate the K_i values: $K_i = K_{i,app}/(1 + [S]/K_m)$, where $[S]$ = molar concentration of the substrate, K_m = Michaelis-Menten constant, where V_0 = velocity of hydrolysis without the inhibitor, V_i = velocity of hydrolysis in the presence of the inhibitor, and $[I]$ = molar inhibitor concentration.

The relative hydrolysis ratio was determined using peptides at a concentration of 50 μ M, under zero-order kinetics, with less than 10% of the substrate consumed by the end of the incubation period, which varied from 10 min to 2 h. The enzyme concentration varied from 0.5 to 50 nM/assay. All assays were performed in triplicate. The enzymatic activities were normalized by protein concentration determined by the Bradford assay [23], using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.9. HPLC analysis and determination of the cleavage sites

Analytical HPLC was performed using a binary HPLC system Shimadzu 10A class- ν p with a UV-Vis detector (220 and 365 nm) and a fluorescence detector (λ_{Ex} 280 nm and λ_{Em} 350 nm), coupled to a C18 column (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), which was eluted with the solvent systems A (TFA 0.1%) and B (water:AcN = 1:9; with TFA 0.1%), at a flow rate of 1 ml/min and a 10–80% gradient of B over 20 min.

2.10. BK-potential on isolated guinea-pig ileum

The BK-potential assays on isolated guinea-pig ileum were performed essentially as previously described [24]. Briefly, male guinea pigs, fasted for 24 h before experiments, were used. Segments of about 15 cm of the terminal ileum were removed, cleaned from surrounding tissues and the lumens were carefully washed with Tyrode solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.36 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.36 mM NaH₂PO₄, 11.9 mM NaHCO₃, 5.04 mM D-glucose), containing diphenhydramine (1 mg/l) and atropine (1 mg/l). After a resting period of 30 min, segments of 1–4.5 cm of the isolated ileum were mounted in a 3 or 5 ml chamber containing continuously aerated Tyrode's solution at 37 °C. Isometric contractions were recorded by means of isometric transducers coupled to a recording system (PowerLab/4SP, AD Instruments) under a load of 1.0 g. Concentration–response curves were obtained for BK and synthetic wasp peptides (Thr⁶-BK and cyphokinin), in absence (control) or presence of captopril [15 and 50 nM] [25], and were fitted through a non-linear regression using the curve-fitting program GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad Soft-

ware, San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean percent values of maximum contraction achieved in control curve $\pm$ S.E.M.

To evaluate the influence of the wasp venom on BK response, single incubation of the BK EC₅₀ concentration [3×10^{-8} M] was repeated several times until stabilization of the contractile response, when the wasp peptides or BPP-5a [0.4 μ M each] were added and pre-incubated for 5 min. After this period, BK EC₅₀ concentration was repeated and the contraction elicited by BK in the presence of each of these synthetic peptides was determined.

The contractile responses to the EC₅₀ concentration of the wasp peptides cyphokinin and Thr⁶-BK, or to BK, used as control, were individually recorded after single bath application. After observing the same contractile response to each of these wasp peptides or BK, the B₂ BK-receptor antagonist HOE-140 [1 μ M] [26,27] was incubated for 10–15 min, before a new addition of the same concentration of the evaluated peptide, for instance, cyphokinin, Thr⁶-BK or BK.

2.11. Nociceptive threshold evaluation

Nociceptive threshold was evaluated using an Ugo Basile® pressure apparatus, essentially as described by Randall and Selitto [28]. Briefly, a force (in g), with increasing magnitude (16 g/s), was applied to the paw. When the animals reacted by withdrawing the paw, the force needed to induce this response was considered the nociceptive threshold. To reduce stress, the rats were habituated to the apparatus one day before the experiments. The test was performed before and after the intraplantar injection of the peptides Cd-146, fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK or sterile saline (0.85% NaCl solution, 100 μ l/paw), used as control. The nociceptive threshold after the intraplantar injections was evaluated at different times up to 6 h.

2.12. In vivo pharmacological treatments

Results obtained in preliminary studies determining a dose-response curve of the peptide Cd-146 (data not shown) demonstrated that the concentration of 10 μ g/paw [5.9 pmol] of this peptide reduces the nociceptive threshold of the treated rats and, because of this, it was chosen to evaluate the hyperalgesic effect induced by all other wasp peptides. The peptides Cd-146, fulvonin, cyphokinin, and Thr⁶-BK [5.9 pmol] were dissolved in sterile saline and injected by the subcutaneous route (s.c.) in the rat plantar region, in a total volume of 100 μ l. The hyperalgesic activity was evaluated before and 30, 60, 120, 240 and 360 min after the treatments with the wasp peptides.

Aiming to verify the participation of BK receptors on the hyperalgesic effect induced by these wasp peptides, B₁ and B₂ receptors antagonists, namely Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK (50 ng/50 μ l) and icatibant (HOE-140, 5 ng/50 μ l), respectively, were injected by intraplantar (s.c.) route, 20 min before the peptides administration. The nociceptive threshold of the animals was evaluated 60 min after Cd-146, fulvonin or cyphokinin [5.9 pmol] injection, or 10 min after Thr⁶-BK [5.9 pmol] injection, that corresponds to the peak of hyperalgesic effect for each wasp peptides. It is worth to mention that the concentration of BK-receptors antagonists used here was enough to block the hyperalgesia induced by BK peptide (500 ng/50 μ l, intraplantar route), employed here as control, in a dose known to cause hyperalgesia [29].

2.13. Presentation of data and statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test were performed to determine the significance of differences of the EC₅₀ values obtained for BK-potential assays

Fig. 1. HPLC profile of the crude extracts from the venom of *Cyphononyx fulvognathus*. The crude venom extracts were subjected to reverse-phase HPLC using CAPCELL PAK C₁₈ (10 mm × 250 mm) with linear gradient of 5–65% CH₃CN/H₂O/0.1% TFA, over 30 min, at flow rate of 2.5 ml/min. UV absorption was monitored at 215 nm. (1) Adenosine; (2) Cd-125 [DTARLQWH]; (3) fulvonin; (4) Cd-146; (5) cyphokinin; (6) Thr⁶-BK; (7) not determined yet.

on isolated guinea-pig ileum. The significance level was considered at $p < 0.05$. Results for pain threshold evaluation are presented as the mean $\pm$ S.E.M. Statistical evaluations of the data for hyperalgesia were carried out also using ANOVA, and sequential differences among mean values were evaluated according to Tukey's contrast analysis at $p < 0.05$ [30].

3. Results

3.1. Purification and chemical characterization of wasp venom peptides

The venom extracts of *C. fulvognathus* wasp were subjected to reverse-phase HPLC (Fig. 1), and the purity and complexity of each fraction was examined by MALDI-TOF MS. We previously purified two BK-related peptides (BRPs), named Cd-146 [SETGNTVTVKGFSP₁LR] and threonine⁶-bradykinin (Thr⁶-BK, [RPPGFTF₁FR]), from the fractions eluted at 17 and 17.7 min, respectively ([18] and also indicated in Fig. 1). Cd-146 seemed to be a new type of BRP, since only the 6 residues of the peptide C-terminal showed sequence similarity to BK ([18] and Table 1). However its biological evaluation remained to be investigated. On the other hand, Thr⁶-BK has been found in many other wasp venoms [2–5].

Further survey of these HPLC fractions led to the characterization of two other new BRPs, named fulvonin and cyphokinin. The compound fulvonin was obtained from the fraction eluted at 16 min, showing high purity by MALDI-TOF MS with a mono-isotopic protonated molecular ion peak at m/z 1243.8 [(M + H)⁺]. By ladder sequencing [31], a partial amino-acid sequence of the C-terminal region of this peptide was revealed as being [-P-F-R] by

carboxypeptidase Y (CPY)-digestion, while aminopeptidase M (APM)-digestion gave the sequence [S-I/L-V-I/L-R] for the N-terminal region. Edman degradation yielded a 10 amino-acids sequence as [SIVLRGKGPF₁FR]. Therefore, the whole sequence of fulvonin was concluded to be [SIVLRGKGPF₁FR] with the theoretical [M + H]⁺ = 1243.8, which was consistent with the observed value. Moreover, this sequence was also finally confirmed by the solid-phase synthesis of a peptide with the same sequence as deduced, followed by its analysis by MALDI-TOF MS, which gave a final molecular ion peak data that corroborated to the proposed sequence. This peptide is clearly a new type of BRP, since only the C-terminal half of this peptide is homologous to BK, and no description of similar sequence could be found in the accessible databanks.

Another novel peptide with a MS peak at m/z 1290.6 (M + H)⁺, named cyphokinin, was obtained from the fraction eluted at 17.5 min. By ladder sequencing, the C-terminal amino acid was determined as [-R] by CPY-digestion, and the sequence [D-T-], at the N-terminal region, was obtained by APM digestion. To sequence the unidentified portion, the collision-induced dissociation/post-source decay (CID/PSD) spectrum of the APM digested peptide ([M + H]⁺ = 1074.5) was measured. It was found that this spectrum was consistent with that of intact Thr⁶-BK. These results indicated that the sequence of cyphokinin was [DTRPPGFTF₁FR] (theoretical [M + H]⁺ = 1290.7), which was unambiguously confirmed by solid-phase synthesis of identical sequence peptide followed by MALDI-TOF MS analysis. Up to our knowledge, this peptide has never been described previously, and only two other wasp kinins including the whole sequence of Thr⁶-BK inside its sequence have so far been reported ([2,14] and Table 1). Even showing that similarity to already known kinins (Table 1), to our point of view, it was not that obvious simply to expect the same biochemical and pharmacological activities, as described for BK, for these newly identified wasp peptides. Therefore, the biological activities of these four wasp BRPs described by the group were investigated here by using their synthetic analogs.

3.2. Effect of synthetic BK-like wasp peptides on the activity of angiotensin I-converting enzyme

Considering the observed high structural similarity of wasp peptides characterized in this work with BK (Table 1), we have enzymatically assayed them with somatic ACE to verify if they are substrate and/or inhibitors of this enzyme.

After incubation of 50 μ M of each wasp peptide with somatic ACE (50 nM/assay) in 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, containing 0.05 M NaCl and 10 μ M ZnCl₂ (0.35–2.0 ml final volume) buffer, at 37 °C, overnight, the integrity of these peptides as well as their putative metabolites were monitored by analytical HPLC and MS analysis of each observed peak, for determination of cleavage site(s). After 18 h of incubation with ACE, all peptides were very slowly hydrolyzed, if compared to BK hydrolysis rate after 1 h incubation (Table 1). The wasp peptides were thus evaluated as competitive inhibitors of ACE using the FRET-based fluorescent substrate Abz-FRK(2,4-dinitrophenol)P-OH. Peptides fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK presented high affinities for ACE with inhibition constants (K_i) around 1–2 μ M. The only exception was the Cd-146 peptide, which presented a lower affinity with a K_i about 60-fold higher than that observed for other wasp peptides (Fig. 2 and Table 2).

3.3. Activity of synthetic BK-like wasp peptides on isolated smooth muscle preparation

The inhibitory activity of these peptides on ACE enzymatic activity stimulated us to evaluate their action on the contraction of isolated smooth muscle preparations. In this assay, it was possible

Table 1
Primary sequence and molecular weight of the studied wasp peptides, and hydrolysis of the peptides by ACE.

Peptides	MW	Sequence	Percentage of Hydrolysis (%) ACE
Bradykinin ^a	1060.2	RPPGFSP ₁ FR	100
Cd-146	1692.9	SETGNTVTVKGFSP ₁ LR	6.7
Fulvonin	1243.5	SIVLRGKAP ₁ FR	7.5
Cyphokinin	1290.5	DTRPPGFTF ₁ FR	27.3
Thr ⁶ -BK	1074.3	RPPGFTF ₁ FR	22.7

^a BK was totally cleaved by ACE in 1 h; (↓) cleavage point by ACE.

Fig. 2. Residual activity of somatic ACE in the presence of wasp peptides. The panels on left side show the linear fit of the log of the residual activity versus incubation time, and the panels on the right side show the points corresponding to a single exponential decay. Panels A and B, fulvonin [SIVLRGKAPFR]; C and D, cyphokinin [DTRPPGFTPFRR]; E and F, Cd-146 [SETGNTVTVKGFSPRLR]; G and H, Thr⁶-BK [RPPGRTPFR]. The wasp peptides were evaluated as inhibitors of ACE using the FRET-based fluorescent substrate Abz-FRK(2,4-dinitrophenol)P-OH in 50 mM HEPES buffer pH 6.8, containing 200 mM NaCl and 10 mM ZnCl₂, followed by monitoring the fluorescence at $\lambda_{\text{Em}} = 420$ nm and $\lambda_{\text{Ex}} = 320$ nm in a Hitachi F-2000 spectrofluorometer, as describe in Section 2.

Table 2
Kinetic parameters for inhibition of somatic ACE.

Peptides	K_i (μ M)
Cd-146	61.8
Fulvonin	1.2
Cyphokinin	2.2
Thr ⁶ -BK	1.6

to observe that only the wasp peptides cyphokinin and Thr⁶-BK induced concentration-dependent contractions of the guinea-pig ileum, mimicking the BK elicited concentration–response curve (Fig. 3), typically observed for BK in this preparation. The other two peptides, namely fulvonin and Cd-146, did not induce any direct contractile activity on this assay, even with concentrations up to 10^{-5} M (data not shown). The EC₅₀ for the cyphokinin and Thr⁶-BK peptides were 352.5 ± 64.7 and 26.7 ± 7.7 nM, respectively, while the EC₅₀ for BK was shown to be 24.9 ± 4.6 nM (Fig. 3). As expected, only the BK curve was shifted to the left by the addition of captopril (15 and 50 nM) (supplemental material, S1A). The EC₅₀ for the wasp peptides, namely cyphokinin and Thr⁶-BK, on smooth muscle contraction was not affected by the presence of the same concentrations of captopril, although a decrease of the maximum contractions was observed for both wasp peptides (supplemental material, S1B and S1C). As cyphokinin and Thr⁶-BK showed agonistic activity, they were also assayed in the presence of a competitive antagonist of B₂ BK-receptor (HOE-140). At the concentration used here [1 μ M], pre-incubation with HOE-140 totally blocked the contraction elicited by cyphokinin and Thr⁶-BK, and also by BK, used here as control (data not shown).

Considering that these wasp peptides were shown to be more likely competitive inhibitors of ACE than substrates of this enzyme, this same smooth muscle preparation was used to evaluate the ability of the wasp peptides to potentiate the contraction elicited by BK, as described for a number of BK-potentiating peptides (BPPs) [32,33]. After pre-incubation of the guinea-pig ileum with 0.4 μ M of each synthetic wasp peptide with no agonist activity, namely Cd-146 and fulvonin, the contraction elicited by BK was significantly potentiated only in the presence of fulvonin or in the presence of the pit viper peptide BPP-5a, used as a positive control

Fig. 3. Effect of wasp peptides on isolated guinea-pig ileum. Concentration–response curves to BK and synthetic wasp peptides. The calculated EC₅₀ values were 24.9 ± 4.6 nM for BK [RPPGFSPFR] = ○; 352.5 ± 64.7 nM for cyphokinin [DTRPPGFTFPR] = ●; and 26.7 ± 7.7 nM for Thr⁶-BK [RPPGRTPFR] = ■. Each point represents a mean value of 9 independent experiments, while the vertical lines correspond to the standard error of the mean (mean $\pm$ S.E.M., $n = 9$). The responses are expressed as percentages of the maximum response obtained in the first curve for BK or for the wasp peptides.

Fig. 4. BK-potentiating effects of wasp peptides on smooth muscle contraction. Graphical representation of the contraction values in percentage (mean $\pm$ S.E.M.) induced by the EC₅₀ concentration of BK (3×10^{-8} M), in the presence of the wasp (fulvonin and Cd-146) and snake (BPP-5a) peptides. The control represents the contraction induced for BK EC₅₀ concentration. The (*) indicates significant difference from the control ($p < 0.05$).

Fig. 5. Evaluation of hyperalgesia induced by Cd-146, fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK peptides. Nociceptive threshold, expressed in grams (g), was estimated in the rat paw pressure test applied before (time 0) and after (30, 60, 120, 240 and 360 min) peptides injection (Panel A) or before (time 0) and after (10, 30 and 60 min) Thr⁶-BK injection (Panel B). Peptides Cd-146 (●), fulvonin (□), cyphokinin (■) and Thr⁶-BK (△) [5.9 pmol] or saline (control) were injected by intraplantar (s.c.) route. Data represent mean values $\pm$ S.E.M. for 5 rats per group. *Significantly different from mean values obtained before treatment (time 0).

(Fig. 4). The wasp peptide Cd-146 did not cause any significant interference on BK contraction effect.

3.4. Characterization of the effect of BK-like wasp peptides on the nociceptive threshold

To evaluate the time-course of the wasp peptides effect on the nociceptive threshold of rats, the animals were submitted to the nociception evaluation before and after intraplantar injection of 5.9 pmol of Cd-146, fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK peptides. The obtained data demonstrated that the peptides Cd-146, fulvonin and cyphokinin decrease the nociceptive threshold of the experimental animals, characterizing the phenomena of

hyperalgesia, with the maximum effect observed 60 min after each peptide administration (Fig. 5A). The highest and longest lasting hyperalgesic effect was observed for the fulvonin wasp peptide (Fig. 5A). At this condition, no significant effect was observed for the peptide Thr⁶-BK (Fig. 5A).

However, it had been demonstrated in the literature that Thr⁶-BK peptide induces a painful behaviour after peripheral injection, but this effect was observed much earlier than the period of time employed in our first evaluation [12]. Then, the peripheral hyperalgesic effect induced by Thr⁶-BK was re-evaluated as early as 10 min after its administration. At this new condition, it was observed that Thr⁶-BK peptide induces a hyperalgesic effect that was no longer observed after 10 min, which could explain the absence of effect observed previously after a 60 min interval (Fig. 5B).

3.5. Evaluation of the effects of BK-receptors antagonists on hyperalgesia induced by the wasp peptides

The hyperalgesic effect induced by the wasp peptides Cd-146 and fulvonin was blocked by a B₁ BK-receptors antagonist (Fig. 6A and B), while the hyperalgesic effect of cyphokinin and Thr⁶-BK was blocked by the B₂ receptor antagonist (Fig. 6C and D). It is important to point out that the antagonist concentrations used here were able to block the hyperalgesia induced by BK (Fig. 6E), which was used as a control, and at the same time the antagonist did not cause any effect *per se* on the nociceptive threshold of the rats (Fig. 6F).

4. Discussion

In this study, we have purified and chemically characterized two novel BK-related peptides (BRPs) from the venom of the solitary wasp *C. fulvognathus* collected in Japan. The primary structure of these peptides were determined by MALDI-TOF MS and ladder sequencing, followed by further confirmation by chemical synthesis of peptides with identical sequences, which were also analyzed by HPLC and by MALDI-TOF MS. These synthetically obtained wasp peptides were then biochemically and pharmacologically characterized, as well as the two other BRPs previously isolated from this same wasp venom [18].

BK and its related peptides are widely distributed in venomous animals, for example, frogs and insects. In most cases, they include a wide variation of the primary sequence or only a single amino-acid substitution compared to the sequence of BK. In fact, these types of sequence modifications have been widely reported for the wasp kinins, e.g., the BRPs found in wasp venoms [2–5]. Accordingly, cyphokinin is a typical wasp kinin; that is, it is highly homologous to Thr⁶-BK with only 2 extra amino-acid residues elongating this peptide at its N-terminus. On the other hand, Cd-146 and fulvonin show a lesser similarity to BK sequence. Cd-146 has a kinin-like sequence at the C-terminus (6 residues), while fulvonin has only 4 residues identical to BK (Table 1). As far as we know, no other peptide showing these features have been found or reported before, and therefore they are structurally a new type of wasp kinin. This stimulated us to study the biochemical and pharmacological features of these novel wasp peptides.

In our *in vitro* biochemical assays, these peptides were significantly less susceptible to hydrolysis by ACE than BK (Table 1), specially the peptides Cd-146 and fulvonin that show lesser similarity to BK sequence than the cyphokinin and Thr⁶-BK. But, as fulvonin presented high affinity for this peptidase, it might suggest that this peptide act more likely as a good inhibitor of this enzyme (Table 2 and Fig. 2A and B). The subtle amino-acid changes near the hydrolyzed peptide bond by ACE (P₃, P₂ and P₁') at the wasp peptides, as shown in Table 1, is not enough to explain such

Fig. 6. Effect of BK antagonists on Cd-146, fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK peptides-induced hyperalgesia. Nociceptive threshold was estimated in the rat paw pressure test applied before (dash line) and 60 min after Cd-146 (5.9 pmol, Panel A), fulvonin (5.9 pmol, Panel B) and cyphokinin (5.9 pmol, Panel C) peptides or BK (500 ng, Panel E), used as a positive control, or before (Initial Measure) and 10 min after (Final Measure) Thr⁶-BK (5.9 pmol, Panel D). Lys-(Des-Arg⁹,Leu⁸)-BK (Lys, 50 ng/50 μ l) and icatibant (HOE-140, 5 μ g/50 μ l), antagonists of B₁ and B₂ receptors, respectively, were injected by intraplantar route 20 min before peptides administration. The effect of antagonists, *per se*, is shown on Panel F. Data represent mean values $\pm$ S.E.M. for 5 rats per group. *Significantly different from mean values obtained in the control group (Sal + Sal).

differences observed in the hydrolyses rates and in the affinities for ACE compared to BK [34–36]. These differences observed in the kinetic assays with ACE may result probably from the distinct nature of ACE–peptide substrate interactions more distant from the hydrolyzed peptide bond. In pharmacological assays, it was shown that only cyphokinin and Thr⁶-BK exhibited a concentration-dependent contraction of smooth muscle in guinea-pig ileum preparation. The potency of cyphokinin was lower (around 10 times) than that observed for BK and Thr⁶-BK, with a EC₅₀ of 352.5 ± 64.7 nM for cyphokinin, and 26.7 ± 7.7 and 24.9 ± 4.6 nM for Thr⁶-BK and BK, respectively (Fig. 3). Moreover, as expected, only the BK curve was shifted to the left by the addition of captopril, while the EC₅₀ for the wasp peptides, namely cyphokinin and Thr⁶-BK, was not affected by the presence of the same concentrations of captopril (supplemental material S1). This is in good agreement to the fact that only BK is a good substrate of ACE, while the wasp peptides were shown to be more likely inhibitors of ACE than substrate. However, remarkably, a significative dose-dependent decrease of the maximum contraction was observed for both wasp peptides at these used concentrations of captopril (supplemental material S1), suggesting a possible non-competitive effect. It is also of note that the smooth muscle contraction elicited by these two wasp peptides was completely blocked by the B₂ receptor antagonist HOE-140 (data not shown), suggesting the involvement of this BK-receptor subtype on this mechanism of action of these wasp peptides.

Taking into account the inhibitory effect of some of the wasp peptides on somatic ACE activity, the effect of the wasp peptides on the BK-potential assay in the guinea-pig ileum preparations was evaluated. At least under the concentrations and conditions employed here, only the wasp peptide fulvonin potentiated the contraction elicited by the BK EC₅₀ concentration (Fig. 4) in the isolated smooth muscle preparation, indicating a clear difference in their pharmacological features regardless of their structural similarities. This data also suggest that these wasp BRPs deserve a better characterization of their structure–activity relationship in the future.

The most prominent acute symptoms caused by wasp venoms are the formation of a localized cutaneous oedema and pain, and these symptoms can be observed even in higher vertebrates, such as man [12,15]. Several different types of compounds have been described in the venom of solitary and social wasps. Among them, peptides with chemical structures and physiological activities similar to BK [16,37,38]. For many years it has been known that BK is an inflammatory mediator involved in the nociceptive process [39], and that BK as well as bradykinin-like peptides produce pain and hyperalgesia due to their ability to excite and/or sensitize nociceptors [40–42]. Then, based on these facts and also considering the high primary structural similarity of these wasp peptides (Cd-146, fulvonin, cyphokinin and Thr⁶-BK) with BK, we investigated if these four peptides could cause hyperalgesia in mammals contributing to pain observed in the wasp stings.

Our data demonstrated that the 2 new wasp peptides fulvonin and cyphokinin, as well as Cd-146 and Thr⁶-BK, induced hyperalgesic effect in the rat paw after intraplantar injection. This hyperalgesic effect was due to the action of these peptides on distinct BK receptors, since the hyperalgesia induced by fulvonin and Cd-146 was blocked by the B₁ receptor antagonist [Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK while the hyperalgesia induced by both cyphokinin and Thr⁶-BK was blocked by the B₂ receptor antagonist HOE-140.

The B₂ receptors are the best characterized kinin receptors, being largely expressed in a constitutive manner and widely expressed throughout the central and peripheral nervous system, mediating most of physiological effects of kinins [43,44]. Concerning B₁ receptors, although with only a few exceptions they are present under normal conditions (for review see Calixto et al. [45]), their expression occurs rapidly in certain pathological

conditions or by the action of proinflammatory agents [44,46–48]. In fact, in most situations, as tissue injury, noxious stimuli or stressful conditions, their synthesis may be upregulated occurring rapid induction of the expression of this receptor [44,45,49,50].

In agreement with our data, a number of works has provided evidences of the early presence of B₁ receptors in many inflammatory conditions. In fact, the involvement of these receptors were observed in the nociception [51], oedema [52] and plasma extravasations [53] at 15, 30 and 120 min, respectively. In addition, the increase of B₁ receptor mRNA expression in rat subcutaneous paw tissue after intraplantar injection of LPS could be evident as early as at 1 h following its injection [54,55].

Interestingly, in our data, the highest and longest lasting hyperalgesic effect was detected for fulvonin, which has the lowest structural similarity to BK, with only 4 amino-acid residues of the hendedecapeptide fulvonin in common to the nonapeptide BK. It is of note to mention that fulvonin was the single wasp peptide assayed here to show the ability to potentiate the effect of BK on isolated smooth muscle preparation.

Our *in vivo* data confirms the results obtained in the pharmacological assays performed in the guinea-pig ileum preparation, where the smooth muscle contraction elicited by cyphokinin and Thr⁶-BK peptides was completely blocked by the B₂ receptor antagonist HOE-140 (data not shown). Moreover, our data corroborates a report from Griesbacher et al. [12] demonstrating that the hyperalgesic effect induced by Thr⁶-BK is due to a peripheral action, since when centrally injected, this peptide induces anti-nociception [15], and this effect involves the activation of B₂ receptors.

In conclusion, including our previous work [18], our group has described four sequences of wasp BRPs from solitary wasp venom. The pharmacological evaluations revealed that they show distinct biological activities, which always involve the activation of BK-receptors, although not necessarily acting on the same BK-receptors subtypes. The data presented here, indicate clear subtle differences in the pharmacological features of each wasp peptide, regardless of their high structural similarities to BK, and also contribute to a better understanding of the structure–activity relationship of kinins and related peptides, which clearly still deserves a better characterization in the future.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and also by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2009.08.020.

References

- [1] Pisano JJ. Vasoactive peptides in venoms. *Fed Proc* 1968;27:58–62.
- [2] Nakajima T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: Piek TE, editor. *Venoms of the hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioural aspects*. London: Academic Press; 1986. p. 309–27.
- [3] Piek T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. *Toxicon* 1991;29:139–49.
- [4] Piek T, Hue B, Mantel P, Nakajima T, Pelhate M, Yasuhara T. Threonine6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. *Comp Biochem Physiol* 1990;96:157–62.
- [5] Yasuhara T, Mantel P, Nakajima T, Piek T. Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp *Megascolia flavifrons*. *Toxicon* 1987;25:527–35.
- [6] Conlon JM. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. *Regul Pept* 1999;79:71–81.

- [7] Yasuhara T, Ishikawa O, Nakajima T, Araki K, Tachibana S. The studies on the active peptide on smooth muscle in the skin of *Rana rugosa*, Thr6-Bradykinin and its analogous peptide, ranakinin-R. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1979;27: 486–91.
- [8] Chen T, Shaw C. Cloning of the (Thr6)-phyllotoxin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine O-sulfation motif. *Peptides* 2003;24:1123–30.
- [9] Chen T, Orr DF, Bjourson AJ, McClean S, O'Rourke M, Hirst DG, et al. Novel bradykinins and their precursor cDNAs from European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) skin. *Eur J Biochem* 2002;269:4693–700.
- [10] Comeau S, Lance VA, Hicks JW, Conlon JM. Purification and biological activity of alligator bradykinin. *Am J Physiol* 1992;263:R400–4.
- [11] Conlon JM, Hicks JW, Smith DD. Isolation and biological activity of a novel kinin ([Thr6] bradykinin) from the turtle, *Pseudemys scripta*. *Endocrinology* 1990;126:985–91.
- [12] Griesbacher T, Althuber P, Zenz M, Rainer I, Griengl S, Lembeck F. *Vespa vulgaris* venom: role of kinins and release of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. *Eur J Pharmacol* 1998;351:95–104.
- [13] Li Z, Secor SM, Lance VA, Masini MA, Vallarino M, Conlon JM. Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six sarcopterygian species (African lungfish, amphiuma, coachwhip, bullsnake, gila monster, and Gray's monitor). *Gen Comp Endocrinol* 1998;112:108–14.
- [14] Murata K, Shinada T, Ohfuné Y, Hisada M, Yasuda A, Naoki H, et al. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi* iwatai. *Biol Pharm Bull* 2006;29:2493–7.
- [15] Mortari MR, Cunha AO, Carolino RO, Coutinho-Netto J, Tomaz JC, Lopes NP, et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polystia occidentalis*. *Br J Pharmacol* 2007;151:860–9.
- [16] Konno K, Palma MS, Hitara IY, Juliano MA, Juliano L, Yasuhara T. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon* 2002;40:309–12.
- [17] Shimizu A, Wahis R. Systematic study of the genus *Cyphononyx* (Hymenoptera: Pompilidae) occurring in Japan. *Entomol Sci* 2004;7:171–81.
- [18] Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Yasuhara T, Juliano MA, et al. Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp (*Cyphononyx dorsalis*) guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Toxicon* 2001;39:1257–60.
- [19] Yamamoto T, Arimoto H, Kinumi T, Oba Y, Uemura D. Identification of proteins from venom of the paralytic spider wasp, *Cyphononyx dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:278–86.
- [20] Giles AR. Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thromb Haemostasis* 1987;58:1078–84.
- [21] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.
- [22] Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:861–8.
- [23] 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;72:248–54.
- [24] Gomes CL, Konno K, Conceicao IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem Pharmacol* 2007;74:1350–60.
- [25] Conceicao K, Konno K, de Melo RL, Antoniazzi MM, Jared C, Sciani JM, et al. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 2007;28: 515–23.
- [26] Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 1991;102:769–73.
- [27] Pruneau D, Luccarini JM, Defrene E, Paquet JL, Belichard P. Pharmacological evidence for a single bradykinin B2 receptor in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1995;116:2106–12.
- [28] Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111:409–19.
- [29] Chacur M, Picolo G, Teixeira CF, Cury Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 2002;40:1047–51.
- [30] Gad SW, C.S. Statistics for toxicologists. In: Hayer A, editor. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press LTD.; 1989. p. 435–83.
- [31] Hisada M, Konno K, Itagaki Y, Naoki H, Nakajima T. Advantages of using nested collision induced dissociation/post-source decay with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: sequencing of novel peptides from wasp venom. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:1828–34.
- [32] Ondetti MA. Biochemistry of the renin-angiotensin system. Introduction. *Fed Proc* 1983;42:2722–3.
- [33] Hayashi MA, Camargo AC. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 2005;45:1163–70.
- [34] Araujo MC, Melo RI, Del Nery E, Alves MF, Juliano MA, Casarini DE, et al. Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme. *J Hypertens* 1999;17:665–72.
- [35] Araujo MC, Melo RL, Cesari MH, Juliano MA, Juliano L, Carmona AK. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 2000;39:8519–25.
- [36] Bersanetti PA, Andrade MC, Casarini DE, Juliano MA, Nchinda AT, Sturrock ED, et al. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides for defining substrate specificity of the angiotensin I-converting enzyme and development of selective C-domain substrates. *Biochemistry* 2004;43:15729–36.
- [37] Mendes MA, Palma MS. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Peptides* 2006;27:2632–9.
- [38] Zhou Z, Yang H, Xu X, Wang X, Lai R. The first report of kininogen from invertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:1099–102.
- [39] Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 1993;16:99–104.
- [40] Manning DC, Raja SN, Meyer RA, Campbell JN. Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50: 721–9.
- [41] Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:197–206.
- [42] Lai R, Liu H, Hui Lee W, Zhang Y. A novel bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of the final product. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:259–63.
- [43] Hall JM, Morton IKM. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG, editor. The handbook of immunopharmacology: the kinin system. London: Academic Press; 1997. p. 9–43.
- [44] Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 2000;87:1–5.
- [45] Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol* 2001;14:519–26.
- [46] Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998;16:385–401.
- [47] Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998;50:357–86.
- [48] Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004;143:803–18.
- [49] Ni A, Chao L, Chao J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 1998;273:2784–91.
- [50] Yang X, Taylor L, Polgar P. Mechanisms in the transcriptional regulation of bradykinin B1 receptor gene expression. Identification of a minimum cell-type specific enhancer. *J Biol Chem* 1998;273:10763–70.
- [51] Beirith A, Santos AR, Calixto JB. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res* 2003;969:110–6.
- [52] Calixto MC, Triches KM, Calixto JB. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. *Inflamm Res* 2003;52: 132–9.
- [53] Cruwys SC, Garrett NE, Perkins MN, Blake DR, Kidd BL. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 1994;113:940–4.
- [54] Passos GF, Fernandes ES, Campos MM, Araujo JG, Pesquero JL, Souza GE, et al. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol* 2004;172:1839–47.
- [55] Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista EL, Campos MM. In vivo up-regulation of kinin B1 receptors following treatment with *P. gingivalis* LPS in rat paw. *J Pharmacol Exp Ther* 2009.