

# Caracterização de enzimas do veneno de *Physalia physalis*: estudo bioquímico e ação na coagulação *ex vivo*

Dissertação de Mestrado

Margarida Botelho Borges

Mestrado em  
**Ciências Biomédicas**



Ponta Delgada

[2025]

# **Caracterização de enzimas do veneno de *Physalia physalis*: estudo bioquímico e ação na coagulação *ex vivo***

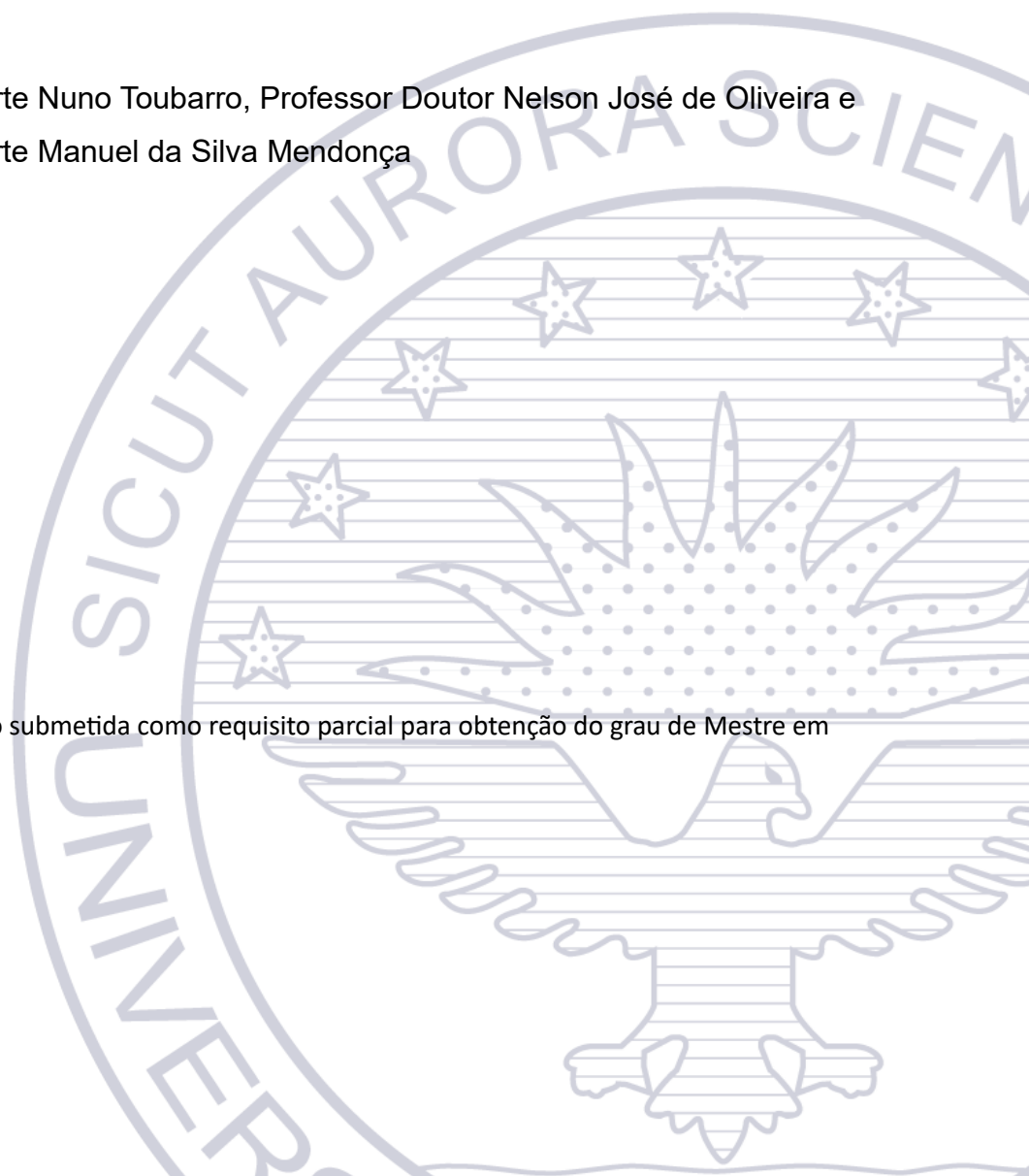
Dissertação de Mestrado

Margarida Botelho Borges

## **Orientadores**

Professor Doutor Duarte Nuno Toubarro, Professor Doutor Nelson José de Oliveira e Professor Doutor Duarte Manuel da Silva Mendonça

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



## RESUMO

A *Physalia physalis*, comumente conhecida como Caravela Portuguesa, é um hidrozoário colonial flutuante encontrado em ampla distribuição pelo Oceano Atlântico. A sua ocorrência é frequentemente observada no arquipélago dos Açores, ocorrendo sazonalmente em grandes aglomerados de maio a agosto. O contato com suas células urticantes resulta no envenenamento agudo que pode provocar inflamação e perturbações na hemostasia, afetando a agregação plaquetária e a coagulação. Embora em outras águas-vivas esses sintomas tenham sido associados à presença de enzimas proteolíticas, pouco se sabe sobre o veneno da *P. physalis*. Este estudo tem como objetivo analisar a ação do veneno da *P. physalis* na hemostasia, centrado-se na investigação das enzimas presentes no veneno e o seu mecanismo de ação sobre a coagulação.

O veneno da *P. physalis* foi obtido por meio de cinco métodos distintos. A extração através da homogeneização dos tentáculos com “ultraturrax” ( $V_h$ ) e a indução das células urticantes (nematocistos) por electroestimulação ( $V_T$ ), foram os métodos que resultaram num extrato de veneno com maior atividade enzimática. Os venenos obtidos por esses dois métodos apresentaram diferentes padrões proteicos, pelo que foram ambos utilizados no estudo das enzimas e suas ações na coagulação.

A análise com substratos e inibidores específicos revelou pela primeira vez que o veneno de *P. physalis* exibe atividade proteolítica, do tipo serino protéase, especificamente quimotripsina, e serino metaloproteases. O veneno obtido pelos métodos  $V_h$  e  $V_T$  exibiu atividades distintas sobre o fibrinogénio e o coágulo de fibrina, com impacto reduzido na cascata de coagulação. O veneno obtido por indução dos nematocistos ( $V_T$ ) demonstrou elevada eficiência na digestão do coágulo de fibrina, apresentando simultaneamente atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica. Por outro lado, o veneno obtido por homogeneização dos tentáculos ( $V_h$ ) não apresentou atividade fibrinolítica, mas exibiu uma hidrólise altamente específica do fibrinogénio, gerando péptidos de fibrina com aproximadamente 23 kDa, semelhantes aos formados pela ação da trombina. Estes péptidos de fibrina demonstraram a capacidade de formar um coágulo instantâneo, sugerindo um efeito pró-coagulante. A atividade pró-coagulante da

amostra  $V_h$  e a ação trombolítica da amostra  $V_T$  foram confirmadas nos ensaios de lise do coágulo de euglobulina em plasma humano. Nenhuma das amostras testadas apresentou atividade hemolítica.

O fracionamento da amostra  $V_h$ , por FPLC, resultou em quatro frações com padrões proteicos e enzimáticos distintos. Duas dessas frações (#2 e #3) apresentaram ação pró-coagulante, enquanto as outras duas frações (#1 e #4) apresentaram ação fibrinogenolítica e trombolítica. A caracterização da atividade enzimática das frações obtidas por cromatografia permitiu determinar que a atividade trombolítica é promovida por metaloproteases, enquanto o efeito pró-coagulante é mediado por serino proteases. Este estudo permitiu identificar, pela primeira vez, proteínas do veneno que podem estar envolvidas nos distúrbios hemostáticos resultantes do envenenamento agudo por *P. physalis* e que por este motivo podem constituir importantes fatores de toxicidade. O seu estudo pode contribuir para o desenvolvimento futuro de antídotos ou para o desenvolvimento de novas moléculas para terapias anti trombóticas.

#### **Palavras-chave**

*Physalia physalis*; Caravela Portuguesa; veneno; serino protease e metaloproteases; coagulação e hemostasia.

## ABSTRACT

The *Physalia physalis*, commonly known as the Portuguese Man-o'-War, is a floating colonial hydrozoan found widely across the Atlantic Ocean. Its presence is often observed in the Azores archipelago, occurring seasonally in large clusters from May to August. The contact with its stinging cells results in acute poisoning that can cause inflammation and disruptions in hemostasis, affecting platelet aggregation and coagulation. While in other jellyfish these symptoms have been associated with the presence of proteolytic enzymes, little is known about the venom of *P. physalis*. This study aims to analyze the action of *P. physalis* venom on hemostasis, focusing on investigating the enzymes present in the venom and their mechanism of action on coagulation.

In this study, the venom of *P. physalis* was obtained through five different methods ( $V_h$ ,  $F_v$ ,  $F_s$ ,  $V_p$ , and  $V_T$ ). Extraction by homogenizing the tentacles with an "ultraturrax" ( $V_h$ ) and inducing the stinging cells (nematocysts) through electrostimulation ( $V_T$ ) were the methods that resulted in venom extract with higher enzymatic activity. The venoms obtained by these two methods showed different protein patterns, prompting the selection of both for the study of enzymes and their actions on coagulation.

Analysis with specific substrates and inhibitors revealed, for the first time, that the venom of *P. physalis* obtained exhibited proteolytic activity, specifically serine protease, including chymotrypsin and metalloproteases. The venom obtained from the methods  $V_h$  e  $V_T$  showed different activities on the clot formation and fibrinolysis.

The venom obtained by inducing nematocysts ( $V_T$ ) showed high efficiency in digesting the fibrin clot. The study of its mechanism of action revealed that this thrombolytic activity is promoted by metalloproteases. Additionally, it was found to hydrolyze fibrinogen into low molecular weight fibrinopeptides, inhibiting clot formation. On the other hand, the venom obtained by homogenizing the tentacles ( $V_h$ ) did not digest the fibrin clot but demonstrated the ability to induce clot formation through a fibrinogen hydrolysis process mediated by serine proteases. Investigation of

its mechanism of action on fibrinogen revealed a specific hydrolysis profile, generating fibrinopeptides of approximately 23 kDa, which were capable of forming a fibrin clot. The pro-coagulant effect of the V<sub>h</sub> sample and the thrombolytic activity of the V<sub>T</sub> sample were confirmed in euglobulin clot lysis assays on human plasma. None of the venoms exhibited hemolytic activity.

Fractionation of the V<sub>h</sub> sample by FPLC chromatography resulted in four fractions with distinct protein and enzymatic patterns. Two of these fractions (#2 and #3) confirmed the pro-coagulant action, while the other two fractions (#1 and #4) demonstrated fibrinogenolytic and thrombolytic activity. The characterization of the enzymatic activity of the fractions obtained by chromatography allowed to determine that the thrombolytic activity is promoted by metalloproteases, while the pro-coagulant effect is mediated by serine proteases.

This study allowed for the first-time identification of venom proteins that may be involved in the hemostatic disturbances resulting from acute *P. physalis* envenomation, that may constitute important toxicity factors. Their characterization could contribute to the future development of antidotes or the design of new molecules for anti-thrombotic therapies.

**Key-Words:** *Physalia physalis*; Man-o'-war jellyfish; venom; serine proteases and metalloproteases; blood coagulation and hemostasis.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao chegar ao final de mais um ciclo académico, não poderia deixar de agradecer às pessoas que me acompanharam e fizeram com que a realização desta tese de mestrado fosse possível.

Em primeiro lugar quero agradecer aos Professor Doutor Duarte Nuno Tobarro, Professor Doutor Nelson José de Oliveira e Professor Doutor Duarte Manuel da Silva Mendonça pela aceitação e orientação da minha dissertação. Quero especialmente dar o meu sincero agradecimento, ao Doutor Duarte Nuno Tobarro pelo seu inestimável auxílio e voto de confiança nas minhas capacidades, pela paciência, ensinamentos e por toda a amabilidade durante toda a realização deste trabalho, o meu muito obrigada. Agradeço também à EEA Grants que financiou a pesquisa da presente dissertação pelo projeto PT-MOD.PN.FRM.059PT.V03. Agradeço a todos os membros, professores, auxiliares e colegas de laboratório do Centro de Biotecnologia dos Açores da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade dos Açores. Quero fazer um agradecimento especial aos meus colegas, Zuzanna Tomkielska, Duarte Seixas, Hugo Monteiro, Tiago Dias, Jorge Frias e Miguel Leite por toda ajuda proporcionada no decorrer deste trabalho, pela transmissão de conhecimentos, por toda a força, amabilidade e companheirismo.

Não poderia deixar de agradecer à minha querida família. Aos meus pais, agradeço por todo o apoio incondicional nas minhas decisões de vida, especialmente académicas, por todo o amor, carinho, ensinamentos, transmissão de bons valores e por todo o incentivo para lutar pelos meus objetivos, nada disto seria possível sem a sua ajuda. Aos meus queridos irmãos, por todo o apoio proporcionado ao longo de toda a minha jornada de vida e académica, pela ajuda de transmissão de valores, estando presentes em todo o meu crescer enquanto pessoa. Realçar o meu agradecimento à minha querida irmã e cunhado, pelo vosso envolvimento e ajuda em pequenas correções e revisões do presente trabalho. Quero agradecer ainda ao meu namorado, por todo o apoio e motivação proporcionada desde o primeiro dia. Obrigada por todo o companheirismo, carinho, amizade e por nunca me deixar de desistir dos meus objetivos.

## ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT .....	III
AGRADECIMENTOS .....	V
ÍNDICE .....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE GRÁFICOS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
I - INTRODUÇÃO.....	1
1. Distribuição e principais características da morfologia da <i>Physalia physalis</i> .....	1
2. Sintomas e composição do veneno de <i>P. physalis</i> .....	2
3. Aplicações terapêuticas a partir do veneno de <i>P. physalis</i> .....	5
4. Racional e objetivos da presente dissertação .....	7
II - Materiais e Métodos .....	8
1. Recolha dos tecidos e preparação das amostras.....	8
2. Extração do veneno .....	8
3. Perfil proteico do veneno .....	9
4. Perfil de protéases do veneno .....	10
5. Atividade proteolítica em substrato generalista azocaseína .....	10
6. Atividade proteolítica em substrato generalista com inibidores específicos .....	11
7. Atividade proteolítica em substratos específicos .....	12
8. Atividade do veneno sobre o coágulo de fibrina.....	12
9. Atividade do veneno sobre o fibrinogénio .....	13
10. Atividade fibrinogenolítica do veneno, por SDS-PAGE .....	14
11. Atividade fibrinolítica do veneno .....	14
12. Ensaio de atividade hemolítica do veneno.....	16
13. Fracionamento cromatográfico do veneno .....	16
14. Perfil proteico e perfil de digestão das frações cromatográficas de veneno .....	17
III - Resultados .....	18
1. Análise do perfil proteico do veneno por SDS-PAGE .....	18
2. Análise do perfil de protéases do veneno por zimograma de gelatina.....	19
3. Atividade proteolítica do veneno em substrato generalista.....	20
4. Análise da atividade proteolítica do veneno .....	20
5. Atividade do veneno sobre o coágulo de fibrina.....	23

6.	Atividade do veneno sobre o fibrinogénio .....	24
7.	Atividade do veneno sobre o fibrinogénio analisada por SDS-PAGE.....	25
8.	Atividade do veneno sobre o coágulo da euglobulina .....	26
9.	Atividade do veneno sobre células sanguíneas.....	27
10.	Fracionamento cromatográfico do veneno .....	30
11.	Caracterização enzimática das frações cromatográficas do veneno .....	30
12.	Atividade do veneno sobre o fibrinogénio após “ <i>Desalting</i> ” .....	32
13.	Caracterização enzimática do veneno após fracionamento por troca iónica ....	33
14.	Perfil proteico e enzimático do veneno após fracionamento por troca iónica ..	34
15.	Atividade fibrinogenolítica do veneno após fracionamento por troca iónica....	36
IV - DISCUSSÃO .....		39
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....		42
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		43
VII - ANEXOS.....		47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do veneno da *Physalia physalis* com base em Batista (2021).

Tabela 2 - Atividade do veneno de *P. physalis* sobre o fibrinogénio, medido através da formação de coágulo de fibrina.

Tabela 3 – Euglobulina tratada com veneno.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil proteico do veneno de *P. physalis* obtido através de SDS-PAGE

Figura 2 – Gel de eletroforese zimograma com amostras de veneno de *P. physalis* em substrato de gelatina

Figura 3 – Perfil SDS-PAGE do fibrinogénio incubado com as amostras de veneno.

Figura 4 – Ensaio de atividade hemolítica em amostra de veneno de *P. physalis* em microplaca de 96 poços.

Figura 5 – Preparação de lâmina e observação de ensaio de atividade hemolítica ao microscópio.

Figura 6 – Fracionamento cromatográfico da amostra de veneno *P. physalis*.

Figura 7 – Perfil SDS-PAGE das frações cromatográficas de veneno  $V_h$  de *P. physalis*.

Figura 8 – Perfil enzimático das frações cromatográficas de veneno  $V_h$  de *P. physalis*.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ensaio de atividade proteolítica amostras de veneno de *P. physalis* obtidas por diversos métodos de extração testadas em azocaseína

Gráfico 2 – Ensaio de inibição de atividade proteolítica

Gráfico 3 – Atividade enzimática com substratos específicos. Amostras de veneno obtidas por homogeneização –  $V_h$  e por indução de células urticantes –  $V_T$ .

Gráfico 4 – Ensaio de atividade fibrinolítica de veneno de *P. physalis*  $V_h$  e  $V_T$

Gráfico 5 - Caracterização enzimática do veneno  $V_h$  após exclusão molecular.

Gráfico 6 - Atividade pró-coagulante do veneno  $V_h$  após exclusão molecular.

Gráfico 7 - Ensaio de atividade proteolítica das frações de  $V_h$  obtidas por troca iônica.

Gráfico 8 – Ensaio de inibição da atividade proteolítica específica das frações de  $V_h$  obtidas por troca iônica

Gráfico 9 – Atividade fibrinogenolítica do veneno após fracionamento por troca iônica.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$  – Microlitros

mL – Mililitros

L – Litro

$\mu\text{g}$  – Microgramas

$\mu\text{m}$  - Microns

mM – Mili Molar

M – Molar

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  – Micrograma por microlitro

mg/mL – Miligrama por mililitro

U/mL – Unidade por mililitro

cm – Centímetro

nm – Nanometro

kDa – Kilo daltons

$^{\circ}\text{C}$  – Grau Celsius

g – Velocidade de rotação da centrífuga

volts - voltagem

kHz – Kiloherzt

% - percentagem

$V_{\text{máx}}$  – Velocidade máxima

s – Segundos

H - Hora

H<sub>2</sub>O – Água

Mili Q – Água ultrapura MiliQ

TCA – Ácido Tricloroacético

HCl – Ácido clorídrico

Tris-HCl – (Tris-(hidroximetil)-aminometano)-HCl

NaOH – Hidróxido de sódio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CH<sub>3</sub>COOH – Ácido acético

NaCl – Cloreto de sódio

“Thrombin-like” – Enzimas/moléculas com ação semelhante à da trombina

F<sub>v</sub> - Veneno obtido por homogeneização mecânica com esferas de vidro

V<sub>h</sub> – Veneno obtido por homogeneização mecânica com “ultraturrax”

V<sub>p</sub> – Veneno obtido por indução de células urticantes com etanol

V<sub>T</sub> – Veneno obtido por indução de células urticantes com eletroestimulação

C<sup>-</sup> - Controlo negativo

C<sup>+</sup> - Controlo positivo

5x – Solução cinco vezes concentrada

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

TLCK - N- a-tosyl-l-lysine chloromethyl ketone hydrochloride

APMSF - 4-Amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride

3,4 DCI - 3,4-Dichloroisocoumarin

STI - Kunitz soybean trypsin inhibitor

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid disodium dihydrate

*ALA-ALA-PHE - Ala-Ala-Phe p-nitroanilide*

*GLY-GLY-PHE - N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide*

*GLY-GLY-ARG - Bz-Gly-Gly-Arg-pNA*

*PRO-PHE-ARG - N-Benzoyl-Pro-phe-Arg-p-nitroanilide hydrochloride*

*ALA-ALA-PRO-MET - N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met p-nitroanilide*

*GLY-GLY-LEU - Z-Gly-Gly-Leu p-nitroanilide*

*N-Benzoyl-L-Tyrosine - N-Benzoyl-L-tyrosine p-nitroanilide*

*L-proline - L-Proline p-nitroanilide trifluoroacetate salt*

# I - INTRODUÇÃO

## 1. Distribuição e principais características da morfologia da *Physalia physalis*

A *Physalia physalis*, popularmente designada por Caravela Portuguesa, é uma espécie de hidrozoário colonial pertencente ao reino Animalia, ordem *Siphonophora*, filo Cnidária e família *Physaliidae* (Diaz-Garcia, 2012; Munro, 2019). É considerada dos seres pleustónicos mais conspícuos do Oceano Atlântico, uma vez que habitam num ecossistema compreendido na interface ar-água (Munro, 2019).

O aparecimento de caravela portuguesa é muito comum em águas temperadas de clima tropical a subtropical. Por consequência, as orlas marítimas portuguesas, em especial o arquipélago dos Açores, possuem um ambiente cada vez mais favorável para o aparecimento de *P. physalis* onde ocorre em “*blooms*” sazonais de maio a agosto. O seu aparecimento em massa é considerado um fenómeno natural, derivado por um aumento exponencial das colónias numa determinada área (Rodrigues, 2020). Este fenómeno pode dever-se a fatores ambientais incluindo luz, temperatura, salinidade e alimento, que determinam o tamanho e localização das colónias (Batista, 2021). O surgimento de grandes massas de *P. physalis* em Portugal ocorre devido a fenómenos climáticos, tais como a Oscilação do Atlântico Norte (NAO) e a Corrente de Golfo (Batista, 2021; Headlam, 2020; Rodrigues, 2020). Estes fenómenos abrangem o Atlântico Norte, atingindo por consequência o arquipélago dos Açores, levando assim a um aumento crescente desta espécie na região (Headlam, 2020; Rodrigues, 2020).

*P. physalis* é caracterizada por possuir uma morfologia constituída por quatro “pólipos”: o pneumatóforo, gastrozoóide, os tentáculos e o gonodendron. O pneumatóforo preenchido por gás, permite que flutue e se desloque através do vento funcionando como uma vela de um navio de guerra português do século XV e XVI, conferindo-lhe o nome de Caravela Portuguesa (Batista, 2021; Munro, 2019). Os seus longos tentáculos, que podem atingir os 30 metros de comprimento, são responsáveis pela captura das presas (Batista, 2021; Munro, 2019). Ao longo dos tentáculos encontram-se milhares de células urticantes chamadas de cnidócitos e que contêm no seu interior os nematocistos (Batista, 2021; Cunha, 2022; Munro, 2019). Os

nematocistos são estruturas especializadas que quando induzidas, permitem o envenenamento devido à libertação de toxinas presentes nos cnidócitos (Batista, 2021; Jouiaei, 2015; Munro, 2019; Yap, 2018).

## **2. Sintomas e composição do veneno de *P. physalis***

Estudos realizados em peixes revelam que a toxina libertada pelo nematocisto provoca paralisia afetando o sistema nervoso e respiratório resultando na sua morte (Bae, 2017; Batista, 2021; Cunha, 2022; D'Ambra, 2020; Diaz-Garcia, 2012). Estas células libertam também enzimas proteolíticas capazes de digerir as presas (Batista, 2021; Munro, 2019).

No Homem, a picada provocada pela *P. physalis* resulta em dor que se estende por todo o local da inflamação. Esta dor geralmente desaparece momentos após o contacto e a inflamação poderá durar algumas horas, dias ou até mesmo semanas. A maioria das reações provocadas pelo envenenamento restringem-se normalmente a nível dérmico, originando ocasionalmente bolha, inchaço e prurido. Para além disso poderão decorrer sintomas sistémicos tais como dor de cabeça, vómitos, dor abdominal e diarreia (Batista, 2021; Cunha, 2022; Diaz-Garcia, 2012; Tibballs, 2011). Sintomas mais graves são caracterizados pela necrose do tecido lesado, toxicidade a nível neural, problemas motores, respiratórios e cardiovasculares (Bae, 2017; Batista, 2021; Cunha, 2022; Khan, 2018). Embora sejam raros, existem casos reportados em que o envenenamento por *P. physalis* origina a morte do indivíduo (Labadie, 2012). Julga-se que a toxicidade cardiovascular e as alterações da hemostasia sejam a principal causa de morbidade (Batista, 2021; Cunha, 2022; Khan, 2018; Labadie, 2012). Apesar de haver alguns estudos focados em tratamentos da picada de *P. physalis*, até ao momento não se chegou a um consenso clínico sobre qual o tratamento mais eficaz em intoxicação aguda pelo veneno de *P. physalis* (Montgomery, 2016). O presente trabalho pretende analisar as proteínas do veneno que são responsáveis pelas alterações da hemostasia.

Embora não seja totalmente conhecida a composição do veneno de *P. physalis*, sabe-se que fazem parte uma variedade de péptidos, proteínas, enzimas e inibidores de proteinases juntamente com alguns compostos não proteicos (purinas, compostos de

amônio quaternário, aminas biogénicas e betaínas) (Batista, 2021; D'Ambra, 2020). A tabela 1 resume as toxinas identificadas no veneno de *P. physalis*, embora nenhuma destas moléculas estejam publicadas em bases de dados genéticas (e.g. NCBI). Alguns componentes do veneno de *P. physalis*, como metaloproteases, fosfolipases A2, elastases, actinoporinas e hidrolisinas (Tabela 1), estão descritos como tendo uma ação hemolítica, enquanto outros, têm sido associados à degradação da bicamada fosfolipídica ou formam poros na membrana, como é o caso das perforinas (Tabela1) (Cunha, 2022). A principal toxina da *P. physalis* é a fisalitoxina, uma glicoproteína com um peso molecular de 240kDa que representa 28% da proteína total do veneno e é caracterizada como uma poderosa hemotoxina e citotoxina (Batista, 2021; Labadie, 2012; Mariottini, 2014; Rodrigues, 2020; Tamkun, 1981), sendo responsável pelos efeitos hemolíticos e letais causados pelo envenenamento com a caravela portuguesa (Mariottini, 2014; Tamkun, 1981). A fisalitoxina foi a primeira toxina hemolítica purificada do veneno de *P. physalis*, embora a sequência não tenha sido publicada, é também a primeira toxina purificada diretamente de nematocistos de Cnidária (Tamkun, 1981).

As alterações a nível da hemostasia e da coagulação são sintomas frequentes causados pelas picadas de cnidárias (Mariottini, 2014). Proteínas hemolíticas têm sido purificadas de diferentes cnidárias, nomeadamente da classe Cubozoa, que inclui espécies em que o veneno é considerado um dos mais letais, tais como a *Chironex fleckeri*, *Carybdea rastoni* e *Carybdea alata* (Mariottini, 2014). As proteínas hemolíticas destes venenos, como as citolisinas CfTX-1 e CfTX-2, são consideradas importantes fatores de toxicidade (Mariottini, 2014; Piontek, 2020). Na espécie *Carybdea rastoni* as citolisinas (CrTX-I, CrTX-II e CrTX-III) têm sido descritas como capazes de induzir a agregação plaquetária (Mariottini, 2014).

As enzimas do tipo serino protéases, metaloproteases e fosfolipases A2 são as principais enzimas descritas no veneno de várias cnidárias (Jouiaei, 2015), e são também descritas como maioritárias no veneno de *P. physalis* (Cunha, 2022).

As fosfolipases A2 (PLA2) pertencem a uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise da membrana fosfolipídica e promovem a libertação de ácidos gordos livres

(Chang, 1987; Jouiaei, 2015; Nevalainen, 2004). Estas por sua vez clivam a ligação sn-2-acyl dos fosfolípidos produzindo quantidades equimolares entre lisofosfolípidos e ácidos gordos livres (Chang, 1987; Jouiaei, 2015; Nevalainen, 2004). Esta enzima possui grande interesse, uma vez que desempenham funções importantes como o catabolismo lipídico, inflamação e transdução de sinal (Batista, 2021; Chang, 1987; Jouiaei, 2015). A atividade da PLA<sub>2</sub> tem sido detetada em homogenatos de tentáculos de diversas Cnidárias pertencentes aos subfilos *Anthozoa*, *Schizophzoa*, *Hydrozoa* e *Cubozoa* e tenham sido associadas na digestão da presa (Jouiaei, 2015). Contudo, embora esteja descrito que as fosfolipases PLA<sub>2</sub>s fazem parte do veneno de *P. physalis*, estas não são consideradas fatores tóxicos do veneno (Jouiaei, 2015; Stillway, 1971).

As metaloproteases são consideradas importantes fatores tóxicos em veneno de cnidária, uma vez que conseguem induzir diversos efeitos tóxicos tais como edema, inflamação e hemorragia (Li, 2022) sendo responsáveis, por degradar a matriz extracelular e inibir a formação de coágulo sanguíneo (Jouiaei, 2015). Muitas destas enzimas são ativadas pelo fator de coagulação IIa e possuem capacidade para ativar o fator de coagulação X, atuando na ruptura dos vasos sanguíneos, causando lesões hemorrágicas fatais (Weston, 2013). Estudos focados na análise de atividade enzimática e funções citotóxicas das metaloproteases das medusas, identificaram diversos efeitos proteolíticos, incluindo atividades gelatinolítica, caseinolítica e fibrinolítica (Jouiaei, 2015).

As serino protéases são também extremamente abundantes em venenos de diversas espécies de águas-vivas, tendo capacidade de atuar na cascata de coagulação das presas (Barzkar, 2021). Possuem capacidade de hidrolisar fatores de coagulação, perturbar a agregação plaquetária e inibir a formação do coágulo por fibrinólise, podendo originar hemorragias e choque hipovolémico (Barzkar, 2021). As serino protéases “hemotóxicas” podem ter tanto propriedades fibrinolíticas, como fibrinogenolítica, perturbando a hemostasia (Weston, 2013). Algumas destas serino protéases são também capazes de ativar o plasminogênio (Weston, 2013). O isolamento e identificação destas enzimas possui grande interesse, uma vez que desempenham um papel fulcral na atividade dos venenos (Barzkar, 2021). Desta forma, é importante

estudar o modo de ação destas protéases de modo a desenvolver terapêuticas antiveneno e também potenciais fármacos para patologias relacionadas com distúrbios da coagulação.

### **3. Aplicações terapêuticas a partir do veneno de *P. physalis***

De modo a contrariar os distúrbios da coagulação, têm sido utilizados agentes trombolíticos, como a “*streptokinase*” e “*urokinase*”, ativadores de plasminogênio (Barzkar, 2021), que atuam como agentes fibrinolíticos naturais, convertendo plasminogênio em plasmina e por sua vez ajudam na dissolução de trombos (Barzkar, 2021). Consequentemente, as enzimas fibrinolíticas comerciais têm sido amplamente utilizadas em tratamentos, contudo esses agentes tornam-se dispendiosos e apresentam efeitos colaterais indesejáveis tais como complicações hemorrágicas (Barzkar, 2021). O desenvolvimento de novos fármacos com propriedades anticoagulantes é essencial na prevenção e tratamento de doenças de tromboembolíticas. Alguns estudos revelaram que o veneno de cobra possui propriedades anticoagulantes tais como inibição de agregação plaquetária e redução dos níveis de fibrinogênio no sangue testada com potencial aplicação farmacológica (Rastogi, 2012). Estudos recentes têm descoberto diversas enzimas no veneno de cnidários com propriedades trombolítica e antitrombóticas. O veneno da água viva *Aurélia aurita* é capaz de degradar as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de fibrinogênio *in vitro* que resulta numa atividade anticoagulante, associada a enzimas do tipo serino protéases e metaloproteases (Khan, 2018), mais eficaz comparativamente com a de alguns venenos de cobra (Dibakar Chakrabarty, 2015).

Composto	Organismo	Descrita em <i>P. physalis</i>	Atividade Biológica	Peso Molecular (kDa)	Referência
<b>Metaloproteases</b>	<i>Schizophozoa,</i> <i>Cubozoa,</i> <i>Anthozoa</i>	Não*	Citolítica, neurotóxica, dano no tecido	17-130	(Jouiaei, 2015; Weston, 2013)
<b>Fosfolipase A2</b>	<i>Anthozoa,</i> <i>Cubozoa,</i> <i>Schizophozoa,</i> <i>Hydrozoa</i>	Sim*	Citolítica, Hemolítica, Digestão da presa	13-45	(Jouiaei, 2015; Stillway, 1971)
<b>Colagenase</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Citotóxica, hemolítica	25	(Burnett, 1987)
<b>Elastases</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Citolítica e hemolítica	N/A	(Werb, 1982)
<b>PpV19.3</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Neurotóxica, cardiotoxica	4.72	(Diaz-Garcia, 2012)
<b>PpV9.4</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Hemolítica	0.55	(Diaz-Garcia, 2012)
<b>DNase</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Citolítica	75	(Neeman, 1980)
<b>Perforinas</b>	<i>Hydrozoa,</i> <i>Scyphozoa,</i> <i>Cubozoa e</i> <i>Anthozoa</i>	Não*	Lise celular	N/A	(Jouiaei, 2015)
<b>Actinoporinas</b>	<i>Anthozoa,</i> <i>Hydrozoa</i>	Não*	Citolítica, hemolítica e paragem cardiorrespiratória, agregação plaquetária	20	(Jouiaei, 2015; Podobnik, 2017)
<b>Hidrolisinas</b>	<i>Hydrozoa,</i> <i>Anthozoa</i>	Não*	Citolítica, digestão da presa hemolítica e paragem cardiorrespiratória	27-31	(Jouiaei, 2015)
<b>Fisalitoxina</b>	<i>Hydrozoa</i>	Sim*	Hemolítica	240	(Tamkun, 1981)
<b>Serotonina</b>	<i>Hydrozoa,</i> <i>Anthozoa</i>	Não*	Vasodilatação e dor aguda	N/A	(Jouiaei, 2015)

Tabela 1 – Composição do veneno da *Physalia physalis* com base em Batista (2021).

\*Sim - Atividade do veneno é compatível com estas moléculas e já foram descritas em *P. physalis*; \*Não – A atividade do veneno é compatível com estas moléculas, mas ainda não foram descritas em *P. physalis*.

#### **4. Racional e objetivos da presente dissertação**

Como descrito acima, o veneno de *P. physalis* provoca distúrbios hemostáticos nas vítimas. Muitos dos sintomas são aparentemente contraditórios, uma vez que em alguns casos são reportados casos clínicos de hemorragia e, noutros casos, é reportada a formação de coágulos. Algumas famílias de enzimas, nomeadamente serino e metaloproteases, têm sido associadas a estes sintomas. No entanto, em *P. physalis*, embora este tipo de atividade enzimática tenha sido reportado no veneno, foi ainda estabelecida uma associação entre a atividade e os distúrbios na coagulação.

O objetivo desta dissertação é analisar a atividade enzimática do tipo serino e metaloprotease no veneno de *P. physalis* e estudar a sua ação na coagulação do sanguínea.

## II - Materiais e Métodos

### 1. Recolha dos tecidos e preparação das amostras

No presente trabalho foram utilizadas amostras de tentáculos de *Physalia physalis* de espécimes recolhidos junto à costa da Ilha de São Miguel, ao largo da Ribeira Quente, no mar dos Açores, no mês de junho do ano de 2022. A captura realizou-se com a ajuda de um camaroeiro, tendo os espécimes sido colocados numa caixa térmica juntamente com água do mar e transportados de imediato para o laboratório da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade dos Açores, onde se separou os tentáculos do pneumatóforo. A região distal dos tentáculos foi segmentada com um bisturi em fragmentos de 1 cm, com 350 a 400 mg, colocado em tubos eppendorf e armazenados a -80°C.

### 2. Extração do veneno

No presente estudo foram utilizados 5 métodos de extração distintos por forma a comparar o método mais eficiente para obtenção das enzimas do veneno: dois métodos de homogeneização mecânica, utilizando esferas de vidro (Carrette, 2004) e homogeneização com “ultraturrax” (Pongprayoon, 1991); um método de homogeneização física por sonicação (Bloom, 1998); e, dois métodos de extração por indução das células urticantes por electroestimulação (Toubarro, 2023) e por indução química com etanol (Jouiaei, 2015). Para o veneno/extrato obtido com cada um destes métodos foi dada as seguintes designações:  $F_v$ , para homogeneização com esferas de vidro;  $V_h$ , para homogeneização com “ultraturrax”;  $F_s$ , para sonicação;  $V_T$  o veneno obtido por electroestimulação; e,  $V_p$  para o a extração por imersão do tentáculo em etanol.

Para a extração mecânica do tentáculo com esferas de vidro (150 – 212 $\mu$ m), adicionou-se ao tentáculo 400 $\mu$ L de tampão fosfato (PB), 20mM a pH 7 e esferas de vidro em microtubos. Levou-se os microtubos ao vortex a durante 10 minutos a 4°C e posteriormente centrifugou-se a 12 000g, a 4°C, durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante ( $F_v$ ) que foi separado em diferentes alíquotas e armazenado a -20°C até

ser utilizado. Na extração de veneno por homogeneização do tentáculo com “ultraturrax”, adicionou-se 400µl de tampão fosfato 20mM, a pH 7, ao tecido e homogeneizou-se durante 3 períodos de 10s, seguidamente centrifugou-se a 12 000 g, a 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi distribuído em diferentes eppendorfs ( $V_h$ ) e armazenado a -20°C. Durante o método de extração de veneno por sonicação, colocou-se o tentáculo em tampão fosfato 20mM, a pH 7, e submeteu-se a ultrassons, em banho de gelo, utilizando um sonicador de sonda programado com 5x 30-ciclos a 30 kHz. Em seguida centrifugou-se as amostras a 12 000g, a 4°C, durante 5 minutos. Realizou-se alíquotas ( $F_s$ ) com o sobrenadante obtido e armazenou-se a -20°C.

No método de extração de células urticantes por electroestimulação, adicionou-se 100µL de 0,9% solução salina de cloreto e sódio (NaCl) ao tentáculo numa câmara de eletroporação, realizando uma aplicação elétrica de 8 volts. Efetuou-se alíquotas ( $V_T$ ) e armazenou-se a -20°C. Para a extração do veneno por indução química com etanol, colocou-se o tentáculo em 100µl de etanol a 90%, durante 30s a temperatura ambiente, em seguida liofilizou-se o homogeneizado. Obteve-se um precipitado no fundo em que se suspendeu com 400µL de Tampão Fosfato 20mM a pH 7 e deixou-se em gelo até dissolver completamente. Realizou-se alíquotas ( $V_P$ ) e armazenou-se a -20°C. A proteína presente no veneno obtido foi quantificada através de medição no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

### **3. Perfil proteico do veneno**

As amostras de veneno de *P. physalis* obtidas por diferentes métodos de homogeneização do tentáculo (por ultraturrax –  $V_h$ ; esferas de vidro –  $F_v$ ; por sonicação  $F_s$ ) e por indução de células urticantes (por etanol –  $V_P$  e electroestimulação –  $V_T$ ), foram analisadas por SDS-PAGE, segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando-se um sistema de eletroforese vertical *Mini-protean II Cell* (Bio-Rad). Para a separação eletroforética por SDS-PAGE, foi utilizado 150µg de proteínas de cada um dos estratos de veneno obtidos nos diferentes métodos, diluído em tampão Laemmli com  $\beta$ -mercaptoetanol, aquecido a 90°C, durante 10 minutos, e aplicado no gel de acrilamida

a 12%. A corrida eletroforética foi realizada a 4°C, durante 90 minutos, sendo que os primeiros 20 minutos decorreram a 90 volts e a restante corrida realizou-se a 150 volts.

Para a coloração de Azul Coomassie das proteínas utilizou-se uma solução de coloração a 0,1% de Azul Coomassie R-250. Por último, o gel foi descorado com uma solução de 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada e deixou-se em agitação até observação do perfil de bandas proteicas.

#### **4. Perfil de protéases do veneno**

Para obter o perfil de protéases do veneno realizou-se uma separação eletroforética das proteínas por zimograma de gelatina dos diferentes métodos de homogeneização do tentáculo ( $V_h$ ;  $F_V$ ;  $F_S$ ) e por indução de células urticantes ( $V_P$  e  $V_T$ ), segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970) com ligeiras modificações. O gel de separação foi preparado a 12% de acrilamida com 0,04% gelatina. Para a separação SDS-PAGE foi utilizada 70 $\mu$ g de cada uma das amostras, solubilizadas em tampão Laemmli não desnaturante e a corrida eletroforética foi realizada a 4°C, durante 90 minutos. Nos primeiros 20 minutos decorreu a 90 volts e o restante tempo de corrida a 150 volts. Após a corrida, o gel foi lavado com água destilada, durante 10 minutos seguido de duas lavagens com Triton-100, a 2,5%, 10 minutos cada. Lavou-se o gel em tampão de incubação (10mL de Tris-HCL a 0,05M, com 10 $\mu$ L de  $CaCl_2$  1mM, 10 $\mu$ L de  $MgCl_2$  1mM e 89,8mL de  $H_2O$  destilada) e incubou-se 30 minutos. Para a coloração do gel utilizou-se uma solução de coloração 0,1% de Azul Coomassie R-250. O gel foi descorado com uma solução de 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada e deixou-se em agitação até observação do perfil de bandas de digestão.

#### **5. Atividade proteolítica em substrato generalista azocaseína**

Neste ensaio testou-se a atividade enzimática do sobrenadante utilizando um substrato generalista azocaseína a 2%, segundo a metodologia de Wang et al. (Wang, 2004), com ligeiras modificações. O ensaio realizou-se a pH 7,5 e a uma temperatura de 37°C para as diferentes amostras de veneno. Para cada amostra ( $V_h$ ,  $F_V$ ,  $F_S$ ,  $V_P$  e  $V_T$ ), pipetou-se 20 $\mu$ L para um eppendorf, adicionou-se 30 $\mu$ L de tampão Tris-HCL a 1M pH 7,5

e 50µL de Azocaseína a 2% e incubou-se durante a noite. No controlo negativo foi adicionado 50µL de tampão Tris-HCl 1M a pH 7,5, e 50µL de azocaseína a 2%. Após a incubação, adicionou-se 30µL de TCA a 100% a cada eppendorf e incubou-se no gelo durante 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se as amostras a 15 000g, durante 5 minutos, e transferiu-se 50µL de sobrenadante de cada amostra para uma placa de 96 poço. Adicionou-se 10µL de solução de NaOH 1M em cada poço para parar a reação e procedeu-se à leitura da placa a 450nm, num leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Fµc). Foram efetuadas três réplicas para cada amostra, para avaliação de significância estatística.

## **6. Atividade proteolítica em substrato generalista com inibidores específicos**

Para o ensaio com inibidores específicos, utilizou-se o substrato generalista azocaseína a 2% com base na metodologia descrita por Lomonte (Lomonte, 2014) com ligeiros ajustes. Neste ensaio, utilizou-se inibidores específicos para serino proteases: TLCK a 50mM (Sigma T4376); APMSF a 100mM (Sigma A6664); 3,4 DCI a 10mM (Sigma D7910); Chymostatin a 5mg/mL (Sigma C7268); STI a 3mg/mL (Sigma T0256); e, Aprotinin a 10mM (Sigma A1153). Para metaloproteases utilizou-se Phosphoramidon a 5mM (Sigma R7385) e EDTA a 0,5M (Sigma ED2SS). Juntou-se num eppendorf, 30µL de amostra, 10µL de inibidor específico e levou-se a incubar a 37°C durante 20 minutos. Em seguida adicionou-se 10µL de Tampão Tris-HCl 50mM a pH 7,5 e 50µL de substrato Azocaseína 2% e incubou-se a 37°C durante a noite. Para o controlo positivo, colocou-se 30µL de amostra, 20µL de Tampão Tris-HCl 50mM a pH 7,5 e 50 µL de Azocaseína 2%. Para o “branco” utilizou-se 50µL de Tampão Tris-HCl 50mM a pH 7,5 em que se adicionou 50µL de Azocaseína a 2% e levou-se a incubar tal como as amostras. Após incubação adicionou-se 30µL de TCA a 100% em cada eppendorf e deixou-se em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se todos os microtubos a 15 000 g, a 4°C, durante 5 minutos, transferiu-se 50 µL de sobrenadante obtido para uma placa de 96 poços e adicionou-se 10 µL de NaOH 1M em cada poço. A absorbância foi medida a 450nm num leitor de microplacas Multiskan Fµc (Thermo Scientific).

Neste ensaio efetuou-se três réplicas técnicas para cada amostra  $V_h$ ,  $V_T$ , para avaliação de significância estatística. A percentagem de inibição foi calculada através da diferença de absorvância em comparação com a amostra não inibida.

### **7. Atividade proteolítica em substratos específicos**

A análise de atividade proteolítica com diferentes substratos específicos permitiu caracterizar a atividade enzimática das amostras de veneno, utilizando o método de Endean and Henderson (Endean, 1969) com ligeiras modificações. Utilizou-se substratos específicos para serino protéases: ALA-ALA-PHE (Sigma A9148), GLY-GLY-PHE (Sigma S1899); GLY-GLY-ARG (Sigma C7784); PRO-PHE-ARG (Sigma B2133-25MG); ALA-ALA-PRO-MET (Sigma M7771); e, GLY-GLY-LEU (Sigma C3022). Foi ainda usado o substrato para carboxipeptidases N-Benzoyl-L-Tyrosine (Sigma B6760) e substrato para aminopeptidases L-proline (Sigma P5267). Todos os substratos específicos foram usados a uma concentração de 10mM. Para cada amostra  $V_h$  e  $V_T$ , pipetou-se 25 $\mu$ L numa microplaca de 96 poços e adicionou-se 20 $\mu$ L de tampão Tris-HCl a 1M, pH 7,5, e 5 $\mu$ L de substrato específico. No “branco” adicionou-se 25 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5, e 25 $\mu$ L de amostra. Efetuou-se três réplicas técnicas para cada tipo de amostra ( $V_h$  e  $V_T$ ) para avaliação de significância estatística, através do valor da média e desvio padrão. Em seguida, procedeu-se à leitura da microplaca através do leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan F $\mu$ c) a um comprimento de onda de 405 nm. Realizaram-se leituras em intervalos de 10 minutos por um período máximo de 1 hora, a 37°C.

Foram realizados ensaios de inibição com os substratos específicos ALA-ALA-PRO-PHE e ALA-ALA-PRO-PHE. Para estes ensaios, o procedimento foi semelhante ao descrito acima, tendo-se adicionado um passo de incubação com o inibidor específico, durante 30 minutos, a 37°C, antes da adição do substrato. A percentagem de inibição foi calculada através da redução da  $V_{m\acute{a}x}$  em comparação com a amostra não inibida.

### **8. Atividade do veneno sobre o coágulo de fibrina**

Os venenos  $V_h$  e  $V_T$  foram testados quanto à atividade fibrinolítica, na digestão do coágulo de fibrina previamente formado segundo o método, de Bajwa (Bajwa, 1980),

com pequenas alterações. Primeiramente, preparou-se uma solução de fibrinogénio (Sigma 341573) a uma concentração final de 4mg/mL em tampão de incubação constituído por 10mL de Tris-HCL 0,05M, 10µL de CaCl<sub>2</sub> 1mM, 10 µL de MgCl<sub>2</sub> 1mM e 89,8 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Seguidamente, transferiu-se para uma microplaca de 96 poços, 50µL de solução de fibrinogénio, adicionou-se 20µL de trombina diluída 1U/mL e incubou-se a 37°C, durante 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se sobre o coágulo formado 20 µL de amostra e 10µL de solução tampão fosfato 20mM, a pH 7. No controlo positivo procedeu-se de igual modo, no entanto, após incubação a 37°C colocou-se 30 µL tampão fosfato 20mM, a pH 7, sem amostra. No controlo negativo foi utilizado exatamente o mesmo protocolo da amostra, mas em detrimento da trombina utilizou-se Tris-HCl 0,005M. No “branco da amostra” não se utilizou fibrinogénio nem trombina. Os resultados foram obtidos através da leitura de absorbância a 405 nm no leitor de microplacas Multiskan Fµc (Thermo Scientific), recorrendo ao software Thermo Scientific SkanIt para as leituras cinéticas em intervalos de 5 minutos durante 1 H e a uma temperatura de 37°C.

## **9. Atividade do veneno sobre o fibrinogénio**

Após avaliação da atividade fibrinolítica das amostras V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub>, procedeu-se à testagem de atividade fibrinogenolítica. Preparou-se uma solução de fibrinogénio a uma concentração final de 4mg/mL e solubilizou-se em 1mL de tampão Tris-HCl 1M, a pH 7,5, e 75mM de NaCl. Numa placa de 96 poços colocou-se 50 µL de solução de fibrinogénio com 20µL de amostra e levou-se a microplaca a incubar a 37°C durante 30 minutos. Após incubação, adicionou-se 10µL de trombina 1U/mL e 20µL de tampão de incubação, tal como descrito no ponto 8. No controlo positivo colocou-se tampão fosfato 20mM, a pH 7, em detrimento de amostra. No controlo negativo adicionou-se se 10µL de H<sub>2</sub>O destilada e 10µL de tampão fosfato 20mM, a pH 7, em detrimento da trombina e da amostra. No “branco da amostra” colocou-se 10µL de H<sub>2</sub>O destilada em detrimento da trombina.

A leitura foi realizada num leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan F $\mu$ c), a um comprimento de onda de 405nm em intervalos de 5 minutos durante 1 H a uma temperatura de 37°C, como descrito anteriormente.

#### **10. Atividade fibrinogenolítica do veneno, por SDS-PAGE**

Para a análise fibrinogenolítica dos venenos, incubou-se 10 $\mu$ L de amostra V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub>, 5  $\mu$ L de solução de fibrinogénio a 4mg/mL, durante 30 minutos, a 37°C. Foi também realizado um controlo de fibrinogénio, sem amostra, incubado nas mesmas condições. Depois da incubação, pipetou-se 3 $\mu$ L de cada uma das soluções (controlo de fibrinogénio, e tratamento com V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub>) e 2 $\mu$ L de Loading Buffer 5x, com  $\beta$ -Mercaptoetanol, e desnaturou-se, durante 5 minutos, a 95°C. Correu-se a amostra num gel de acrilamida a 12%, seguindo o método descrito no ponto 3. Para a coloração das proteínas utilizou-se uma solução de coloração 0,1% de Azul Coomassie R-250. O gel foi descorado com uma solução de 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada e deixou-se em agitação até observação das bandas.

A atividade fibrinogenolítica dos venenos V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub> foi também analisada, por zimograma de fibrinogénio. Para esta análise o gel de eletroforese foi suplementado com fibrinogénio 0.04% e as amostras corridas em SDS-PAGE a num gel a 12%, tal como descrito anteriormente no ponto 4 para o zimograma de gelatina. De seguida, lavou-se o gel em Triton-100 a 2,5%, seguido de 2 lavagens com tampão de incubação (10mL de Tris-HCL a 0,05M, com 10  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 1mM, 10 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 1mM e 89,8 mL de H<sub>2</sub>O destilada) e incubou-se 30 minutos. Para a coloração do gel utilizou-se uma solução de coloração 0,1% de Azul Coomassie R-250. O gel foi descorado com uma solução de 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada e deixou-se em agitação até observação do perfil de bandas de digestão.

#### **11. Atividade fibrinolítica do veneno**

A atividade dos venenos obtidos com os métodos de extração distintos, V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub> foi testada quanto à ação sobre a lise do coágulo de euglobulina, em uma microplaca de 96 poços medida através da redução da absorvância na lise do coágulo plasmático,

utilizando o método de Copley (Copley, 1959), com ligeiras modificações. Foi utilizado plasma de duas amostras de sangue humano saudável, recolhidos numa solução de citrato de sódio, cedido pela clínica Forjaz Sampaio. Foram testados os venenos obtidos pelo método  $V_h$  e  $V_T$ .

Para preparação da solução de euglobulina, adicionou-se 7,2mL de água MiliQ, a 4°C, 600 $\mu$ L de  $CH_3COOH$  a 0,25% e 800 $\mu$ L de plasma e deixou-se em gelo durante 10 minutos. Em seguida, levou-se a centrifugar a 2000 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante e deixado secar o precipitado criado, em gelo, na câmara de fluxo laminar durante 10 minutos. Posteriormente, suspendeu-se o precipitado obtido com 1500  $\mu$ L de tampão borato de sódio 2,6mM, a pH 8,4, suplementado com NaCl a 154mM. Solubilizou-se em banho-maria durante 1 minuto a 37°C, vortexou-se e colocou-se em gelo.

Para preparação do coágulo, adicionou-se 50 $\mu$ L da “solução de euglobulina” preparada anteriormente e 25 $\mu$ L de amostra de veneno numa microplaca de 96 poços. Para indução do coágulo, adicionou-se a cada um dos poços 25 $\mu$ L de solução  $CaCl_2$  0,05M e 10 $\mu$ L de tampão fosfato 20mM a pH 7 e levou-se a incubar a microplaca, durante 10 minutos, a 37°C. Foram preparados para este ensaio três controlos. Para o “controlo positivo” adicionou-se 20  $\mu$ L de tampão fosfato 20mM, a pH 7, em detrimento do veneno e procedeu-se à indução do coágulo de igual modo. Para o controlo negativo, adicionou-se 50 $\mu$ L de tampão borato em detrimento da euglobulina e 20 $\mu$ L de veneno e procedeu-se de igual modo. Para o “branco da amostra”, procedeu-se de igual forma à preparação da amostra, e levou-se a incubar também a 37°C, mas em detrimento da solução de coagulação (solução  $CaCl_2$  0,05M) juntou-se água destilada.

A medição da formação do coágulo foi obtida através da leitura de absorvância num leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan F $\mu$ c). As leituras foram realizadas em intervalos de 5 minutos durante 1H a um comprimento de onda de 405nm, a 37°C, recorrendo ao software Thermo Scientific SkanIt.

## 12. Ensaio de atividade hemolítica do veneno

A ação do veneno de *P. physalis* foi testada quanto à capacidade de lise das hemácias através de um ensaio de atividade hemolítica segundo método de Chakrabarty (D. Chakrabarty, 2000), com ligeiras alterações. Para este ensaio foi utilizado apenas a amostra  $V_h$  e  $V_T$ . Realizou-se uma suspensão de hemócitos obtidos de sangue citrato, a 1:50 numa solução fisiológica de NaCl a 0,8M. Em uma microplaca de 96 poços, transferiu-se 50 $\mu$ L de suspensão de hemócitos e adicionou-se 20 $\mu$ L de amostra de veneno. Para o controlo, em detrimento da solução fisiológica, utilizou-se água destilada. A observação de hemólise das células sanguíneas foi realizada através de observação ao microscópio ótico.

## 13. Fracionamento cromatográfico do veneno

O veneno foi primeiramente aplicado numa coluna de exclusão molecular *Cytiva Hitrap Desalting* de 5mL, equilibrada com Tris-HCl 50mM e 1M de NaCl a pH 8,8 (Tampão B), e corrida num sistema de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC da GE Healthcare Life Sciences) a 5°C, no mesmo tampão, permitindo separar moléculas de peso molecular inferiores a 10kDa, e sais. Depois, a fração eluída (superior a 10kDa) foi aplicada numa coluna de exclusão molecular Superdex 200 (GE), e corrida no mesmo aparelho e com o mesmo tampão. A proteína eluída foi recolhida em frações de 2 mL em eppendorfs, com um coletor automático acoplado ao sistema de cromatografia. As frações correspondentes a cada um dos picos cromatográficos foram juntas num pool, concentradas em “filtros de centrifugação” Centricon-Ultra, com um “cut-off” de 10 kDa e trocado o tampão para Tris-HCl 50mM a pH 8,8. Cada um destes picos foi aplicado, separadamente, numa coluna de troca iónica Hitap Q HP de 2 mL equilibrada com Solução Tris-HCl 50mM, a pH 8,8, e corridos em FPLC. A proteína foi eluída com concentração crescentes de Tris-HCl, 50mM, a pH 8,8, com 1 M NaCl, perfazendo no total 4 steps lineares - 10%, 30%, 60% e 100%. As frações foram recolhidas e juntou-se as correspondentes aos mesmo picos cromatográficos. Em seguida, concentrou-se por ultrafiltração, utilizando Centricons com “cut-off” 10kDa e trocou-se o tampão para fosfato 20mM, a pH 7,5, para realização dos ensaios enzimáticos e de coagulação.

#### **14. Perfil proteico e perfil de digestão das frações cromatográficas de veneno**

As amostras correspondentes a cada um dos picos obtidos na cromatografia por troca iónica foram analisadas por SDS-PAGE, utilizando a metodologia descrita no ponto 3. De modo a obter uma concentração de 100µg/µL para aplicar no gel, realizou-se uma precipitação das amostras em acetona. Para tal, adicionou-se 20µL de TCA a 100% à amostra, deixou-se em gelo durante 30 minutos e centrifugou-se a 10 000 g, durante 10 minutos, a 4°C. Em seguida, lavou-se o sobrenadante com 1mL de acetona refrigerada e centrifugou-se a 10 000 g, durante 5 minutos, a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um eppendorf e adicionou-se 10µL de tampão Tris-HCl a 50mM, pH 8,8, e 3 µL de Loading Buffer 5x com β-Mercaptoetanol. Por fim, deixou-se a hidratar em gelo e de seguida solubilizou-se o precipitado.

De forma a visualizar a atividade proteolítica das amostras de veneno obtidas após o fracionamento de cromatografia de troca iónica, realizou-se uma separação eletroforética em zimograma com substrato de gelatina. Este ensaio foi realizado segundo o procedimento descrito no ponto 4, sendo que em cada poço foi aplicado 50µg de amostra.

### III - Resultados

#### 1. Análise do perfil proteico do veneno por SDS-PAGE

Os resultados obtidos por SDS-PAGE (Figura 1) revelaram um perfil proteico muito semelhante para as amostras  $V_h$ ,  $V_p$ ,  $F_v$  e  $F_s$ , ao nível do peso molecular. É possível visualizar a presença de uma banda maioritária com um peso molecular de aproximadamente 20kDa e três bandas menos intensas, 24kDa, 26kDa e 36kDa respectivamente. Não obstante, a amostra  $V_h$  revelou a banda de 20kDa mais intensa do que as outras 3 amostras e ainda bandas novas, com pesos moleculares entre 75 e 50 kDa e com pesos moleculares próximos de 10kDa. Para a amostra  $V_T$ , observou-se um perfil proteico muito distinto das restantes amostras, apresentando duas bandas de aproximadamente 70kDa e 55kDa, duas bastante intensas entre 50kDa a 40kDa, as quatro bandas de 24kDa, 26kDa, 36kDa e 20kDa identificadas nas amostras obtidas por homogeneização e uma mancha intensa na faixa entre os 12kDa e 5kDa.

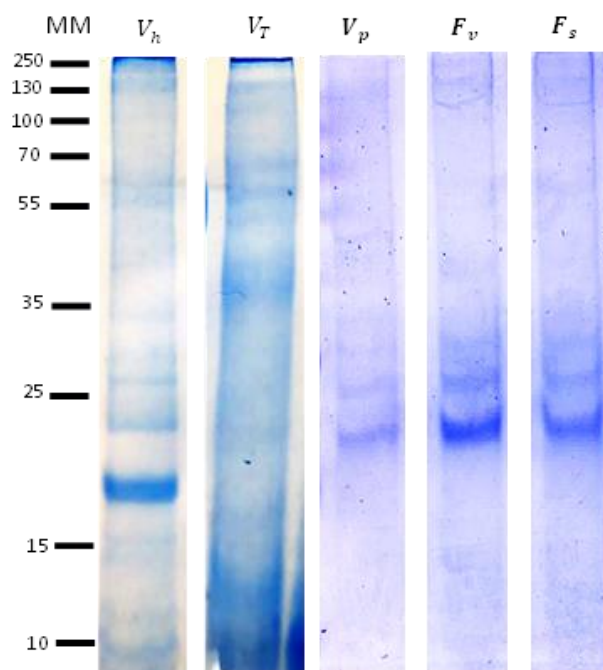


Figura 1 – Perfil proteico do veneno de *P. physalis* obtido através de SDS-PAGE. Análise de diferentes métodos de extração homogeneização do tentáculo (por “ultraturrax” -  $V_h$ ; esferas de vidro -  $F_v$ ; por sonicação -  $F_s$ ), por indução de células urticantes (por etanol -  $V_p$  e electroestimulação -  $V_T$ ).

## 2. Análise do perfil de proteases do veneno por zimograma de gelatina

A separação eletroforética das proteínas do veneno de *P. physalis*, através de zimograma em substrato de gelatina, permitiu visualizar e quantificar a atividade proteolítica das enzimas presentes no veneno obtido nos diversos métodos de extração ( $V_h$ ,  $V_T$ ,  $V_p$ ,  $F_v$  e  $F_s$ ) (Figura 2). Os resultados obtidos revelaram que o perfil proteico foi semelhante nas amostras  $F_v$ ,  $F_s$  e  $V_h$ , apresentando uma banda de digestão intensa com um arrastamento entre os 250kDa e os 70kDa, duas bandas de digestão nítidas muito próximas de 55kDa e uma terceira banda pouco intensa de aproximadamente 35kDa. A amostra  $V_p$ , apresentou muito pouca digestão no zimograma de gelatina, tendo sido possível distinguir uma digestão residual nas bandas de 75kDa e 55kDa (Figura 2). Relativamente à amostra  $V_T$ , à semelhança do que tínhamos observado no perfil SDS-PAGE, apresentou um perfil de digestão completamente distinto. Nesta amostra, para além de apresentar as mesmas bandas de digestão nos pesos moleculares descritos nas amostras  $F_v$ ,  $F_s$  e  $V_h$ , observou-se uma grande mancha de digestão entre os 25kDa e os 50kDa, bem como uma banda de digestão nova com cerca de 20kDa.

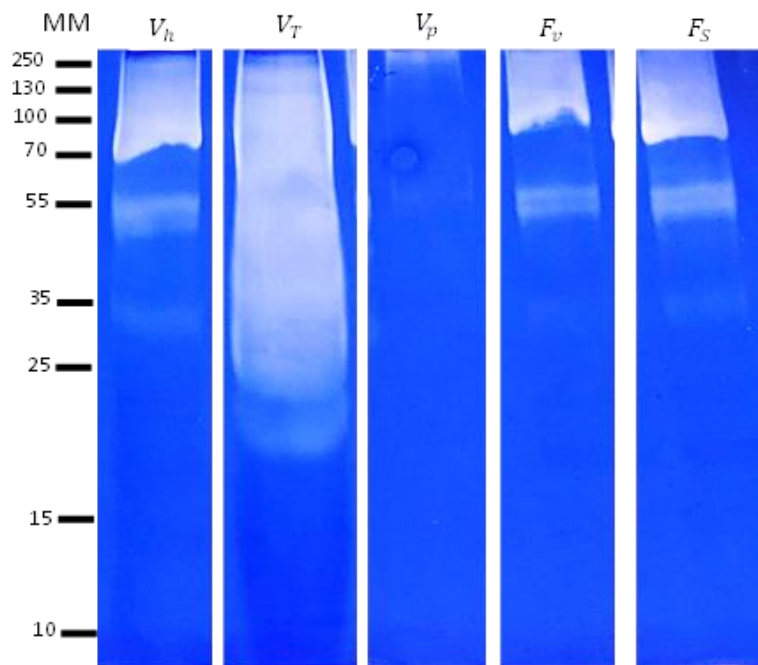


Figura 2 – Gel de eletroforese zimograma com amostras de veneno de *P. physalis* em substrato de gelatina. As amostras de veneno foram obtidas através de diferentes métodos de extração:  $F_v$ , para homogeneização com esferas de vidro;  $V_h$ , para

homogeneização com “ultraturrax”;  $F_s$ , para sonicação;  $V_T$  o veneno obtido por electroestimulação; e,  $V_p$  para o a extração por imersão do tentáculo em etanol.

### 3. Atividade proteolítica do veneno em substrato generalista

Após análise do perfil enzimático das amostras obtidas por diferentes métodos de extração  $V_h$ ,  $V_T$ ,  $V_p$ ,  $F_v$  e  $F_s$  (Figura 2), testou-se a atividade proteolítica das amostras em substrato geral azocaseína. A amostra  $V_T$  apresentou uma atividade enzimática significativamente muito maior, cerca de 7,5 vezes, que as restantes amostras. A amostra  $V_h$  apresentou maior que as amostras  $V_p$ ,  $F_v$  e  $F_s$ , embora não seja significativamente diferente (Gráfico 1).

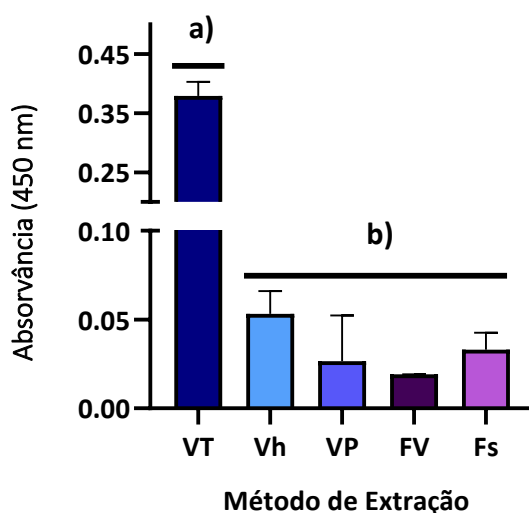


Gráfico 1 – Ensaio de atividade proteolítica amostras de veneno de *P. physalis* obtidas por diversos métodos de extração testadas em azocaseína, medida através dos valores de absorvância. Amostra obtida por homogeneização:  $F_v$ , para homogeneização com esferas de vidro;  $V_h$ , para homogeneização com “ultraturrax”;  $F_s$ , para sonicação;  $V_T$  o veneno obtido por electroestimulação; e,  $V_p$  para o a extração por imersão do tentáculo em etanol. Análise estatística realizada por ANOVA; a) – apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); b) – não apresentam diferenças significativas entre si ( $p < 0,01$ ).

### 4. Análise da atividade proteolítica do veneno

Após análise do perfil enzimático por zimograma, em SDS-PAGE, selecionou-se as amostras de veneno de *P. physalis* extraído por homogeneização  $V_h$  e por indução de

células urticantes  $V_T$ , para análise das principais famílias de enzimas presente no veneno, utilizando diferentes inibidores específicos. Foram selecionadas apenas estas duas amostras por apresentarem perfis de hidrólise distintos. Tratou-se a amostra  $V_h$  com inibidores de metaloproteases onde observou-se uma perda de atividade, nomeadamente, o EDTA e Phosphoramidon, e para inibidores de serinos protéases 3,4 DCI, APMSF e Aprotinin. A amostra  $V_T$  apresentou uma forte inibição em STI e APMSF, os inibidores específicos para serino protéase do tipo tripsina e quimotripsina. Comparando a inibição de atividade enzimática dos dois venenos observou-se diferenças significativas. A amostra  $V_h$  apresentou uma redução de atividade proteolítica de 68% e 61%, para os inibidores EDTA e 3,4 DCI, significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ) que a amostra  $V_T$ . A amostra  $V_T$  apresentou uma inibição significativa maior ( $p < 0,05$ ) para o inibidor STI de 38,2% (Gráfico 2) que a amostra  $V_h$ .

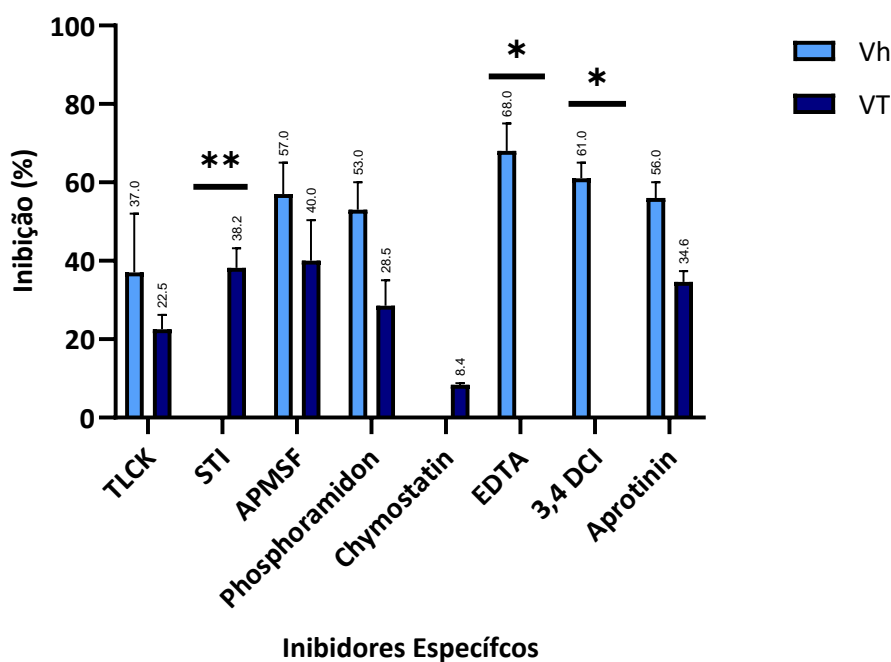


Gráfico 2 – Ensaio de inibição de atividade proteolítica. Ensaio realizado em substrato generalista azocaseína, a 2%, com amostra de veneno obtida por homogeneização -  $V_h$  e por indução de células urticantes -  $V_T$ . Análise estatística realizada por ANOVA; \* - Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ); \*\* - Diferença estatística muito significativa ( $p < 0,01$ )

A análise de atividade proteolítica com diferentes substratos específicos permitiu confirmar as diferentes famílias de protéases do veneno. Na amostra  $V_h$  obteve-se maior atividade enzimática para o substrato ALA-ALA-PHE, substrato específico para serino protéases do tipo quimotripsina. Relativamente à amostra  $V_T$  observou-se uma maior atividade enzimática para o substrato L-PROLINE, específico para aminopeptidases, bem como, para substratos específicos de serino protéases ALA-ALA-PRO-MET, ALA-ALA-PHE, GLY-GLY-PHE e PRO-PHE-ARG do tipo quimotripsinas e “thrombin-like” (Gráfico 3). Comparando a atividade enzimática dos dois venenos observou-se diferenças significativas entre os substratos específicos. Para a amostra  $V_h$  observou-se uma atividade enzimática significativamente mais elevada para o substrato ALA-ALA-PHE ( $p < 0,05$ ). Em relação à amostra  $V_T$  observou-se uma atividade enzimática significativa maior ( $p < 0,05$ ) para os substratos L-PROLINE, GLY-GLY-PHE, PRO-PHE-ARG e ALA-ALA-PRO-MET (Gráfico 3).

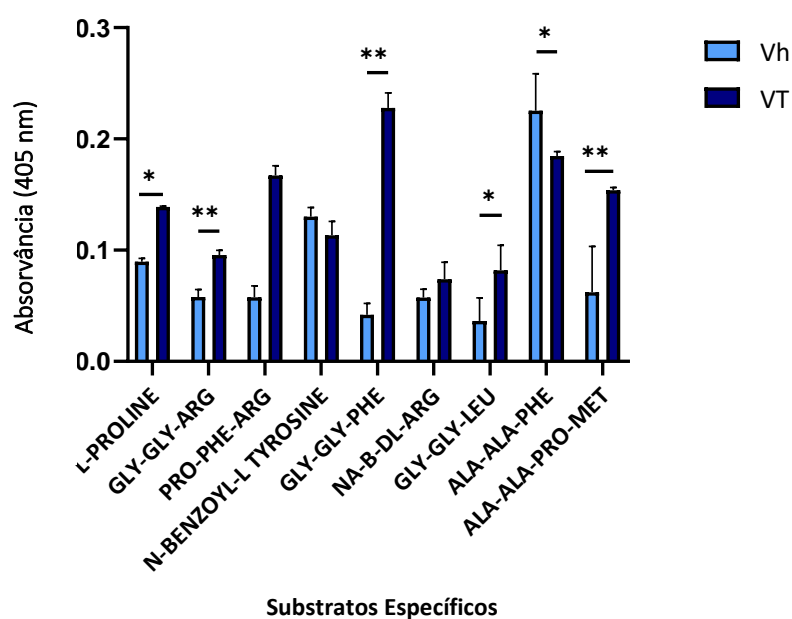


Gráfico 3 – Atividade enzimática com substratos específicos. Amostras de veneno obtidas por: homogeneização –  $V_h$ ; indução de células urticantes –  $V_T$ . Análise estatística realizada por ANOVA; \* - Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ); \*\* - Diferença estatística muito significativa ( $p < 0,01$ ).

## 5. Atividade do veneno sobre o coágulo de fibrina

Atividade fibrinolítica foi testada através das medições de alterações de absorvância resultantes da digestão do coágulo de fibrina. Após aplicação da amostra  $V_h$  sobre o coágulo formado, os valores de absorvância mantiveram-se constantes ao longo de 60 minutos, não havendo uma redução significativa relativamente ao coágulo não tratado ( $C^+$ ), ou seja, a amostra não foi capaz de digerir o coágulo de fibrina. Surpreendentemente, na amostra de fibrinogénio em que se aplicou  $V_h$  e não se adicionou trombina para induzir o coágulo ( $C^-$ ), também se verificou a formação de um coágulo. O que significa que houve formação de um coágulo induzido pela ação da amostra  $V_h$  (Gráfico 4 - A). Relativamente à amostra  $V_T$ , verificou-se que os valores de absorvância reduziram significativamente após a adição do veneno sobre o coágulo formado, passando de um valor de 1,5 nm para aproximadamente 0,5 nm (Gráfico 4 - B), o que representa uma redução de 75% da absorvância do coágulo após 60 min, indicando uma atividade fibrinolítica bastante notória. Na amostra  $V_T$ , de em que não se adicionou trombina ao fibrinogénio para indução do coágulo, não se verificou a formação do coágulo, diferente do observado para amostra  $V_h$ .

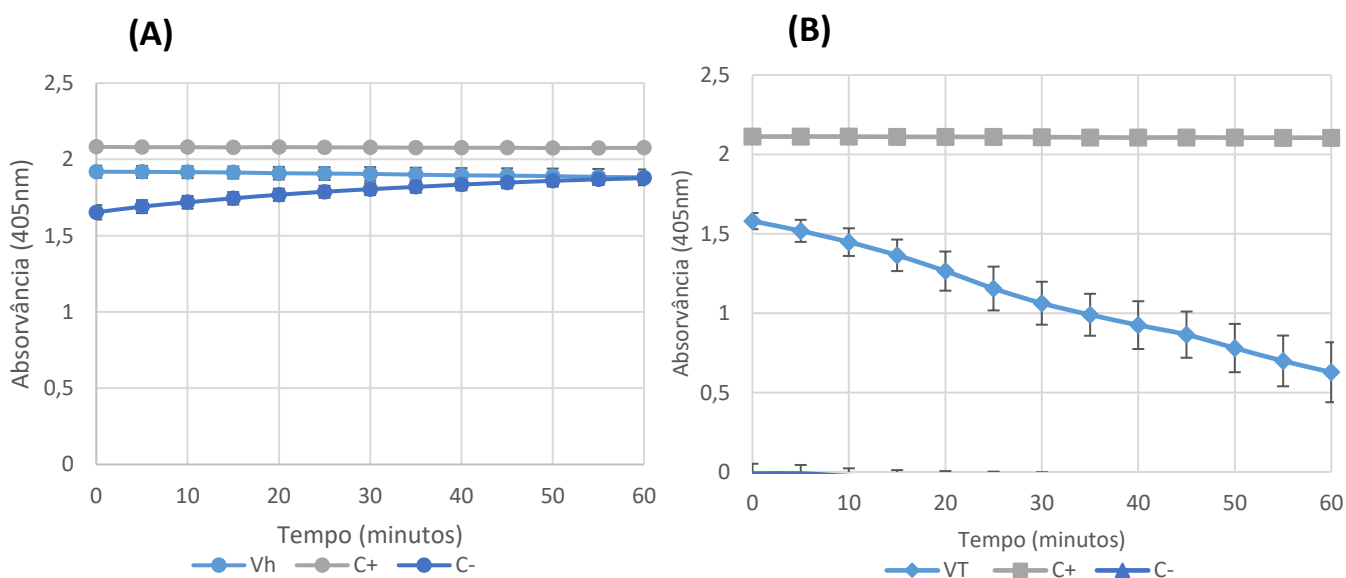


Gráfico 4 – Ação das amostras de veneno de *P. physalis*  $V_h$  e  $V_T$  sobre o coágulo de fibrina medida através dos valores de absorvância ao longo do tempo. A medição foi realizada através do valor da média e desvio padrão de 3 réplicas técnicas para cada amostra  $V_h$  e  $V_T$ .

V<sub>T</sub>. Legenda: A, ação da amostra V<sub>h</sub> sobre o coágulo de fibrina; B, ação da amostra V<sub>T</sub> sobre o coágulo de fibrina. C<sup>+</sup>, corresponde ao coágulo de fibrina sem tratamento com o veneno; C<sup>-</sup>, fibrinogénio sem adição de trombina, com aplicação do veneno.

## 6. Atividade do veneno sobre o fibrinogénio

Após avaliação da atividade fibrinolítica, foi testada a atividade sobre o fibrinogénio, medida através da formação do coágulo de fibrina. Para tal, realizou-se ensaios de coagulação utilizando fibrinogénio previamente incubado com cada uma das amostras de veneno. Na amostra de fibrinogénio incubada com o V<sub>h</sub>, observou-se a formação de um coágulo consolidado sem a adição de trombina, confirmando o resultado observado no ensaio anterior. Este coágulo é semelhante ao coágulo com trombina, sem incubação com o veneno (C<sup>+</sup>) (Tabela 2 e Figura 1 do Anexo 1). Este resultado permitiu-nos confirmar que o veneno V<sub>h</sub> induz a formação do coágulo de fibrina. Na amostra de fibrinogénio incubada com o V<sub>T</sub>, não se observou formação de qualquer coágulo mesmo após a adição de trombina, o que indica a atividade fibrinogenolítica desta amostra.

V <sub>h</sub>			V <sub>T</sub>		
C <sup>+</sup> (Fg + Tb)	C <sup>-</sup> (Fg + V <sub>h</sub> )	V <sub>h</sub> (Fg + V <sub>h</sub> + Tb)	C <sup>+</sup> (Fg + Tb)	C <sup>-</sup> (Fg + V <sub>T</sub> )	V <sub>T</sub> (Fg + V <sub>T</sub> + Tb)
+	+	+	+	-	-

Tabela 2 - Atividade do veneno de *P. physalis* sobre o fibrinogénio, medido através da formação de coágulo de fibrina. Legenda: Fg, fibrinogénio; Tb; trombina; C<sup>+</sup>, amostra de fibrinogénio com adição de trombina, sem incubação com o veneno; C<sup>-</sup>, amostra de fibrinogénio incubada com o veneno, sem adição de trombina; V<sub>T</sub>, veneno obtido por indução das células urticantes; V<sub>h</sub>, veneno obtido por homogeneização mecânica; +, formação de coágulo; -, não formação de coágulo.

## 7. Atividade do veneno sobre o fibrinogénio analisada por SDS-PAGE

Modo a estudar a hidrólise de fibrinogénio, foi obtido o perfil SDS-PAGE após incubação com cada uma das amostras do veneno,  $V_T$  e  $V_h$ . O perfil de fibrinogénio não tratado apresenta três bandas características, correspondente às 3 cadeias polipeptídicas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ , com pesos moleculares de 66kDa, 56kDa e 47kDa, respetivamente (Figura 3). A incubação do fibrinogénio com a amostra  $V_h$ , revelou a digestão parcial das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , resultando no aparecimento de uma banda muito intensa e maioritária de resíduos de fibrina com aproximadamente 25kDa, indicando uma grande especificidade de clivagem. O perfil de hidrólise apresenta também várias bandas minoritárias, mais ténues, “em escada”, entre os 25 e os 10kDa, característico de um padrão de degradação enzimática (Figura 3). O perfil obtido com  $V_h$  é semelhante ao perfil conhecido da digestão com trombina, que origina resíduos com 23kDa. Diferente do que foi observado na amostra  $V_h$ , a incubação de fibrinogénio com a amostra  $V_T$  resultou numa digestão completa das três cadeias de fibrinogénio, resultando numa mancha difusa, impossibilitando a discriminação de bandas maioritárias com pesos moleculares definidos, e com uma mancha de péptidos com peso molecular inferior a 10 kDa (Figura 3).

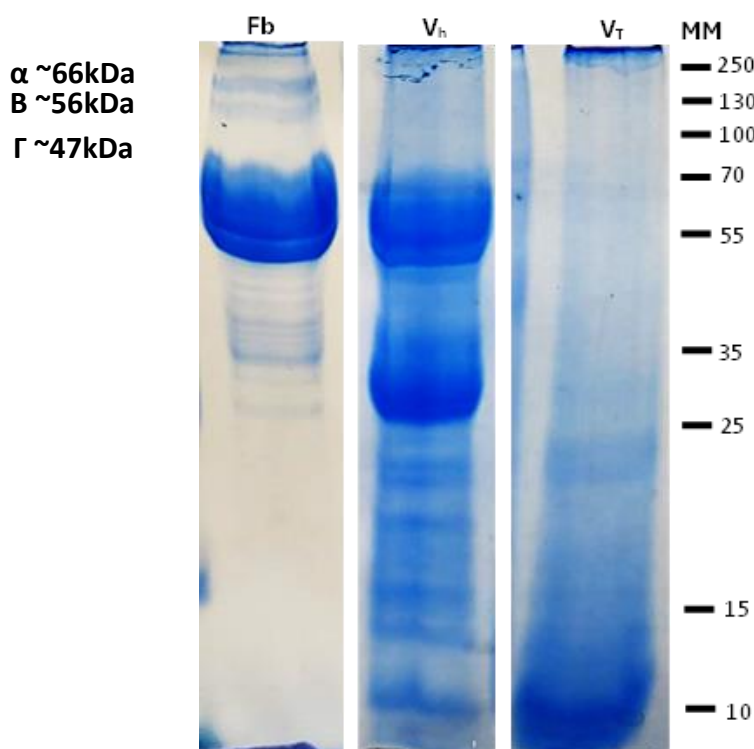


Figura 3 – Perfil SDS-PAGE do fibrinogénio incubado com as amostras de veneno. Legenda: Fb, perfil do fibrinogénio; V<sub>h</sub>, fibrinogénio incubado com a amostra V<sub>h</sub>; V<sub>T</sub> fibrinogénio pré-incubado com a amostra V<sub>T</sub>;

### **8. Atividade do veneno sobre o coágulo da euglobulina**

A atividade do veneno foi testada sobre o coágulo, e o tempo de lise de euglobulina, utilizando amostras de plasma humano. A presença do coágulo, bem como a sua consistência, foram confirmados na placa por “inspeção mecânica”, tendo sido comparadas as diferenças entre a amostra sem tratamento e tratada com o veneno. As proteínas do plasma (euglobulina) tratadas com a amostra V<sub>h</sub> apresentaram formação de coágulo mesmo sem indução da coagulação pela adição de Ca<sup>+</sup>, indicando mais uma vez uma atividade “pro-coagulante” (Tabela 3). O coágulo formado não apresenta diferenças em termos de consistência, com o coágulo obtido pela adição de Ca<sup>+</sup> (C<sup>+</sup>). Os valores de absorvância mantiveram-se constantes ao longo de 60 minutos após a formação do coágulo e o tempo de lise de euglobulina não foi alterando significativamente em comparação com os valores da amostra tratada com cálcio.

Nas proteínas do plasma tratadas com a amostra V<sub>T</sub>, não foi observada a formação de coágulo, mesmo após a indução com Ca<sup>+</sup> (Figura 2, Anexo 2). Estes resultados diferem drasticamente aos obtidos com a amostra V<sub>h</sub> e estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de fibrina, indicando que a atividade fibrinolítica da amostra V<sub>T</sub> impede completamente a formação de um coágulo.

V <sub>h</sub>			V <sub>T</sub>		
C <sup>+</sup> (Eg + Ca <sup>+</sup> )	C <sup>-</sup> (Eg + V <sub>h</sub> )	V <sub>h</sub> (Eg + V <sub>h</sub> + Ca <sup>+</sup> )	C <sup>+</sup> (Eg + Ca <sup>+</sup> )	C <sup>-</sup> (Eg + V <sub>T</sub> )	V <sub>T</sub> (Eg + V <sub>T</sub> + Ca <sup>+</sup> )
+	+	+	+	-	-

Tabela 3 – Euglobulina tratada com veneno. Legenda: Veneno obtido por indução das células urticantes (V<sub>T</sub>) e por homogeneização (V<sub>h</sub>); C<sup>+</sup> solução de euglobulina (Eg) não incubada com o veneno, com coágulo induzido pela adição de Ca<sup>+</sup>; C<sup>-</sup>, solução de euglobulina incubada com o veneno, sem indução do coágulo pela adição de Ca<sup>+</sup>; V<sub>h</sub> e V<sub>T</sub>, solução de euglobulina incubada com o veneno, respetivamente, com indução do coágulo pela adição de Ca<sup>+</sup>; +, formação de coágulo; -, não formação de coágulo.

### 9. Atividade do veneno sobre células sanguíneas

A atividade do veneno foi testada quanto à sua capacidade de provocar a hemólise em amostras humanas. Verificou-se que nenhum venenos obtidos induz a hemólise das células sanguíneas. As células sanguíneas tratadas em amostra V<sub>h</sub> formam aglomerado no fundo do poço (Figura 4 – A), ao contrário das células tratadas com a amostra V<sub>T</sub>, que se mantiveram dispersas (Figura 4 – B), semelhante ao observado nas células sanguíneas mantidas em solução fisiológica. A observação das células sanguíneas tratadas em amostra V<sub>h</sub> ao microscópio revelou a aglutinação das células sanguíneas (Figura 5 – B), completamente diferente do observado nas células sanguíneas mantidas em solução fisiológica (Figura 5 – C), que se mantiveram dispersas e em suspensão.

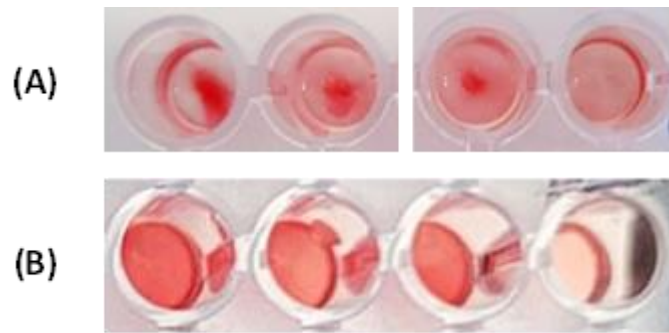
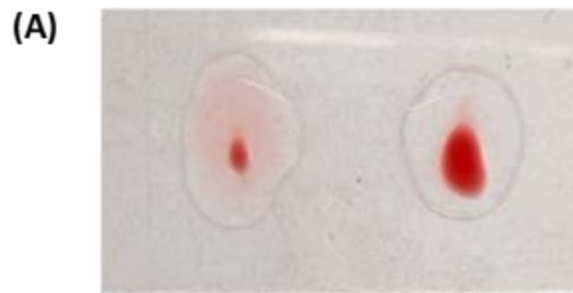


Figura 4 – Ensaio de atividade hemolítica em amostra de veneno de *P. physalis* em microplaca de 96 poços. Legenda: (A) – Ensaio de atividade hemolítica em extraída por homogeneização  $V_h$ ; 1º poço – células sanguíneas tratadas com amostra  $V_h$ ; 2º poço – células sanguíneas em tampão da amostra; 3º poço – células sanguíneas em solução fisiológica; 4º poço – células sanguíneas em água destilada. (B) - Ensaio de atividade hemolítica em extraída por homogeneização  $V_T$ ; 1º poço – células sanguíneas tratadas com amostra  $V_T$ ; 2º poço – células sanguíneas em tampão da amostra; 3º poço – células sanguíneas em solução fisiológica; 4º poço – células sanguíneas em água destilada.



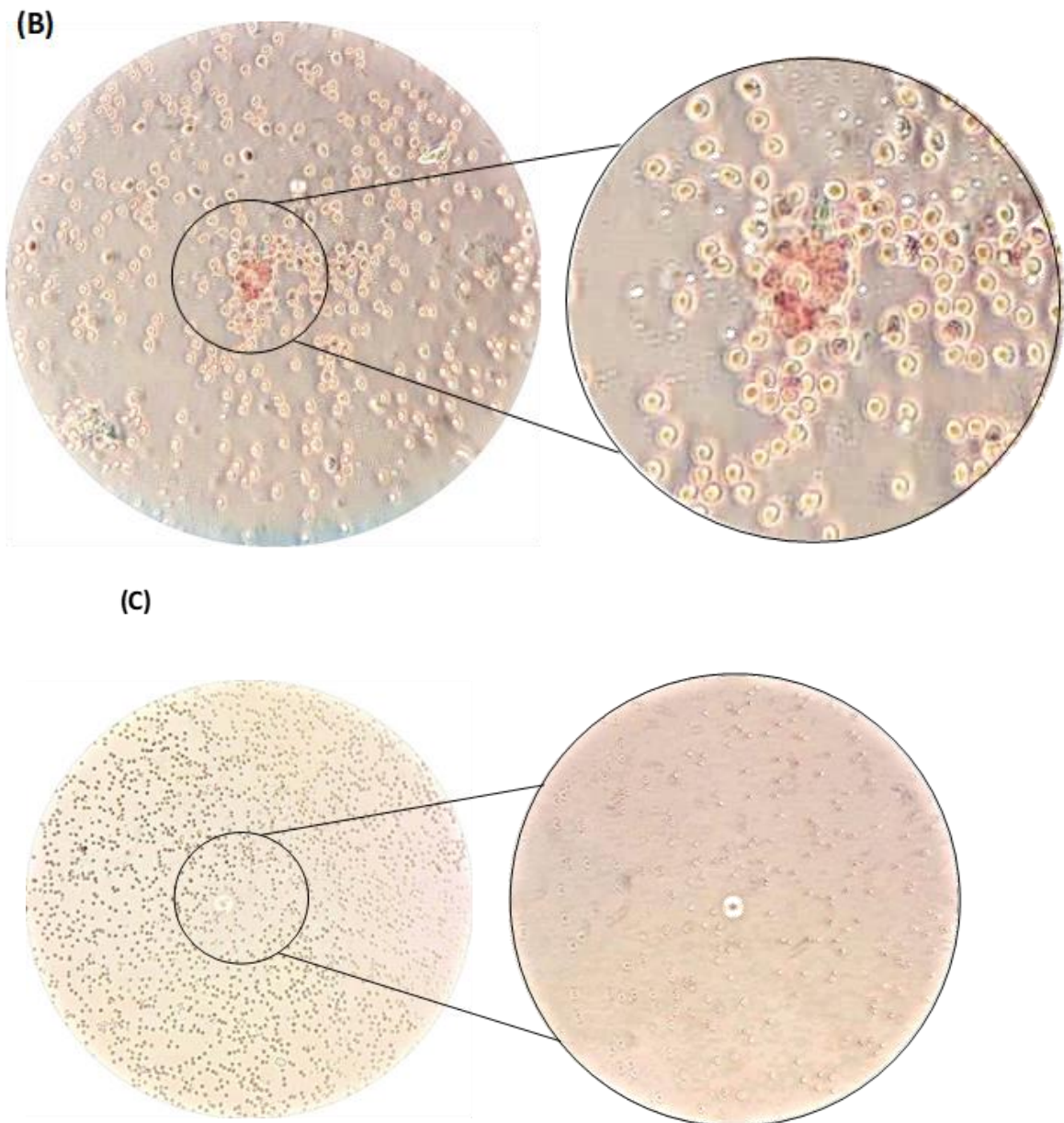


Figura 5 – Preparação de lâmina e observação de ensaio de atividade hemolítica ao microscópio. (A) – Preparação de lâmina de microscópio controlo salino - células sanguíneas em solução fisiológica 0,8M (à esquerda) e Células sanguíneas tratadas com amostra  $V_h$  (à direita). Visualização ao microscópio do ensaio de atividade hemolítica em amostra de veneno de *P. physalis* extraída por homogeneização  $V_h$ : (B) – Células sanguíneas tratadas com amostra; (C) – Controlo salino, células sanguíneas em solução fisiológica 0,8M.

## 10. Fracionamento cromatográfico do veneno

O veneno Vh, foi primeiramente fracionado numa exclusão molecular do tipo “Desalting”, obtendo-se um pico proteico com peso molecular superior a 10 kDa, com a eliminação de sais e de moléculas de baixo peso molecular. Nesta fração foi eliminada uma grande parte do pigmento azul do veneno, devido à eliminação das bilirrubinas (Figura 6 - A). O fracionamento subsequente desta amostra por troca iónica, permitiu obter 4 picos cromatográficos, um pico de exclusão molecular, e 3 picos de proteína eluídos por steps com concentrações crescentes de NaCl de 0.3 M, 0.6 M e 1 M (Figura 6 - B).

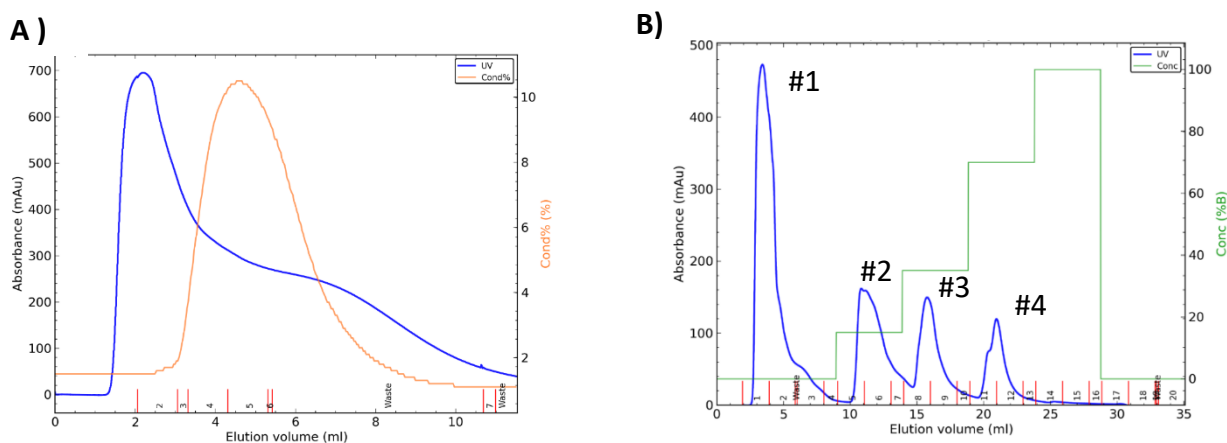


Figura 6 – Fracionamento cromatográfico da amostra de veneno *P. physalis*. A exclusão molecular por coluna *Hitrap Desalting*; B. Troca iónica utilizando *Hitrap Q*. Legenda: mAu, proteína medida a 280nm; #, frações de proteína eluídos e recolhidos.

## 11. Caracterização enzimática das frações cromatográficas do veneno

A fração de peso molecular superior a 10 kDa, obtida após “Desalting”, manteve a atividade específica para os substratos ALA-ALA-PHE e ALA-ALA-PRO-MET, específicos para serino protéases do tipo quimotripsina, sem diferenças significativas entre ambos substratos (Gráfico 5 - A). Foi notória uma redução muito significativa da atividade enzimática relativamente ao veneno original (antes da exclusão molecular). O uso de inibidores específicos (Gráfico 5 - B) comprovou que a amostra continua a ser suscetível

aos inibidores do tipo serino protéase APMSF, 3,4 - DCI e Aprotinin, que apresentaram uma inibição de 51%, 38% e 34%, respectivamente. Os inibidores Phosphoramidon e EDTA deixaram de ter uma ação inibitória sobre o veneno, indicando uma redução substancial da atividade do tipo metaloprotease.

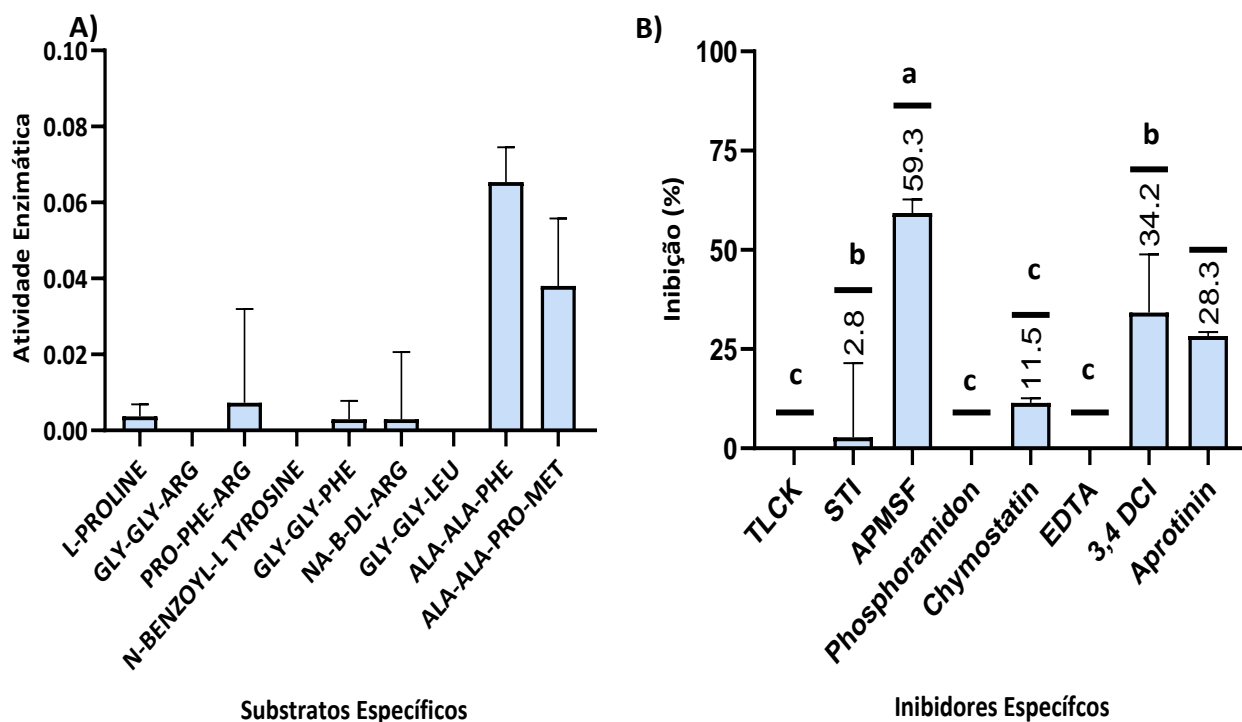


Gráfico 5 – Avaliação da atividade enzimática do veneno Vh após exclusão molecular. A), atividade enzimática com substratos cromogêneos específicos; B), suscetibilidade da atividade enzimática a diferentes inibidores específicos, utilizando substrato generalista. A atividade foi medida através de análise estatística realizada por ANOVA. As letras a), b) e c) indicam a diferenças significativas entre si.

## 12. Atividade do veneno sobre o fibrinogénio após “Desalting”

A atividade pró-coagulante do veneno  $V_h$  foi confirmada após a separação de sais e moléculas de baixo peso molecular. A atividade de  $V_h$  foi testada por ensaio de coagulação, incubado o veneno com o fibrinogénio e medida a capacidade de formação do coágulo de fibrina (sem adição de trombina). Observou-se a formação de um coágulo após 10 min de incubação, sem diferenças significativas com o coágulo obtido amostra de fibrinogénio incubada com trombina (Gráfico 6), ou seja, a amostra  $V_h$  mantém a capacidade de induzir a formação do coágulo mesmo após uma redução significativa da atividade do tipo metaloprotease (como observado em 9).

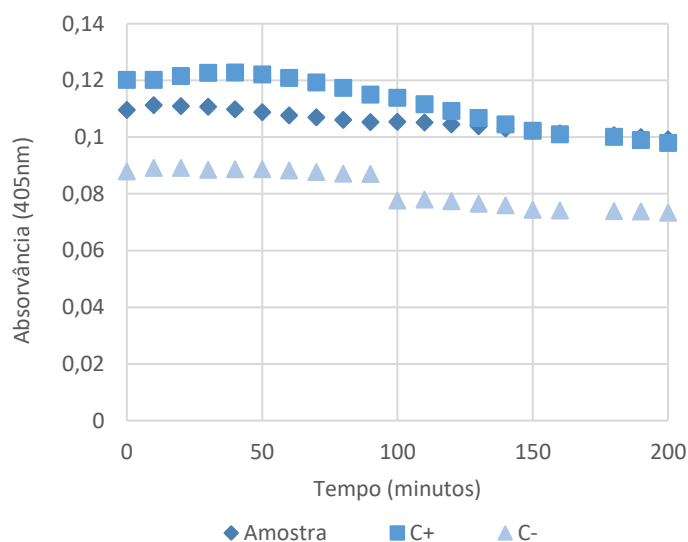


Gráfico 6 - Atividade pró-coagulante do veneno  $V_h$  após exclusão molecular. Legenda: Amostra  $V_h$  incubada com fibrinogénio durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , sem adição de trombina;  $C^+$ , Incubação de fibrinogénio com adição de trombina durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ ;  $C^-$ , Incubação de fibrinogénio, 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .

### 13. Caracterização enzimática do veneno após fracionamento por troca iônica

A concentração de proteína foi determinada para cada uma das frações e posteriormente caracterizada a atividade enzimática com os substratos específicos ALA-ALA-PHE e ALA-ALA-PRO-PHE. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois substratos. A #2 foi a que apresentou maior atividade enzimática, mas sem diferenças significativas relativamente às #1 e #3 (Gráfico 7).

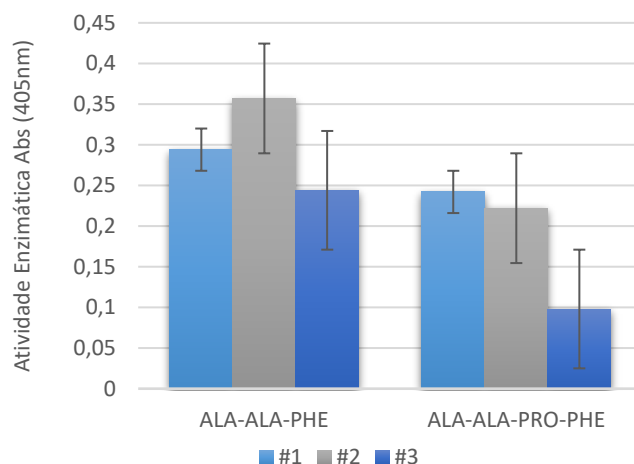


Gráfico 7 - Ensaio de atividade proteolítica das frações de  $V_h$  obtidas por troca iônica. Atividade foi determinada com os substratos ALA-ALA-PHE e ALA-ALA-PRO-PHE com incubação de 10 minutos a 37°C.

A inibição da atividade enzimática específica realizada com cada uma das frações, revelou uma forte inibição com os inibidores EDTA e APMSF (Gráfico 8). Esta inibição foi superior a 60% nas frações #1 e #2, e um pouco inferior, mas próximo dos 50%, na #3. De realçar uma inibição muito baixa na #4. Este resultado revela atividade proteolítica do tipo serino e metaloproteases em todas as frações obtidas do veneno  $V_h$ .

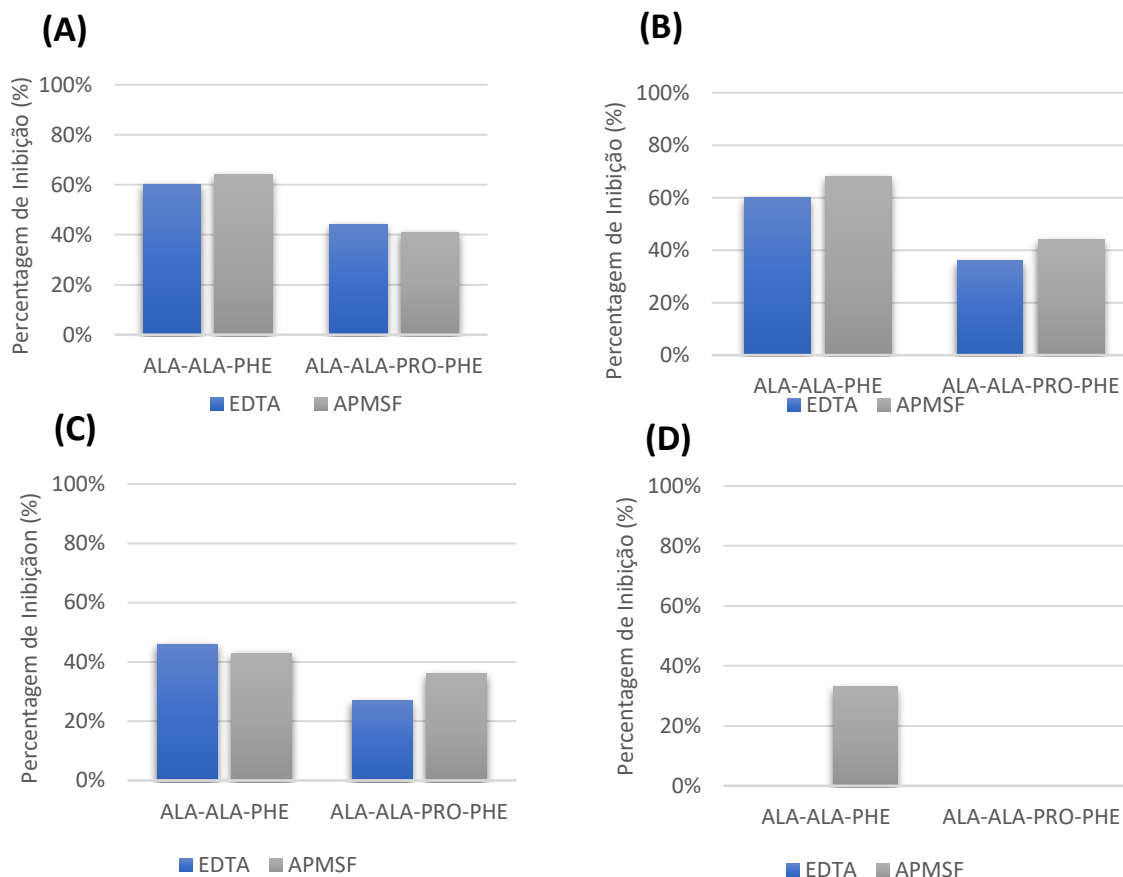


Gráfico 8 – Ensaio de inibição da atividade proteolítica específica das frações de  $V_h$  obtidas por troca iônica. A atividade enzimática foi determinada com substratos específicos *ALA-ALA-PHE* e *ALA-ALA-PRO-PHE* após 10 min de incubação a 37°C na presença APMSF e EDTA. Legenda: os gráficos A, B, C e D correspondem às frações cromatográficas #1, #2, #3 e #4, respetivamente.

#### 14. Perfil proteico e enzimático do veneno após fracionamento por troca iônica

A análise por SDS-PAGE revelou um perfil distinto para cada pico de eluição. Não obstante, é possível visualizar a presença de uma banda maioritária com um peso molecular de aproximadamente 20kDa que é comum a todas as frações. A #2 revelou bandas distintas maioritárias, com um peso molecular de aproximadamente 25kDa, 35kDa, e 55kDa, respetivamente. A #3, revelou um perfil semelhante à #2, com enriquecimento de proteínas de peso molecular entre 50 e 100 kDa (Figura 7).

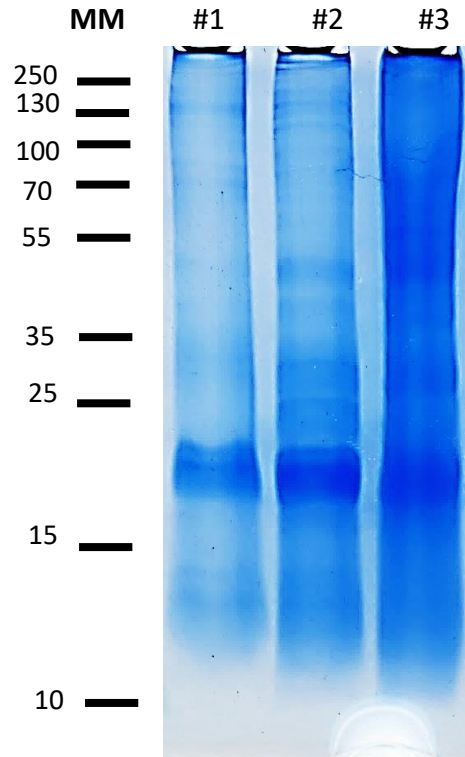


Figura 7 – Perfil SDS-PAGE das frações cromatográficas de veneno  $V_h$  de *P. physalis*. As frações obtidas através de fracionamento por cromatografia de troca iônica *HitraQ* e analisadas por SDS-PAGE 12 % de acrilamida.

A análise das frações em zimograma com substrato de gelatina, revelou um perfil de proteólise semelhante nas #2 e #3, apresentando uma banda de digestão intensa com um arrastamento entre os 130 kDa e 100 kDa, duas bandas de digestão nítidas com aproximadamente 35 kDa e 55 kDa e uma terceira banda de digestão com aproximadamente 20 kDa. A #2 apresentou duas bandas adicionais em relação à #3, nítidas e com um peso molecular de aproximadamente de 27 e 33 kDa. A #1 revela um perfil de proteólise distinto, com uma banda de digestão entre os 250 kDa 130 kDa, duas bandas de digestão ténues muito próximas de aproximadamente 70 kDa e uma banda de digestão ténue entre os 55 kDa e os 35 kDa (Figura 8 - A).

A análise do zimograma, utilizando fibrinogénio como substrato, revelou duas bandas com aproximadamente 35kDa e duas bandas com 27kDa, identificadas no zimograma de gelatina. No entanto, a banda de digestão intensa com entre os 130kDa e 100kDa bem como e uma terceira banda de digestão com aproximadamente 20kDa não estão presentes, ao contrário do zimograma de gelatina (Figura 8 - B).

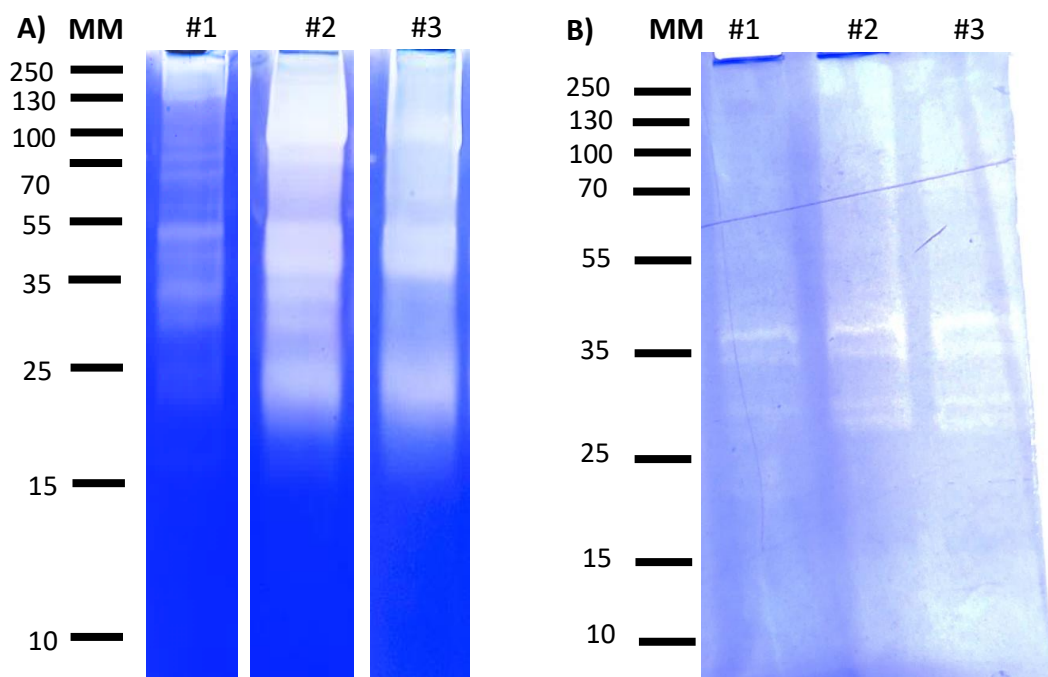


Figura 8 – Perfil enzimático das frações cromatográficas de veneno  $V_h$  de *P. physalis*. Frações obtidas através de fracionamento por cromatografia de troca iónica *HitraQ* e analisadas por zimograma SDS-PAGE 12 % de acrilamida. A) zimograma com substrato de gelatina; B) zimograma com substrato fibrina, 12 %; #1, #2, #3 e #4 corresponde aos picos representados no cromatograma da figura 4.

### 15. Atividade fibrinogenolítica do veneno após fracionamento por troca iónica

A atividade das frações cromatográficas foi testada quanto à ação sobre o fibrinogénio e medida através da formação do coágulo de fibrina. Na amostra de fibrinogénio incubada com a #1 (Gráfico 9 – A), observou-se uma redução acentuada dos valores de absorvância do coágulo formado após a adição de trombina em comparação com o coágulo formado sem tratamento com a amostra ( $C^+$ ). Este resultado, foi imprevisto porque a mostra  $V_h$  original não apresentava atividade anticoagulante (ao contrário da  $V_T$ ), e indica o enriquecimento de enzimas com atividade fibrinogenolítica nesta fração. Na amostra de fibrinogénio incubada com a #2, observou-se uma atividade pro-coagulante, com a formação de um coágulo mesmo sem adição de trombina, tal como observado na amostra  $V_h$  original. O coágulo formado pela adição da #2 (Gráfico

9 – B) apresentou valores de absorvância mais elevados que o coágulo induzido com trombina (C<sup>+</sup>), o que indica a formação de coágulo consolidado. De salientar, ao longo de 60 minutos de incubação do coágulo formado com a #2, os valores de absorvância reduziram significativamente de 0,7 para 0,4, enquanto o coágulo de trombina manteve sempre o valor. Este resultado revela uma atividade pro-coagulante e fibrinolítica na mesma fração, o que pode indicar a presença de diferentes enzimas. Na incubação do fibrinogénio com a #3 (Gráfico 9 – C), o resultado foi semelhante ao da #2, com a formação de um coágulo mais opaco que o coágulo do C<sup>+</sup>, seguida da digestão desse coágulo. Nesta amostra a digestão posterior do coágulo foi mais notória, ocorrendo a digestão completa em 60 minutos, passando de uma absorvância de 0,5 para 0,1, muito próximo dos valores do C<sup>-</sup>. Surpreendentemente, foi observada uma ausência completa de coágulo no fibrinogénio tratado com a #4 (Gráfico 9 – D), o que indica a hidrólise do fibrinogénio. Resumindo, a #1 e #4 são capazes de impedir a formação de coágulo, devido à atividade fibrinogenolítica, diferente da #2 e #3, que têm ação fibrinogenolítica pró-coagulante. Após a análise do perfil de zimograma, verificou-se que a #2 e #3 têm em comum uma banda de hidrólise de alto peso molecular (com cerca de 130 kDa), diferente da #1.

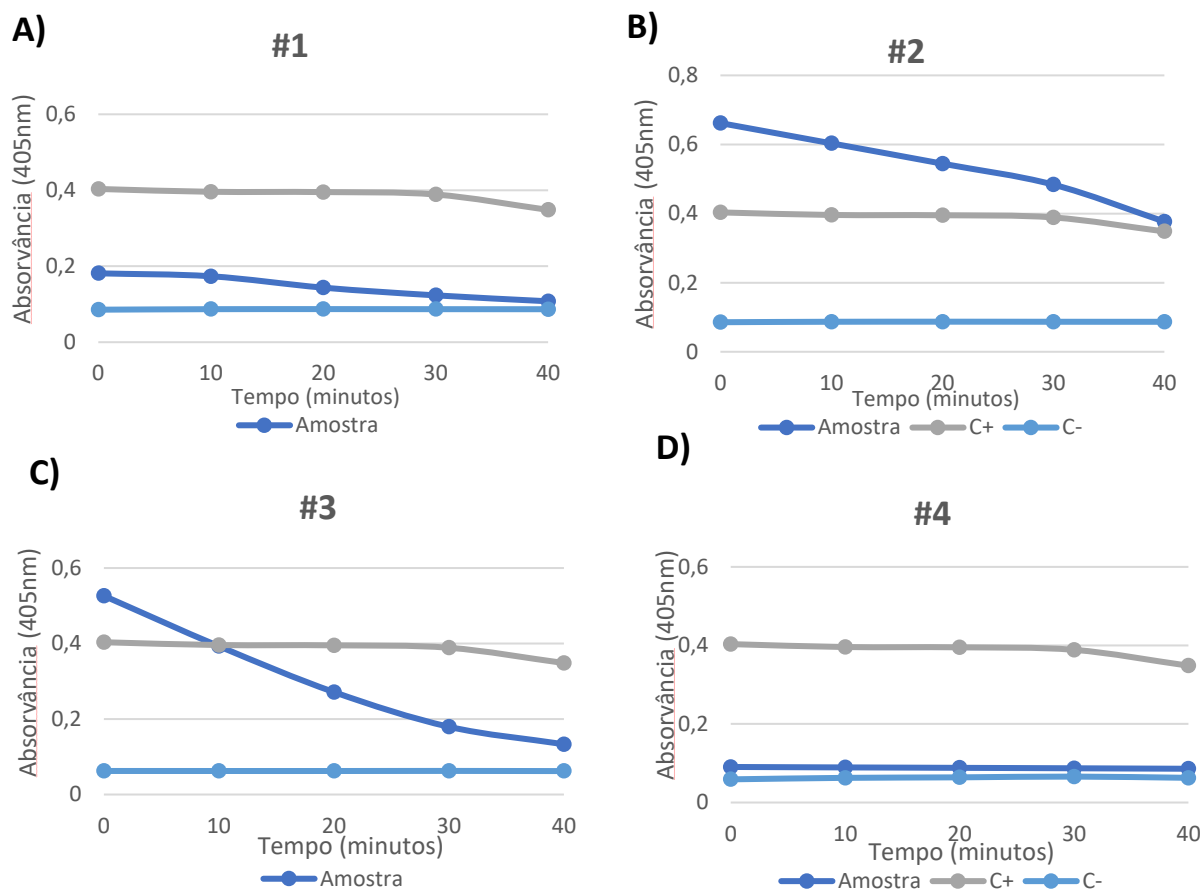


Gráfico 9 – Atividade fibrinogenolítica do veneno após fracionamento por troca iônica. #1, #2, #3 e #4 corresponde a cada uma das frações cromatográficas, respectivamente. C<sup>+</sup>, amostra com adição de trombina; C<sup>-</sup>, amostra sem adição de trombina.

## IV - DISCUSSÃO

A ocorrência da caravela portuguesa, *P. physalis*, representa uma ameaça para o bem-estar do Homem, uma vez que o seu veneno pode originar sintomas que podem ser ligeiros, como dor e inflamação no local da picada, ou sintomas mais severos, como alterações a nível da hemostasia e da coagulação (Batista, 2021; Cunha, 2022; Diaz-Garcia, 2012; Khan, 2018; Labadie, 2012; Munro, 2019). No presente trabalho estudou-se a atividade proteolítica do veneno de *P. physalis* e analisou-se a atividade do veneno sobre a coagulação.

A análise do veneno de *P. physalis* obtido por de 5 métodos diferentes de extração ( $V_h$ ,  $F_v$ ,  $F_s$ ,  $V_p$  e  $V_T$ ), permitiu perceber diferenças na atividade proteolítica. A amostra  $V_T$ , obtida por electroestimulação das células urticantes (Toubarro, 2023), apresentou atividade enzimática significativamente maior que as amostras de veneno obtidas por homogeneização mecânica do tentáculo ( $F_v$ ,  $F_s$ ,  $V_h$ ), apresentando também atividade específica (atividade/mg de proteína) muito superior. Esta maior atividade específica, deve-se certamente à extração do veneno contido nos cnidócitos com menor contaminação de proteínas estruturais do tentáculo.

Utilizando inibidores de protéase específicos, foi possível detetar uma composição enzimática distinta do veneno obtido com métodos diferentes. O veneno obtido por indução de células urticantes ( $V_T$ ) apresentou perda de atividade do tipo serino protéases, mais especificamente quando tratado com inibidores de tripsina e quimotripsina, diferente do veneno obtido por homogeneização do tentáculo ( $V_h$ ), que apresenta maior perda de atividade quando tratada com inibidores para metaloproteases. Utilizando substratos específicos confirmou-se a atividade do tipo quimotripsina e “thrombin-like” na amostra  $V_h$  e atividade do tipo serino protéase na amostra  $V_T$ . Em outros Cnidárias, as metaloproteases e as serinos protéases são duas grandes famílias de enzimas responsáveis pelas alterações da hemostasia provocadas pelo veneno (Batista, 2021; Cunha, 2022; Khan, 2018; Labadie, 2012). Estudos realizados com a *Nemopilema nomurai*, demonstraram que as metaloproteases e as serinos protéases (Bae, 2017), do tipo tripsina e quimotripsina, são responsáveis por parte da

toxicidade a nível da coagulação sanguínea, desencadeando ações fibrinolíticas, agregação plaquetária, edema e alterações da hemostasia (Choudhary, 2019; Heo, 2016). Enzimas do tipo quimotripsinas são responsáveis pela digestão de proteínas da coagulação no veneno da espécie *Rhopilema nomádica* e são capazes de digerir o coágulo de fibrina (Heo, 2016). Estudos com a *Carybdea marsupialis* revelam que a inibição de enzimas do tipo tripsina e quimotripsina reduzem a atividade hemolítica do veneno em 30% e 70%, respetivamente (Rottini, 1995). A utilização de antídotos para estas enzimas é vista como um tratamento para picadas de Cnidária (Feng, 2010).

Os ensaios de atividade enzimática mostraram, pela primeira vez, que o veneno de *P. physalis* obtido por indução dos cnidócitos tem capacidade de hidrolisar o coágulo de fibrina. A amostra  $V_T$  apresentou também capacidade de digerir o fibrinogénio, impedindo a formação do coágulo, mesmo após a adição de trombina. Esta atividade foi confirmada por SDS-PAGE, observando-se a digestão completa das três cadeias polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , de fibrinogénio. Estudos realizados com a *Nemopilema nomurai* também reportaram que o veneno apresenta enzimas capazes de degradar um coágulo de fibrina (Bae, 2017), sendo estas uma das principais responsáveis pela causa de sintomas tais como a hemorragia (Li, 2022). Neste veneno, o efeito hemolítico e hemorrágico foi atribuído à presença de metaloproteases (Li, 2022). Em *P. physalis* têm sido reportados cenários hemorrágicos no local da lesão (Batista, 2021; Labadie, 2012; Rodrigues, 2020; Tamkun, 1981) (Mariottini, 2014; Tamkun, 1981). O presente trabalho, reporta pela primeira vez a relação entre as enzimas presentes no veneno, nomeadamente serinos e metaloproteases, e alterações da coagulação.

Surpreendentemente, ao contrário do que foi observado na amostra  $V_T$ , a amostra  $V_h$ , quando adicionada ao fibrinogénio hidrolisa as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogénio, produzindo resíduos de fibrina com aproximadamente 23kDa. As fibrilas obtidas pela digestão do  $V_h$ , formam um coágulo de fibrina que se forma em poucos segundos, tal como acontece com a trombina. Este resultado, indica que o veneno de *P. physalis* obtido por homogeneização produz péptidos de fibrina com tamanho muito semelhante e características ao das fibrilas obtidas por digestão com trombina (Valenta, 2022). Embora este ensaio não permita, por si só, comprovar o mecanismo de polimerização

para formação do coágulo, pode-se dizer que a amostra  $V_h$  tem uma atividade “thrombin-like”.

As serino protéases “thrombin-like” identificadas no veneno de diversos organismos têm sido descritas como responsáveis por diversas alterações fisiológicas na vítima, tais como a indução da agregação plaquetária e coágulos que podem desencadear processos hemorrágicos (Valenta, 2022; Weston, 2013). Estas enzimas “thrombin-like” identificadas em venenos podem ser zinco-metaloproteases, que hidrolisam preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogénio, ou serinos protéases, com uma maior atividade específica para a cadeia  $\beta$  do fibrinogénio (Valenta, 2022). Na amostra  $V_h$  obtida neste trabalho, observou-se a hidrólise simultânea de ambas as cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogénio. Os ensaios de fibrinogenólise, com plasma humano, comprovaram a atividade “thrombin-like” da amostra  $V_h$ . De salientar, o tempo de lise de euglobulina do coágulo induzido pela amostra  $V_h$  não foi alterando significativamente em comparação com o coágulo induzido com  $Ca^{+}$ , o que pode indicar que o  $V_h$  não altera na cascata de fibrinólise do coágulo. O sangue tratado com o veneno de *P. physalis* não apresentou quaisquer sinais de hemólise.

O fracionamento da amostra  $V_h$  por cromatografia permitiu aprofundar a sua composição enzimática e a atividade sobre o coágulo. As frações cromatográficas #2 e #3 da cromatografia apresentaram uma atividade pro-coagulante, com a formação de um coágulo mesmo sem adição de trombina, tal como observado no veneno  $V_h$  total. Surpreendentemente, nas frações cromatográficas #1 e #4 observou-se atividade fibrinolítica, com hidrólise do coágulo, indicando a coexistência de enzimas com atividade pro-coagulante e atividade fibrinolítica na mesma amostra. Weston e os seus colaboradores reportaram a coexistência no veneno de outras Cnidárias, que possuem enzimas do tipo serino protéase tanto com atividade fibrinolítica como com atividade fibrinogenolítica “pró-coagulante” (Weston, 2013).

## V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No geral, este trabalho destaca a presença de serinos protéases e metaloproteases no veneno de *P. physalis* e suas implicações na coagulação sanguínea, que tanto quanto sabemos após pesquisa bibliográfica, são reportadas pela primeira vez. As enzimas presentes no veneno libertado pelas células urticantes diferem das do veneno obtido por homogeneização do tentáculo. O veneno libertado pelos Cnidócitos tem uma atividade predominantemente fibrinolítica. O fracionamento da amostra de veneno extraído dos tecidos revelou uma composição enzimática mais complexa, com frações apresentando tanto atividades pró-coagulantes quanto fibrinolíticas. Estas atividades podem estar diretamente relacionadas com os distúrbios na hemostasia, como alterações na coagulação sanguínea e hemorragias, observados nas vítimas de envenenamento com *P. physalis* uma vez que, noutros Cnidários, atividades do tipo serino e metaloproteases têm sido associadas a quadros clínicos de hemorragias, trombozes e desregulação na coagulação sanguínea.

A descoberta destas atividades proteolíticas no veneno de *P. physalis*, pode ser importante para o desenvolvimento de novos antídotos e aplicações biotecnológicas. Atualmente, não existem antídotos eficazes para *P. physalis*, e a identificação dessas enzimas abre a possibilidade de criar tratamentos direcionados para mitigar os sintomas graves das picadas. Além disso, a caracterização das atividades fibrinolíticas e pró-coagulantes dessas enzimas sugere um potencial significativo para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças de coagulação. Nomeadamente, para condições como trombose, hemofilia e outras desordens hemostáticas, ampliando o arsenal terapêutico disponível na medicina moderna.

No entanto, é crucial identificar as proteínas responsáveis por essa atividade em futuras pesquisas e prosseguir com testes de coagulação para avaliar a viabilidade no desenvolvimento de agentes farmacológicos com atividade coagulante, bem como antídotos para o veneno de *P. physalis*.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bae, S. K., Lee, H., Heo, Y., Pyo, M. J., Choudhary, I., Han, C. H., . . . Kim, E. (2017). In vitro characterization of jellyfish venom fibrin(ogen)olytic enzymes from *Nemopilema nomurai*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 35.  
doi:10.1186/s40409-017-0125-8
- Bajwa, S. S., Markland, F. S., & Russell, F. E. (1980). Fibrinolytic enzyme(s) in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon*, 18(3), 285-290.  
doi:10.1016/0041-0101(80)90007-0
- Barzkar, N., Khan, Z., Tamadoni Jahromi, S., Pourmozaffar, S., Gozari, M., & Nahavandi, R. (2021). A critical review on marine serine protease and its inhibitors: A new wave of drugs? *Int J Biol Macromol*, 170, 674-687.  
doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.134
- Batista, A. S. M. (2021). *O veneno da Physalia physalis*. Universidade de Coimbra,
- Bloom, D. A., Burnett, J. W., & Alderslade, P. (1998). Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. *Toxicon*, 36(8), 1075-1085. doi:10.1016/s0041-0101(98)00096-8
- Burnett, J. W., & Calton, G. J. (1987). Venomous pelagic coelenterates: chemistry, toxicology, immunology and treatment of their stings. *Toxicon*, 25(6), 581-602.  
doi:10.1016/0041-0101(87)90105-x
- Carrette, T., & Seymour, J. (2004). A rapid and repeatable method for venom extraction from cubozoan nematocysts. *Toxicon*, 44(2), 135-139.  
doi:10.1016/j.toxicon.2004.04.008
- Chakrabarty, D., Datta, K., Gomes, A., & Bhattacharyya, D. (2000). Haemorrhagic protein of Russell's viper venom with fibrinolytic and esterolytic activities. *Toxicon*, 38(11), 1475-1490. doi:10.1016/s0041-0101(99)00243-3
- Chakrabarty, D., & Rastogi, A. (2015). Hemotoxic Activity of Jellyfish Venom. In P. Gopalakrishnakone, A. Faiz, R. Fernando, C. A. Gnanathanan, A. G. Habib, & C.-C. Yang (Eds.), *Clinical Toxinology in Asia Pacific and Africa* (pp. 539-552). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Chang, J., Musser, J. H., & McGregor, H. (1987). Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology*, 36(15), 2429-2436.  
doi:[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90512-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90512-0)
- Choudhary, I., Hwang, D. H., Lee, H., Yoon, W. D., Chae, J., Han, C. H., . . . Kim, E. (2019). Proteomic Analysis of Novel Components of *Nemopilema nomurai* Jellyfish Venom: Deciphering the Mode of Action. *Toxins (Basel)*, 11(3).  
doi:10.3390/toxins11030153
- Copley, A. L., Niewiarowski, S., & Marechal, J. (1959). A micromethod of euglobulin fibrinolysis in plasma of human subjects and small laboratory animals. *J Lab Clin Med*, 53(3), 468-473.

- Cunha, S. A., & Dinis-Oliveira, R. J. (2022). Raising Awareness on the Clinical and Forensic Aspects of Jellyfish Stings: A Worldwide Increasing Threat. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), 8430. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/14/8430>
- D'Ambra, I., & Lauritano, C. (2020). A Review of Toxins from Cnidaria. *Mar Drugs*, 18(10). doi:10.3390/md18100507
- Diaz-Garcia, C. M., Fuentes-Silva, D., Sanchez-Soto, C., Domínguez-Pérez, D., García-Delgado, N., Varela, C., . . . Hiriart, M. (2012). Toxins from *Physalia physalis* (Cnidaria) raise the intracellular Ca<sup>2+</sup> of beta-cells and promote insulin secretion. *Curr Med Chem*, 19(31), 5414-5423. doi:10.2174/092986712803833308
- Endean, R., & Henderson, L. (1969). Further studies of toxic material from nematocysts of the cubomedusan *Chironex fleckeri* Southcott. *Toxicon*, 7(4), 303-314. doi:10.1016/0041-0101(69)90030-0
- Feng, J., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., & Li, P. (2010). Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocyst venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *Toxicol In Vitro*, 24(6), 1750-1756. doi:10.1016/j.tiv.2010.02.010
- Headlam, J. L., Lyons, K., Kenny, J., Lenihan, E. S., Quigley, D. T. G., Helps, W., . . . Doyle, T. K. (2020). Insights on the origin and drift trajectories of Portuguese man of war (*Physalia physalis*) over the Celtic Sea shelf area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 246, 107033. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.107033>
- Heo, Y., Kwon, Y. C., Bae, S. K., Hwang, D., Yang, H. R., Choudhary, I., . . . Kim, E. (2016). Cloning a Chymotrypsin-Like 1 (CTRL-1) Protease cDNA from the Jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Toxins*, 8(7), 205. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/7/205>
- Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., & Fry, B. G. (2015). Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins (Basel)*, 7(6), 2251-2271. doi:10.3390/toxins7062251
- Khan, S., Gul, A., Noreen, R., Ahmed, S., Ashraf, M., Awan, M. S. B., . . . Khan, N. (2018). Potential Applications of Venom Peptides as Anti-Thrombotic Agents for Management of Arterial and Deep-Vein Thrombosis. *Protein Pept Lett*, 25(7), 677-687. doi:10.2174/0929866524666180614100101
- Labadie, M., Aldabe, B., Ong, N., Joncquiart-Latarjet, A., Groult, V., Poulard, A., . . . de Haro, L. (2012). Portuguese man-of-war (*Physalia physalis*) envenomation on the Aquitaine Coast of France: An emerging health risk. *Clinical Toxicology*, 50(7), 567-570. doi:10.3109/15563650.2012.707657
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:10.1038/227680a0

- Li, A., Yu, H., Li, R., Yue, Y., Yu, C., Geng, H., . . . Li, P. (2022). Jellyfish *Nemopilema nomurai* causes myotoxicity through the metalloprotease component of venom. *Biomed Pharmacother*, *151*, 113192. doi:10.1016/j.biopha.2022.113192
- Lomonte, B., Pla, D., Sasa, M., Tsai, W. C., Solórzano, A., Ureña-Díaz, J. M., . . . Calvete, J. J. (2014). Two color morphs of the pelagic yellow-bellied sea snake, *Pelamis platura*, from different locations of Costa Rica: snake venomomics, toxicity, and neutralization by antivenom. *J Proteomics*, *103*, 137-152. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.034
- Mariottini, G. L. (2014). Hemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish - an overview. *J Venom Res*, *5*, 22-32.
- Montgomery, L., Seys, J., & Mees, J. (2016). To Pee, or Not to Pee: A Review on Envenomation and Treatment in European Jellyfish Species. *Mar Drugs*, *14*(7). doi:10.3390/md14070127
- Munro, C., Vue, Z., Behringer, R. R., & Dunn, C. W. (2019). Morphology and development of the Portuguese man of war, *Physalia physalis*. *Scientific Reports*, *9*(1), 15522. doi:10.1038/s41598-019-51842-1
- Neeman, I., Calton, G. J., & Burnett, J. W. (1980). Purification and characterization of the endonuclease present in *Physalia physalis* venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *67*(1), 155-158. doi:[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90286-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90286-2)
- Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A. H., Fenner, P. J., & Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *139*(4), 731-735. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>
- Piontek, M., Seymour, J. E., Wong, Y., Gilstrom, T., Potriquet, J., Jennings, E., . . . Miles, J. J. (2020). The pathology of *Chironex fleckeri* venom and known biological mechanisms. *Toxicon: X*, *6*, 100026. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100026>
- Podobnik, M., & Anderluh, G. (2017). Pore-forming toxins in Cnidaria. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *72*, 133-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.026>
- Pongprayoon, U., Bohlin, L., & Wasuwat, S. (1991). Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *J Ethnopharmacol*, *35*(1), 65-69. doi:10.1016/0378-8741(91)90133-x
- Rastogi, A., Biswas, S., Sarkar, A., & Chakrabarty, D. (2012). Anticoagulant activity of Moon jellyfish (*Aurelia aurita*) tentacle extract. *Toxicon*, *60*(5), 719-723. doi:10.1016/j.toxicon.2012.05.008
- Rodrigues, T., Domínguez-Pérez, D., Almeida, D., Matos, A., & Antunes, A. (2020). Medusozoans reported in Portugal and its ecological and economical relevance.

- Regional Studies in Marine Science*, 35, 101230.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101230>
- Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., & Patriarca, P. (1995). Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon*, 33(3), 315-326. doi:[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00174-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00174-7)
- Stillway, L. W., & Lane, C. E. (1971). Phospholipase in the nematocyst toxin of *Physalia physalis*. *Toxicon*, 9(3), 193-195. doi:10.1016/0041-0101(71)90068-7
- Tamkun, M. M., & Hessinger, D. A. (1981). Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. *Biochim Biophys Acta*, 667(1), 87-98. doi:10.1016/0005-2795(81)90069-6
- Tibballs, J., Yanagihara, A. A., Turner, H. C., & Winkel, K. (2011). Immunological and toxinological responses to jellyfish stings. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 10(5), 438-446. doi:10.2174/187152811797200650
- Toubarro, D., Tomkielska, Z., Silva, L., Borges, M., & Simões, N. (2023). A Study of Nematocyst Discharge of *Physalia physalis* and Venom Composition. *Biology and Life Sciences Forum*, 24(1), 2. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2673-9976/24/1/2>
- Valenta, J., Hlavackova, A., Stach, Z., Stikarova, J., Havlicek, M., & Michalek, P. (2022). Fibrinogenolysis in Venom-Induced Consumption Coagulopathy after Viperidae Snakebites: A Pilot Study. *Toxins (Basel)*, 14(8). doi:10.3390/toxins14080538
- Wang, W. J., Shih, C. H., & Huang, T. F. (2004). A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1), 224-230. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.031
- Werb, Z., Banda, M. J., McKerrow, J. H., & Sandhaus, R. A. (1982). Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol*, 79 Suppl 1, 154s-159s. doi:10.1111/1523-1747.ep12546056
- Weston, A. J., Chung, R., Dunlap, W. C., Morandini, A. C., Marques, A. C., Moura-da-Silva, A. M., . . . Long, P. F. (2013). Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*. *Toxicon*, 71, 11-17. doi:10.1016/j.toxicon.2013.05.002
- Yap, W. Y., & Hwang, J. S. (2018). Response of Cellular Innate Immunity to Cnidarian Pore-Forming Toxins.

## VII - ANEXOS

### Anexo 1 – Atividade do veneno sobre o coágulo de fibrina

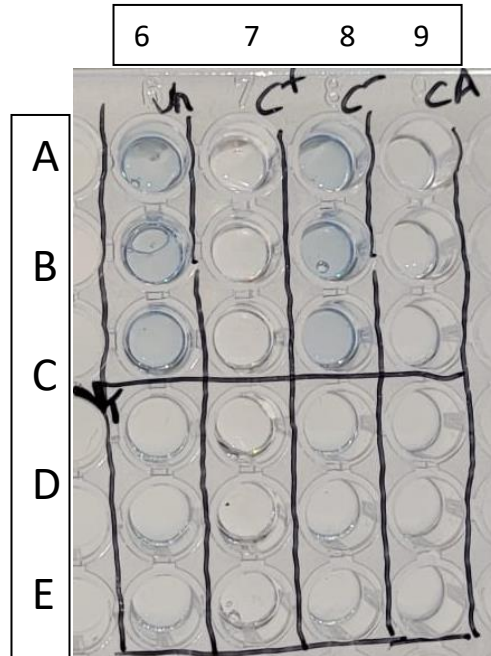


Figura 1 - Ensaio de atividade fibrinogenolítica em amostra de veneno de *P. physalis* obtido por homogeneização ( $V_h$ ) coluna 6 da linha A a C e por indução de células urticantes ( $V_t$ ) coluna 6 da linha D a F. Realizou-se uma incubação prévia: de fibrinogénio sem adição da amostra - controlo sem amostra ( $C^+$ ) coluna 7 da linha A a F; fibrinogénio com amostra e sem adição de trombina posteriormente- controlo sem trombina ( $C$ ) coluna 8 da linha A a C; um controlo da amostra com uma incubação prévia para cada amostra sem fibrinogénio ( $CA$ ) coluna 9 da linha A a C para  $V_h$  e coluna 9 da linha D a F para  $V_t$ .

## Anexo 2 - Atividade do veneno sobre o coágulo plasmático

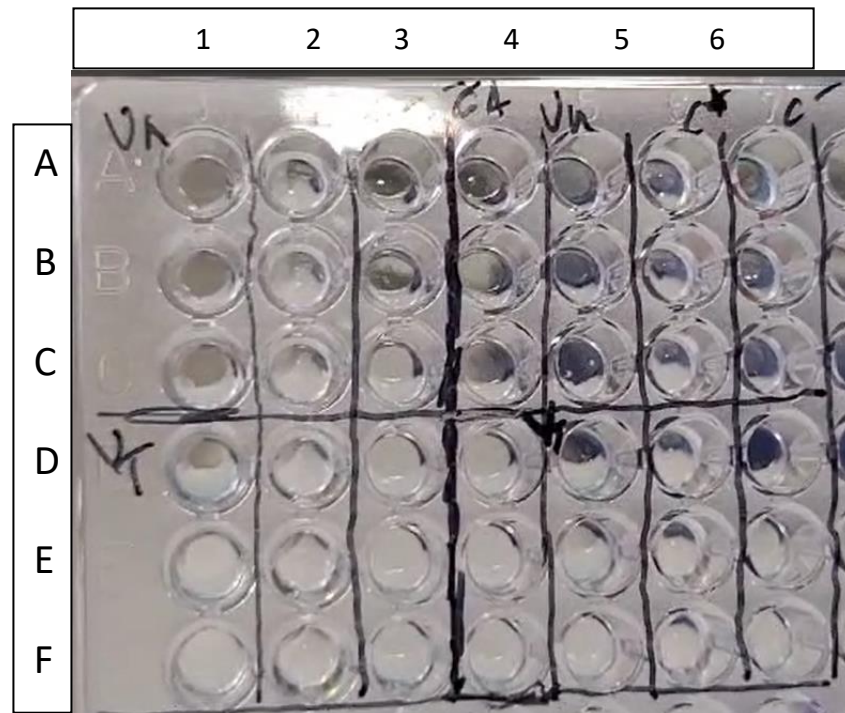


Figura 2– Ensaio de euglobulina em amostra de veneno de *P. physalis*. Utilizou-se dois tipos de plasmas (Plasma A e Plasma B) em ambas as amostras extraídas por homogeneização  $V_h$  e por indução de células urticantes  $V_T$ . Realizou-se uma incubação prévia: solução de euglobulina sem amostra - ( $C^+$ ); solução de euglobulina e amostra - ( $C^-$ ); incubação da amostra sem solução de euglobulina –  $CA$ , os valores de  $CA$  foram subtraídos aos valores de cada uma das amostras. Amostra  $V_h$  – coluna 1 e 5 das linhas A a C; Amostra  $V_T$  – coluna 1 e 5 das linhas D a F;  $C^+$  - coluna 2 e 6 das linhas A a F;  $C^-$  - colunas 3 e 7 das linhas A a C controlo sem euglobulina com incubação da amostra  $V_h$ , colunas 3 e 7 das linhas D a F controlo sem euglobulina com incubação da amostra  $V_T$ ;  $CA$  – coluna 4 da linha A a C controlo da amostra  $V_h$ , coluna 4 da linha D a F controlo da amostra  $V_T$ . Nas colunas 1,2 e 3 adicionou-se solução de euglobulina realizada com Plasma A e nas colunas 5, 6 e 7 solução de euglobulina com Plasma B em ambas as amostras  $V_h$  e  $V_T$ .



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

Rua da Mãe de Deus  
9500-321 Ponta Delgada  
Açores, Portugal



[2025]

**DM**

# Estudo da Ação do Veneno da *Physalis physalis*

Margarida Botelho Borges