

IAMC-CNR UOS di Capo Granitola



Tecniche di campionamento di sostanze bioattive da aculei di *Scorpaena porcus*.

Savoca D.^c, Bennici C.^a, Arculeo M.^c, Salamone M.^b, Masullo T.^a, Biondo G.^a, Di Natale M.V.^a, Mazzola S.^d, Cuttitta A.^a

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

b - ABIEL s.r.l., Via del Mare 3 - 91021 Campobello di Mazara (TP)

c - Università degli studi di Palermo- Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Viale delle Scienze, Ed. 16 - 90128 PALERMO (PA)

d- Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

Sommario

1-Introduzione.....	pag.3
1.1-Veleno e farmaco.....	pag.3
1.2-Attività del veleno e sistemi coinvolti.....	pag.4
1.3-Evoluzione dei sistemi veleniferi dei pesci.....	pag.7
2-Gli scorfani.....	pag.10
2.1-Sistematica e caratteri condivisi.....	pag.10
2.2-Specie del Mediterraneo.....	pag.11
2.3-Lo scorfano nero.....	pag.13
3-Materiali e metodi.....	pag.15
3.1-Approvvigionamento degli animali.....	pag.15
3.2-Acquisizione dati biometrici e riconoscimento.....	pag.16
3.3-Estrazione del composto grezzo.....	pag.17
3.3.1-Metodo di estrazione per aspirazione.....	pag.18
3.3.2-Metodo di estrazione dell'intero apparato velenifero.....	pag.20
4-Tecniche di conservazione dell'estratto.....	pag.22
4.1-Liofilizzazione.....	pag.23
4.2-Crioconservazione.....	pag.24
5-Discussione.....	pag.25
6-Bibliografia.....	pag.26

Introduzione

1.1 Veleno e farmaco

Sostanza tossica o veleno: “Tutte le sostanze sono dei veleni; non ne esiste una che non sia un veleno, la giusta dose differenzia un veleno da un rimedio” Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim detto Paracelsus o Paracelso (1493-1541). La tossicità è funzione della concentrazione (Majewski H., 2009). Una tossina in un contesto scientifico è una sostanza biologicamente prodotta che provoca effetti dannosi alla salute di un organismo vivente (Williamson J.A. et al., 1996).

Risulta molto difficile dare una definizione esatta di veleno e questo perché fin dalla nascita della farmacologia si è sempre considerato ogni veleno un potenziale farmaco ed ogni farmaco un potenziale veleno. D'altra parte gli antichi avevano già focalizzato la difficoltà insita in una definizione del concetto farmaco-veleno e infatti definivano “venenum bonum” la sostanza che per dosi e modalità di somministrazione aveva effetto medicamentoso e “venenum malum” quella che invece provocava la morte.

I greci nel periodo omerico (1000 a.C.) con il nome “farmaco” indicavano sia un veleno che un medicamento. Anche Ovidio, a distanza di tempo, ripeteva ai suoi allievi “nulla è così buono che in eccesso non possa nuocere”. Questo concetto sarà ripreso da Ippocrate (460-370 a.C), padre della medicina. Molto più tardi Paracelso disse: “dosis sola facet ut venenum non fit”, affermazione che ancora oggi è uno dei capisaldi della tossicologia moderna, anche se oggi sappiamo che alcuni effetti tossici non dipendono dalla dose (Capasso F. et al., 2007).

Parlando di veleno non è possibile raggiungere una soddisfacente e onnicomprensiva definizione.

Vari autori hanno tentato di spiegare in modi diversi il concetto di veleno senza peraltro riuscire a fornire parametri assoluti e definitivi.

Secondo alcune scuole si definisce come veleno “ogni sostanza che introdotta nell'organismo cagiona malattia (eventualmente anche la morte) con meccanismo chimico o biochimico”.

Altre scuole definiscono come veleno tutte quelle sostanze organiche e inorganiche, vegetali o animali, estrattive o sintetiche, di struttura molecolare semplice o complessa, solubili o atte a divenire tali una volta assunte, che immesse nell'organismo in quantità relativamente piccole, siano in grado di determinare uno stato morboso di varia durata o entità che può condurre anche a morte a causa delle reazioni chimiche e biochimiche sull'organismo vivente (Bertol E., 2011).

1.2 Attività del veleno e sistemi coinvolti

Come dimostrato in letteratura dalla pletora di possibili sintomi in un singolo evento di avvelenamento, il veleno dei pesci conduce un attacco su diversi livelli del sistema dei vertebrati. Gli studi hanno dimostrato infatti che i target molecolari del veleno, colpendo le funzioni vitali degli organismi, coinvolgono una varietà di sistemi e processi fisiologici al fine di scoraggiare e dissuadere i potenziali predatori (Ziegman R. and Alewood P., 2015; Kirti, et al., 2013).

Morti per avvelenamenti causati dai pesci sono stati attribuiti agli effetti cardiovascolari, come ipotensione grave e cardiaca o insufficienza respiratoria (Borondo J. C. et al., 2001; Low K.S. et al., 1993; Skeie E., 1962). Inoltre in tutta la letteratura sono stati descritti diversi sintomi cardiovascolari comuni in risposta all'avvelenamento causato dalle spine velenose dei pesci (Church J.E. and Hodgson W.C., 2000; Church J.E. and Hodgson W.C., 2001; Church J.E., Hodgson W.C., 2002; Carlson R.W. et al., 1971).

Questi includono cambiamenti della pressione sanguigna e rilassamento della muscolatura liscia endotelio dipendente, così come effetti inotropi e cronotropi. In condizioni sperimentali i veleni dei pesci hanno suscitato diverse risposte, spesso multi-fasiche, della pressione sanguigna (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

Ciò ha portato gran parte della ricerca a concentrarsi su questo settore osservando la cardiotoxicità dei veleni soprattutto nella fase iniziale.

Ad esempio a seguito all'introduzione (tramite flebo, nelle vene femorali e nella carotide) dei veleni delle trachine *Trachinus draco* e *Trachinus vipera*, in 5 gatti e un cane sono stati osservati diversi effetti sulla pressione arteriosa e venosa. Inoltre sono stati osservati diversi tipi di lesione ischemica e disturbi del ritmo di elettrocardiogrammi. Questi studi hanno inoltre osservato effetti anche noti sulla respirazione e sulle contrazioni del cuore in alcuni animali dopo la morte clinica (Russell F.E. and Emery J.A., 1960). Tale fenomeno è stato osservato anche nei conigli cui è stato iniettato del veleno di *Pterois volitans* (Saunders P.R. and Taylor P.B., 1959). Invece, l'iniezione del veleno di *T. draco* ha portato in alcuni topi ad una forte contrazione vascolare e necrosi ischemica. Inoltre, autopsie eseguite su animali uccisi dal veleno hanno rivelato un carico schiumoso nel sistema respiratorio e inoltre il ventricolo sinistro privo di sangue, mentre il lato destro del cuore era sempre pieno (Skeie E., 1962). Questo carico schiumoso rosa è stato anche osservato nel tratto respiratorio di alcuni gatti, cani, conigli e iniettati con dosi sub letali di veleno di *Scorpaena guttata* (scorfano di California) (Carlson R.W., 1973).

Per i pesci pietra invece è stato descritto che gli effetti pronunciati del veleno riguardano i sistemi cardiovascolari e neuromuscolari, con attività emolitiche e ialuronidasiche (Gwee M.C.E. et al.,

1994). Questo veleno che provoca un'azione letale associata ad una grave ipotensione si trova anche in possesso di enzimi quali colinesterasi, fosfatasi (acida e alcalina) e fosfodiesterasi (Kirti et al., 2013). Sintomi di avvelenamento come la paralisi, spasmi muscolari, e prolungata debolezza dimostrano chiaramente che i veleni dei pesci hanno come target non solo il sistema cardiovascolare, ma anche il sistema neuromuscolare. Sperimentalmente questi veleni hanno dimostrato di scatenare una serie di altre risposte, compresa la depolarizzazione delle cellule e contrazione muscolare.

I topi iniettati con il veleno di *P. volitans*, in condizioni sperimentali, hanno mostrato un marcato indebolimento dell'apparato scheletrico-muscolare e quindi dell'attività neuromuscolare (Ziegman R. and Alewood P., 2015). Sulla base delle convulsioni e paralisi osservate dall'esposizione al veleno di *S. argus*, è stato suggerito che il veleno è neurotossico (Sivan G. et al., 2007).

A differenza di *S. argus*, l'attività neurotossica è stata osservata da un componente parzialmente purificato del veleno di *A. thalassinus*. Questa attività neurotossica è stato dimostrato essere specifica per i recettori dell'acetilcolina, determinando un blocco del trasporto dei cationi monovalenti attraverso i canali dei recettori (Al-Hassan J.M. et al., 1987). Infine uno studio sul veleno delle razze d'acqua dolce *Plesiotrygon iwame* e *Potamotrygon motoro* ha dimostrato attività miotossica; infatti 24 ore dopo che i veleni erano stati iniettati nel topo è stata osservata un'inflammatione del sistema scheletrico-muscolare, così come necrosi coagulativa (Lameiras J.L. et al., 2014).

Diverse prove indicano che quasi tutti i veleni di pesce mostrano attività emolitica, tale attività è stata trovata anche nelle veleni di numerosi altri animali, tra cui serpenti, meduse, anemoni di mare, api, ragni e scorpioni. Oltre alla loro attività emolitica, i veleni dei pesci possiedono anche la capacità di lisare (attività litica) altri tipi di cellule (Ziegman R. and Alewood P., 2015). Inoltre, sembra probabile che le attività biologiche di qualsiasi tossina può essere fatta risalire all'attività citolitica posseduta (Church, J.E. and Hodgson W.C., 2002).

L'attività enzimatica è comune nei veleni animali, gli enzimi possono causare danni o possono funzionare come diffusori di fattori per le altre tossine. Inoltre è stato suggerito che nei veleni dei pesci gli enzimi proteolitici potrebbero essere parzialmente responsabili dell'estrema labilità delle altre componenti del veleno (Carrizo L. C. et al., 2005).

Il veleno di *S. verrucosa* possiede 10 diverse attività di peptidasi (Garnier P. et al, 1995). In uno studio sono stati confrontati degli estratti di tessuti delle spine velenifere dei raiformi *D. guttata* e *P. falkneri*, è stato visto che entrambi contengono enzimi proteolitici contro caseina, gelatina, e fibrinogeno, anche se i pesi molecolari degli enzimi differivano tra le due specie (Barbaro K.C. et al, 2007). Anche nel caso del veleno di *P. henlei*, sottoposto a SDS-PAGE, molte delle bande

risultanti hanno mostrato azione idrolitica contro gelatina (Monteiro-dos-Santos J., et al. 2011). Inoltre attività gelatinolitiche sono state trovate anche nel veleno di *P. iwamae* e in quello di *Thalassophryne nattereri* (Antoniazzi M.M. et al., 2011; Lopes-Ferreira M. et al., 2011).

Come per le specie appena citate, sono stati trovate proteasi attive contro la gelatina con metodi SDS-PAGE nei veleni di *N. robusta* e *P. volitans* (45kDa) (Hahn S.T. and O'Connor J.M., 2000; Balasubashini M.S. et al., 2006). Un esperimento simile zimografia ha dimostrato che il pesce gatto *A. maculatus* ha mostrato che i pesi molecolari delle sue componenti gelatinolitiche sono tra i 43 kDa e 97 kDa (Abirami P. et al., 2014). Alcune proteasi presenti nel mix del veleno di *Scorpaena plumieri* determinano l'idrolisi della caseina ed altre hanno una spiccata attività gelatinolitica. Questa proteasi altamente instabile è in genere indicata dall'acronimo Sp-GP (= *Scorpaena plumieri* Gelatinolytic Protease) (Carrijo L.C. et al., 2005).

I veleni dei pesci inoltre contengono un certo numero di enzimi diversi dalle proteasi. Ad esempio il veleno di *S. argus* possiede attività sia acida che alcalina della fosfatasi, così come l'attività della fosfodiesterasi (Sivan G. et al 2010).

Inoltre, è stata trovata una certa attività enzimatica nel veleno di *T. nattereri* in particolare di un enzima di conversione dell'angiotensina che contribuisce alla risposta infiammatoria del veleno (De Araújo Tenório et al., 2015).

Un altro componente molto comune nei veleni dei pesci è l'enzima ialuronidasi. Questo enzima facilita la distribuzione di componenti tossici, abbattendo selettivamente l'acido ialuronico, strutturalmente importante, intorno al sito avvelenamento. In linea con questo, l'attività delle ialuronidasi è stata trovata in molti diversi veleni di pesce. Questi includono i veleni del pesce pietra, pesce leone, tracine e razze (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

Dai veleni dei pesci sono stati isolati e caratterizzati diversi enzimi ialuronidasi. Uno di questi è stato isolato dal veleno di *S. horrida*, inoltre lo studio ha anche dimostrato sperimentalmente quale fosse il ruolo dell'enzima ossia quello di 'fattore di dispersione' (Poh C.H. et al., 1992). Questo enzima ha un peso molecolare di 59 kDa e un pH ottimale di 6.6 ed è stato visto che anche ialuronidasi di *P. volitans* e *P. antennata* avevano le stesse funzioni ed un alta omologia di sequenze con quelle del pesce pietra (Kiriake A. et al., 2014).

Sulla base di questa prova, è ragionevole teorizzare che l'omologia di ialuronidasi può essere spiegata in base alla relazione tassonomica delle specie ittiche da cui provengono.

Inoltre, come si potrebbe immaginare, ialuronidasi del veleno dei pesci sono più strettamente correlate tra loro rispetto a ialuronidasi di altri animali (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

Recentemente sono stati condotti alcuni studi sulla capacità dei veleni di pesce di modulare il sistema immunitario. Inizialmente macrofagi mediano l'infiammazione, consentendo sia plasticità

intrinseca della risposta immunitaria innata alla segnalazione ambientale sia la modulazione di immunità acquisita (Lima C. et al., 2014).

In un esperimento eseguito su topo ferito è stato inoculato il veleno di *Thalassophryne nattereri*, il veleno ha determinato la modulazione della cinetica dell'afflusso dei leucociti ed ha compromesso il transito dei neutrofili e la sopravvivenza dei macrofagi colpiti. Tale combinazione ha portato a una lenta fase di guarigione (Lima C. et al., 2014). Nattectina, una lectina di tipo C che si trova nel veleno di *T. nattereri*, ha permesso di portare ad una riprogrammazione dei macrofagi e l'induzione di altri tipi cellulari tipici della risposta immunitaria (Ishizuka E.K. et al., 2012).

Nel complesso, i dati acquisiti dagli esperimenti sulle risposte immunitarie del veleno di *T. nattereri* supportano il concetto stabilito che la generazione di tali cellule sono fondamentali per la protezione immunologica e ciò dimostra come l'uso di tossine del veleno possano essere utilizzati anche in questo campo come strumenti fisiologici (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

1.3 Evoluzione del veleno e dei sistemi veleniferi nei pesci

I sistemi veleniferi sono importanti innovazioni evolutive utilizzati per la competizione: deterrenza, difesa e predazione.

L'evoluzione del veleno è stato l'innescò per la radiazione evolutiva di molti ordini di animali, dando origine alla diversificazione dei sistemi di veleno e il loro rapporto complicato in relazione ai diversi sistemi ecologici (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

Questa evoluzione inoltre, nel caso delle diverse specie ittiche, ha permesso loro di adattarsi a stili di vita sedentari. Nell'ambiente in cui vivono essi spesso si mimetizzano tra le rocce e detriti sul fondo del mare e invece di fuggire dai predatori ad esempio erigono le loro spine velenose, quando le minacce percepite sono vicine. Sono rare eventuali eccezioni, ad esempio, in alto mare alcune specie del genere *Monognathus* hanno sviluppato una singolare zanna velenosa nella parte anteriore del cranio, che serve a disabilitare la preda.

Affinché il veleno possa costituire un deterrente efficace nei confronti dei predatori deve mostrare effetti deleteri su di essi; così gli organismi velenosi hanno evoluto tossine molto potenti capaci di agire contro i sistemi dei vertebrati come viene dimostrato da numerosi studi farmacologici che esaminano veleni e tossine di una grande varietà di specie di pesci (Smith D., 1999; Raju S., 1973).

Come ci si aspetterebbe i veleni, che si sono evoluti nelle diverse specie ittiche, hanno lo stesso scopo, in quanto presentano somiglianze nelle loro azioni farmacologiche. Nella maggior parte dei casi, una singola tossina di un veleno è responsabile di diversi sintomi (Church J.E., Hodgson W.C., 2002).

Recenti studi che esaminano la filogenesi e l'evoluzione del veleno dei pesci con le pinne raggiate (Actinopterygii) confermano che potrebbero superare le 2000 specie, il numero di organismi marini tossici o velenosi (Smith W.L. and Wheeler W.C., 2006) considerando che da poco sono state stimate più di 1600 specie di pesci gatto velenose. Includendo i Condroitti il numero di pesci velenosi aumenterebbe molto più. I pesci velenosi costituiscono più del 50% di tutti i vertebrati velenosi e il loro apparato velenifero è simile nelle diverse specie, nonostante la loro vasta gamma tassonomica (fig.1) (Smith W.L., Wheeler W.C., 2006).

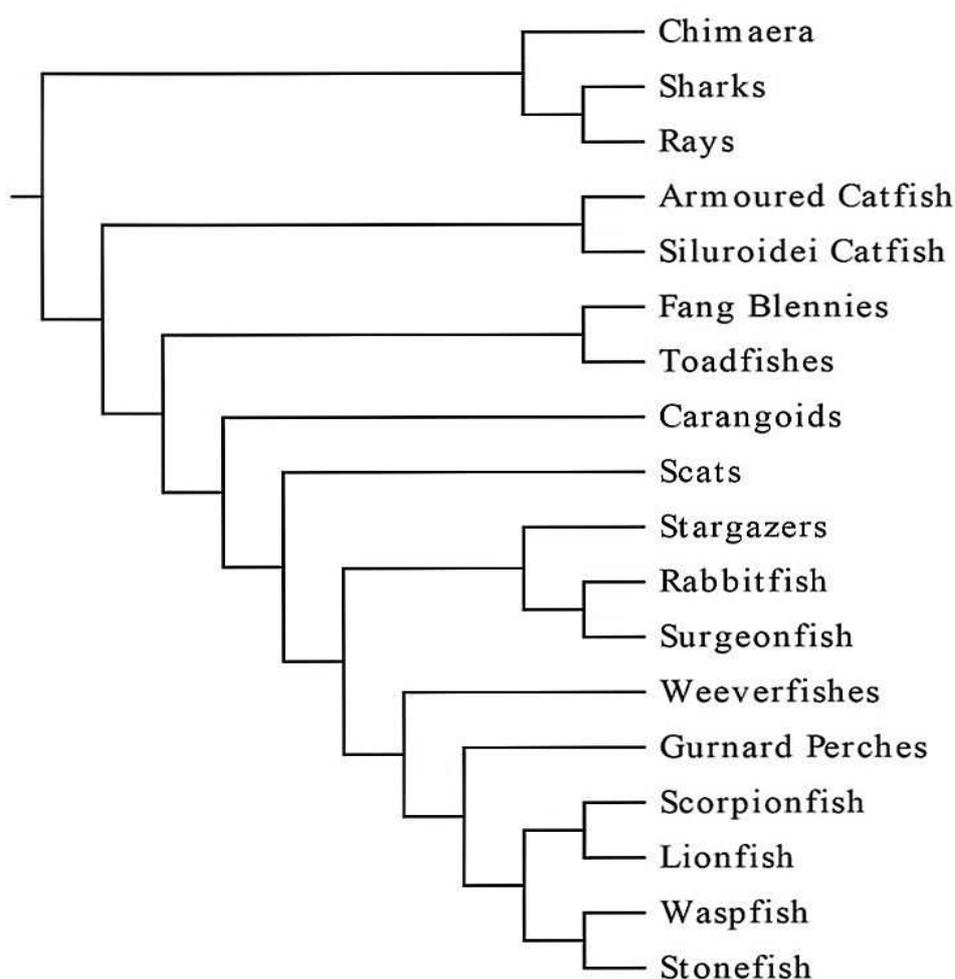


Figura 1 - Albero filogenetico che mostra i cladi di pesci velenosi conosciuti. Adattato da Smith e Wheeler (Smith W.L. and Wheeler W.C., 2006) e Wright (Wright J.J., 2009) per autore e assemblati con EvolView (Zhang H. et al., 2012).

L'apparato velenifero si è evoluto nel tempo e differenziato 11 volte negli Acantomorfi moderni e due volte nei pesci gatto, con specie velenose rappresentanti di almeno quattro diversi ordini di

teleostei (Wright J.J., 2009; Smith W.L. and Wheeler W.C., 2006). L'apparato velenifero dei pesci consiste tipicamente di ghiandole velenifere situate in scanalature antero-laterali accoppiate su ciascun lato dalle spine acuminatae. Il complesso delle spine velenifere e delle ghiandole del veleno è coperto da una guaina tegumentaria.

Le spine velenose si trovano spesso in associazione con la pinna dorsale, ma sono comuni anche quelle pelviche, anali e pettorali (fig.2) (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

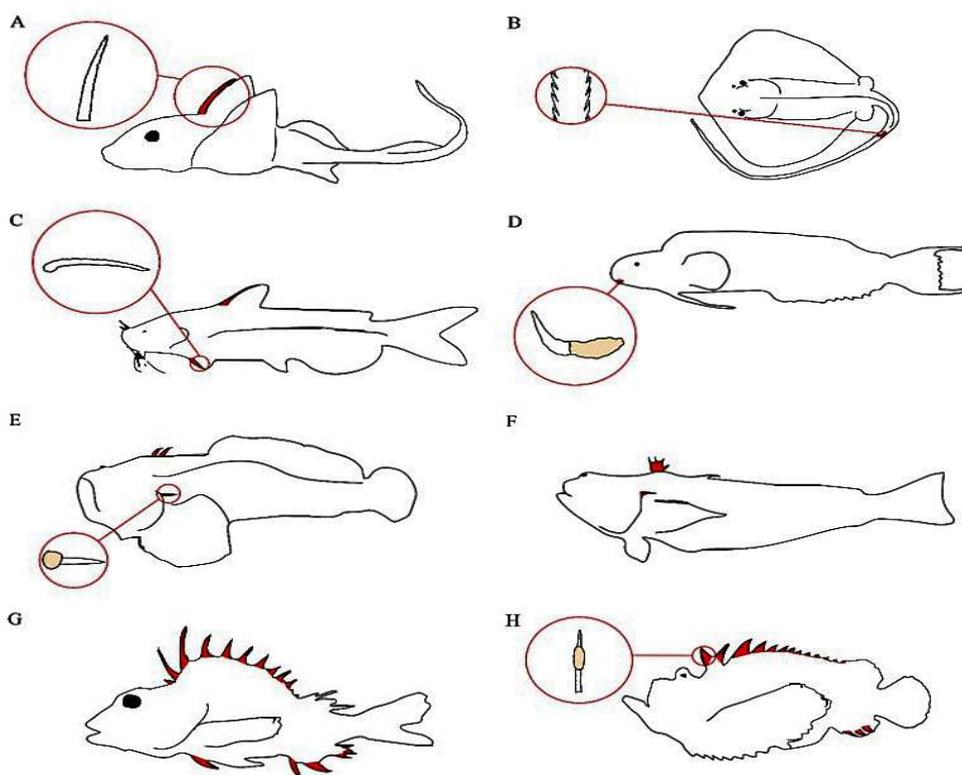


Figura 2 - Rappresentazione pesci velenosi: le aree colorate in rosso corrispondono alle spine velenose dei diversi tipi di apparato velenifero: (A) chimera; (B) trigone; (C) pesce gatto; (D) fang blenny (*Meiacanthus*) (Blenniidae); (E) toadfish (*Batrachoididae*); (F) tracina; (G) scorfano (*Gurnard Perch*) (*Scorpaeniformes*) (*Sebastidae*); (H) pesce pietra (Ziegman R. and Alewood P., 2015).

Alcuni esempi:

- I toadfishes, (*Batrachoididae*) della sottofamiglia *Thalassophryninae* posseggono l'apparato velenifero più sviluppato dei pesci, in cui la spina dorsale e quelle opercolari velenose si manifestano come tubi cavi che espellono tossine dalle ghiandole velenifere (Collette B.B., 1966).
- I *Meiacanthus*, fang blenny (*Blenniidae*), sono unici in quanto il loro apparato veleno

utilizza canini velenosi, anche se il tessuto ghiandolare buccale assomiglia al tessuto cutaneo ghiandolare di altre specie velenose (Fishelson L., 1974).

- Nei pesci pietra, stonefish (Synanceiidae), la ghiandola del veleno è la più sviluppata, nell'estremità distale vi è una struttura simile ad un dotto che giunge alla colonna vertebrale, il veleno percorre l'interno di tale dotto o scanalatura prima di essere espulso dalla spina (Endean R.A., 1961).

Si pensa che lo sviluppo dell'apparato velenifero di questi pesci si sia evoluto relativamente in misura minore rispetto ad altri gruppi animali, perché i pesci sono su un livello di sviluppo filogenetico più alto rispetto ad altri animali velenosi. Ad esempio nei ragni l'apparato velenifero appare molto più primitivo, basandosi su un'azione meccanica di espulsione volontaria, piuttosto che un'espulsione involontaria del veleno (Church J.E. and Hodgson W.C., 2002).

Le ghiandole velenifere dei pesci possono variare notevolmente in termini di dimensioni e morfologia cellulare, anche tra specie strettamente collegate. Tipicamente, le ghiandole sono costituite da grandi cellule circondate da cellule di supporto, che forniscono stabilità alla ghiandola e la collegano al tessuto circostante (Halstead B.W. et al., 1955). Inoltre, l'istologia spesso mostra la presenza di granuli citoplasmatici sulla superficie interna delle membrane cellulari ghiandolari (Portillo S.A. et al., 2014).

2 Gli scorfani

Gli scorfani appartengono all'ordine Scorpaeniformes e la maggior parte alla famiglia Scorpaenidae la quale comprende 26 Generi e 227 specie valide (Eschmeyer W.N. and Fong J. D., 2016).

Gli anglosassoni indicano genericamente gli scorpenidi e gli scorfani con il termine scorpionfishes, suddividendo il gruppo nelle due sottofamiglie Scorpaeninae e Pteroinae. Il primo gruppo comprende i "veri" scorpionfishes, il secondo comprende i pesci leone o lionfishes.

2.1 Sistematica e caratteri condivisi:

I membri della famiglia Scorpaenidae presentano aculei veleniferi, connessi ad una ghiandola del veleno, sulla pinna dorsale, anale e pelvica. Stanno di norma immobili, in attesa di prede cacciando all'agguato. Il corpo è compresso e la testa ha una forma caratteristica, spinosa e munita di appendici. Sono presenti in tutti i mari tropicali e temperati sono marini, rari in acqua dolce; alcuni mancano di vescica natatoria (Nelson J.S., 1994). La colorazione è variabile (fig.3).



Figura 3 - Esempio di variabilità cromatica in *S. porcus*, si osserva una pigmentazione arancione, riscontrabile su altri esemplari della stessa specie, ma non comune.

La disposizione corrente della famiglia Scorpaenidae segue Eschmeyer (1998) e comprende le sottofamiglie Scorpaeninae, Sebastobinae, e Pteroinae .

I membri di questa famiglia si riscontrano a tutte le profondità dalla riva fino a circa 2.200 m. La famiglia Scorpaenidae comprende i pesci più velenosi del mondo, molti dei quali dai colori vivaci (Nelson, J.S., 1994).

Il primo reperto fossile risale al Paleocene inferiore nel Terziario (Berg L.S., 1958).

2.2 Specie del Mediterraneo

Nel libro “Atlante dei pesci dei mari italiani”, si parla di otto specie di scorfani diversi (Costa F., 2004). Le stesse specie sono citate in “Pesci del Mediterraneo”, dove però non si accenna a *Scorpaena mederensis*, al suo posto si parla dello scorfano corallino, trovato solo in Sicilia a grandi profondità (Gargiullo S. and Gargiullo C., 2006). Infine nel libro “The Mediterranean Sea: Its history and present challenges” vengono citate 11 specie di scorfano (10 della famiglia Scorpaenidae e 1 e della famiglia Sebastidae) (Goffredo S. and Dubinsky Z., 2014).

Considerando diversi altri libri e pubblicazioni si ipotizza che nel mediterraneo le specie appartenenti all'ordine Scorpaeniformes siano circa 13:

1. *Scorpaena stephanica*: muso uguale al diametro dell'occhio o leggermente più lungo. Pinne pettorali grandi e rotonde, con alcuni raggi ramificati. Rosso, brunastro dorsalmente. Una larga macchia nera tra la settima e la decima spina della pinna dorsale. Pinne con macchie scure (Alluè R. et al., 1981).

2. *Scorpaena azorica*: dimensioni massime 9,8 cm. Specie classificata come rara (Menezes et al.2006). Testa grande, muso più corto del diametro oculare, tutte le pinne sono macchiate di

marrone; alcune macchie marroni sulla testa (Eschmeyer W. N., 1969; Galil B. et al., 2011).

3. *Pontinus kuhlii*: scorfano d'altura o scorfano corallino. Fino a 52cm. Due raggi allungati nella parte anteriore della dorsale. Colorazione rossastra, piuttosto uniforme. Non presenta appendici sulla mascella inferiore.

4. *Scorpaenodes arenai*: scorfano di Messina. Lunghezza fino a 12 cm. Estremamente raro, è conosciuto solo attraverso pochi esemplari pescati nello Stretto di Messina. La pinna dorsale ha 13 spine.

5. *Scorpaena elongata*: scorfano rosa. Dimensioni massime 50 cm. Testa allungata e scura, corpo rosa. Appendici cutanee ai lati della mascella.

6. *Scorpaena scrofa*: scorfano rosso. Dimensioni fino a 50 cm. Numerose piccole appendici sotto la mascella inferiore. Colorazione estremamente variabile, assai chiazzata, ma tendenzialmente rossa.

7. *Scorpaena maderensis*: scorfano di Madeira o scorfano squamoso. Lunghezza fino a 14cm. Colorazione più "a fasce" rispetto ad altre specie. Manca fossetta occipitale, caratteristica unica fra gli scorfani.

8. *Scorpaena notata*: scorfano. Dimensioni fino a 24 cm. Senza appendici sul mento. Colorazione generalmente rossa intensa. Macchia nera al centro della dorsale. Quest'ultima può comparire più sbiadita anche in *Scorpaena scrofa*, la quale però presenta delle piccole appendici sotto la mascella.

9. *Scorpaena loppei*: scorfano di Cadenat o scorfano carenato. Dimensioni massime 15 cm. Simile a *Scorpaena notata*, è più piccolo e non presenta la chiazza scura sulla pinna dorsale. Ha solo un poro mandibolare.

10. *Scorpaena porcus*: scorfano nero. Fino a 30 cm. Ha appendici cutanee accentuate sopra l'occhio, ma non ne ha sotto il mento. Di solito il colore è bruno, con chiazze scure irregolari.

11. *Helicolenus dactylopterus*: scorpene bastarda o scorfano di fondale, cresce fino a 45 cm. Rossastro, con variazioni cromatiche più o meno accentuate. Chiazza scura sull'opercolo (Nikiforos G., 2002).

12. *Trachyscorpia cristulata echinata*: scorfano spinoso, Sebastidae lungo fino a 55 cm. Entrata nel Mediterraneo da Gibilterra. Simile alla precedente, se ne distingue per le aree scure più marcate, le spine più evidenti sul capo e per la caratteristica forma delle pettorali, i cui raggi superiori sono assai più lunghi di quelli inferiori (Nikiforos G., 2002).

13. *Pterois miles*: dimensioni fino a 35 cm. Lessepsiano. Inconfondibile. Assai velenoso (Nikiforos G., 2002). Questo Lionfish invasivo del Mediterraneo ha un corpo con alternanza di ampie bande marroni, bianche e rossastre. Inoltre, le spine dorsali, pettorali e anali sono molto allungate, acuminate e offrono una significativa protezione dalla predazione (Bariche M. et al., 2013).

La maggior parte delle punture accidentali da scorfano che vengono subite da bagnanti, pescatori, sub, operatori del mercato ittico, e chiunque altro possa entrarne a contatto riguardano la specie *Scorpaena porcus*. Ciò accade a causa del fatto che rappresenta l'esponente più rappresentato e quindi comune dei pesci velenosi presenti nel mar mediterraneo. Conseguentemente alla facilità di incontro dello scorfano nero aumentano le probabilità di contatto con le spine velenifere e quindi di avvelenamento da puntura.

Anche se dati completi sulle frequenze di avvelenamento, causata da pesci, non sono del tutto disponibili, diversi studi affermano che non è un evento raro, soprattutto tra i pescatori (Fonseca L. and Lopes-Ferreira M., 2000; Fitzgerald G.J., 1993; Kizer K.W. et al., 1985; Lee J.Y. et al., 2004; Haddad V. Jr. and Martins I.A., 2006; Isbister G.K., 2001; Scott D.F., 2015; Haddad V. Jr. et al., 2003; O'Connor J.M. and Hahn S.T., 2001).

2.3 Lo scorfano nero

Scorfano nero (fig.4), scorfanotto bruno, nome inglese: black scorpionfish, *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758).

Il corpo è tozzo e massiccio con profilo convesso, la testa è cretata e presenta delle piccole appendici cutanee, anche sopra gli occhi (aperture nasali anteriori) ma non sulla mascella inferiore (mandibola). Al centro della fronte, dietro le arcate sopraorbitarie, si trova una depressione di forma quadrata (con spine frontali) detta fossetta occipitale. Sul capo presenta squame cicloidi non molto evidenti (Louisy P., 2002).

Colore brunastro a chiazze nerastre e chiare, marrone-rossastro, possiede numerosi annessi (appendici) cutanei, che rendono buona la sua mimetizzazione. Si distingue dalle altre specie di Scorpaenidi per l'assenza di squame nell'area coperta dalle pinne pettorali, il maggior numero di squame (ctenoidi e di piccole dimensioni) contate verticalmente sul fianco lungo la linea laterale (di solito tra le 65 e 70); può crescere fino a una lunghezza di 37 cm, ma è più comunemente tra 15-20 cm.

La pinna caudale ha tre strisce verticali scure, e vi è un punto luminoso tra l'ottava e nona spina dorsale (Bailly N., 2013).

Dietro la copertura della branchia (opercolo) di solito ci sono due spine.

Per quanto riguarda la disposizione, tipologia e numero di raggi dello scorfano nero, la pinna dorsale (12 raggi spinosi e 9-11 molli) è la parte spinosa più lunga e più sviluppata (fig.4) la parte molle è arrotondata posteriormente. La pinna anale è opposta alla parte molle della dorsale, ha 3 raggi spinosi distanziati e 5-6 raggi molli arrotondati posteriormente.



Figura 4 - Scorfano nero che mostra le spine dorsali, più lunghe e sviluppate delle altre spine presenti sul suo corpo.

La pinna caudale (21 raggi) è grande, con bordo posteriore libero e arrotondato. Le pettorali sono molto ampie e arrotondate; ogni pinna ha 16-18 raggi molli con estremità libere. Le pinne ventrali o pelviche (ciascuna di 1 raggio spinoso evidente e 5 raggi molli) sono più piccole delle pettorali e sono arrotondate (Saju J. M, 2014). Spine dorsale, pelviche e anali di scorfano nero hanno ghiandole velenifere alle loro basi connesse internamente con l'opercolo della spina da apposite scanalature (Hureau J.C., Litvinenko N.I., 1986).

La puntura causata dalle spine velenose è molto dolorosa e i suoi effetti si risentono per qualche ora. Si sa poco circa la sua riproduzione: avviene in primavera/estate, quando gli scorfani si portano presso la costa, in acque basse, per deporre le uova (ellissoidali), in un unico ammasso (cordoni gelatinosi), sono galleggianti le quali vengono fecondate e lasciate al loro destino (Bailly N., 2013).

Da queste nascono piccolissimi avannotti già muniti di irte spine che si trattengono a gruppi numerosi fra le scogliere e, raggiunta una certa lunghezza, vanno poi a unirsi agli adulti in profondità (Bilgin S. and Çelik E.S., 2009; Ünsal N. and Oral M., 1996).

Per quanto riguarda la sua distribuzione, *Scorpaena porcus* è una specie originaria dell'Oceano

Atlantico orientale ed è molto comune. Il suo range di distribuzione si estende verso sud dalla parte meridionale delle isole britanniche alle Azzorre, le Canarie e la costa nord-occidentale dell'Africa (Marocco) (Ferri J., 2010).

Si trova in tutto il mar Mediterraneo e il mar Nero dal litorale fino alla profondità di circa 800 metri (molto comune tra i 0,5 e i 15 metri) (Hureau J.C. and Litvinenko N.I., 1986). Tuttavia la sua distribuzione dipende dalle ore del giorno, dalla profondità, dal tipo di fondo e dall'area di studio (Pashkov et al., 1999).

Il scorfano nero è una specie costiera bentonica e solitamente presente su fondali rocciosi o detritici caratterizzati da alghe, e piante (es. *Zostera* e praterie di *Posidonia*), spesso si riscontra in fessure, grotte e strapiombi.

Specie non migratoria, generalmente solitaria, d'alimentazione carnivora (De Sola L. et al 2015).

Durante il giorno rimane immobile tra gli scogli, mentre la notte vaga in cerca di cibo (Cerrano C. et al., 2004). Gli scorfani si nutrono di piccoli pesci ad esempio clupeidi, bavoze (blennidi) e ghiozzi (gobidi), ma anche di crostacei, cefalopodi ed altri invertebrati bentonici (De Sola L. et al 2015).

Ciò che accomuna molti Scorpaenoidei è la caratteristica di localizzare la preda attraverso sofisticati sistemi di controllo visivo e quando questa si avvicina creare con la loro bocca un vuoto attraverso il quale viene immediatamente catturata, un esempio studiato è quello del pesce pietra *Synanceia verrucosa* in cui la cattura della preda avviene in un quasi impercettibile movimento (Noakes D.L.G. et al., 2012).

3 Materiali e metodi

3.1 Approvvigionamento degli animali

Se i pesci vengono pescati a bassa profondità, una volta fuori dall'acqua nonostante lo stress respiratorio rimangono in vita per un certo lasso di tempo; questo avviene in quanto le membrane di chiusura degli opercoli branchiali riescono a trattenere una certa quantità di acqua.

Gli esemplari sottoposti alle analisi sono stati acquistati ancora in vita al mercato ittico direttamente dai pescatori allo sbarco e sono stati immessi in un box di polistirolo con ghiaccio affinché non si verificassero alterazioni alle componenti veleno dovute alla crescente temperatura. Gli scorfani sono morti durante il trasporto in laboratorio a causa dello shock termico dovuto al ghiaccio che ha tuttavia stabilizzato la struttura bio-chimica degli interi animali.

3.2 Acquisizione dati biometrici e riconoscimento

Scorpaena porcus è simile a *Scorpaena scrofa* nella morfologia e la distribuzione. Tuttavia, lo scorfano rosso (*S. scrofa*) si ritrova a partire da profondità maggiori (20-110 m). Lo scorfano nero si distingue per l'assenza di appendici cutanee sotto la mascella inferiore presenti nello scorfano rosso che presenta una colorazione arancione brillante e spine opercolari meno sviluppate. Inoltre *Scorpaena scrofa* cresce anche ad una lunghezza di 51 cm (Saju J.M., 2014; Reeve A., 2007).

Le misure sono state effettuate utilizzando una bilancia digitale e un calibro (fig.5 e fig.6).



Figura 5: misura del peso dell'esemplare rappresentativo di *Scorpaena porcus*.



Figura 6 – Misura della lunghezza dell'esemplare rappresentativo di *Scorpaena porcus*: lunghezza totale = 15 cm; dimensione testa (testa-opercolo) = 5 cm; lunghezza corpo (opercolo banchiale-attaccatura pinna caudale) = 11,5 cm.

3.3 Estrazione del composto grezzo

I pesci velenosi mancano di una muscolatura associata al loro apparato velenifero e non sono quindi in grado di controllare volontariamente il rilascio del loro veleno (Lopes-Ferreira M., et al. 2014). Diversi studi testimoniano che in molti pesci il veleno viene secreto da ghiandole esocrine (Halstead B.W. et al., 1955; Halstead B.W. et al., 1956; Fishelson L., 1974). L'espulsione del veleno si verifica quando viene applicata una pressione meccanica all'apice delle spine. Se una spina dovesse rompersi durante una puntura, il pesce è in grado di rigenerare la spina e la ghiandola velenifera ad essa associata. Questo è utile per i ricercatori che cercano di studiare il veleno, in quanto i pesci possono essere mantenuti vivi per poter estrarre il veleno periodicamente (Church J.E. and Hodgson W.C., 2000).

Il veleno può essere estratto tagliando l'intero apparato velenifero successivamente omogeneizzato e centrifugato (Nair M.S. et al., 1985). Altri metodi più efficaci consistono nell'aspirazione del veleno direttamente dalla ghiandola velenifera attraverso una siringa o attraverso una pressione applicata tra la spina velenosa ed una provetta eppendorf opportunamente rivestita da una membrana, facendo sì che il veleno venga emesso direttamente nella provetta (Church J.E. and Hodgson W.C., 2000; Poh C.H. et al., 1991). Tuttavia per i pesci velenosi la cui estrazione delle tossine è soggetta ad essere contaminata da altre sostanze (es. muco), si utilizzano metodi di precipitazione supplementari (Baumann K. et al., 2014).

Altre tecniche di estrazione, da noi inoltre adoperate in quanto risultanti più efficaci, riportate anche in letteratura sono il metodo di estrazione per aspirazione e il metodo di estrazione dell'intero apparato velenifero

3.3.1 Metodo di estrazione per aspirazione

La guaina integumentaria che copre queste spine viene fatta scivolare fino alla base della spina dorsale e il veleno contenuto nelle cellule secretorie sotto forma di tessuto sottile e fusiforme grigiastro che si trova all'interno delle scanalature ghiandolari distali è aspirato con una micropipetta la quale è connessa con una fonte di vuoto. I campioni raccolti vengono mantenuti a 5°C e il materiale raccolto centrifugato a 5000 rpm per 10 min, il supernatante viene rimosso o viene liofilizzato (Mariscal R., 2012).

In laboratorio abbiamo eseguito queste aspirazioni per ogni spina velenifera degli scorfani, sia con una pipetta p1000 munita di puntale (fig.7), sia con un tubo del diametro delle spine connesso con



Figura 7: Metodo di estrazione per aspirazione eseguito attraverso una micropipetta p1000.

una pompa peristaltica a vuoto (fig.8).

Figura 9 - Metodo di estrazione per aspirazione del veleno dalle spine pelviche tramite tubo connesso ad una pompa peristaltica



Figura 8 - Aspiration method in cui l'estrazione è avvenuta attraverso l'ausilio un tubo connesso di una pompa peristaltica; è possibile notare l'abbassamento della guaina integumentaria (che ricopre i raggi spinosi del pesce) dalle spine dorsali; tale operazione precede l'aspirazione

In entrambi i casi abbiamo estratto il veleno per aspirazione dalle spine dorsali pelviche e anali.



Figura 9 - Metodo di estrazione per aspirazione del veleno dalle spine dorsali tramite micropipetta.

Il veleno è stato aspirato da ogni spina velenifera dello scorfano e per ciascuna il liquido aspirato è stato immesso (con la micropipetta) o connesso (pompa peristaltica a vuoto) ad una provetta eppendorf opportunamente inserita in un box di polistirolo con ghiaccio per evitare che le molecole tossiche potessero denaturarsi. Tali procedure di estrazione sono state eseguite per ogni esemplare (10-12 scorfani per campionamento) al fine di ottenere circa 15-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di veleno per campione.

Tutti i campioni sono stati conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (per stabilizzare e mantenere la struttura molecolare) per le successive analisi.

3.2.2 Metodo di estrazione dell'intero apparato velenifero

La guaina integumentaria che copre le spine è stata spogliata fino alla base delle spine e queste ultime prelevate ed immerse in un piccolo beaker con acqua distillata a 5°C . Il beaker viene delicatamente agitato per 5 minuti e la soluzione viene fatta decantare. Questa procedura viene eseguita 3 volte, il campione viene lavato e successivamente liofilizzato; alcune proprietà tossiche vengono perse nella liofilizzazione (Mariscal R., 2012).

Abbiamo utilizzato questo protocollo su 10 scorfano neri (14-16 cm) (fig.12); le spine sono state rimosse (fino alla spina dorsale) (fig.13), inserite in una falcon (tubo) (fig.14) con 10 ml di acqua (distillata ultrapura), ulteriormente tagliate e poste in un agitatore situato in una camera fredda a 4° .

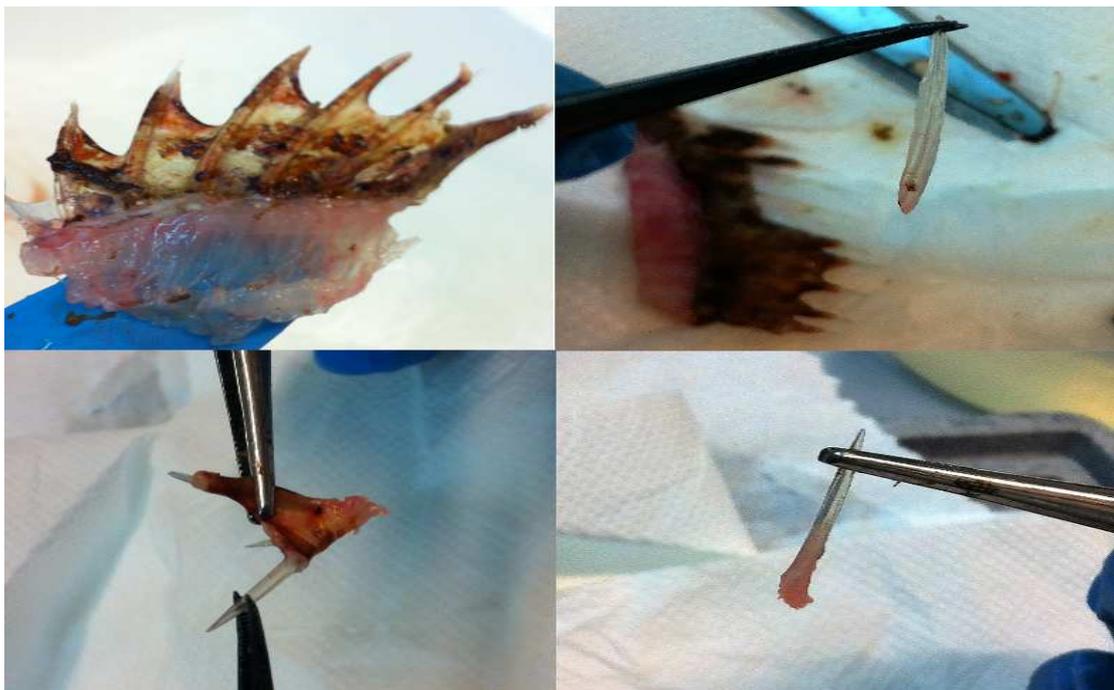


Figura 10 - Rimozione delle spine dai diversi individui, ripulite dal tegumento e trattate successivamente per ottenere la soluzione di interesse.

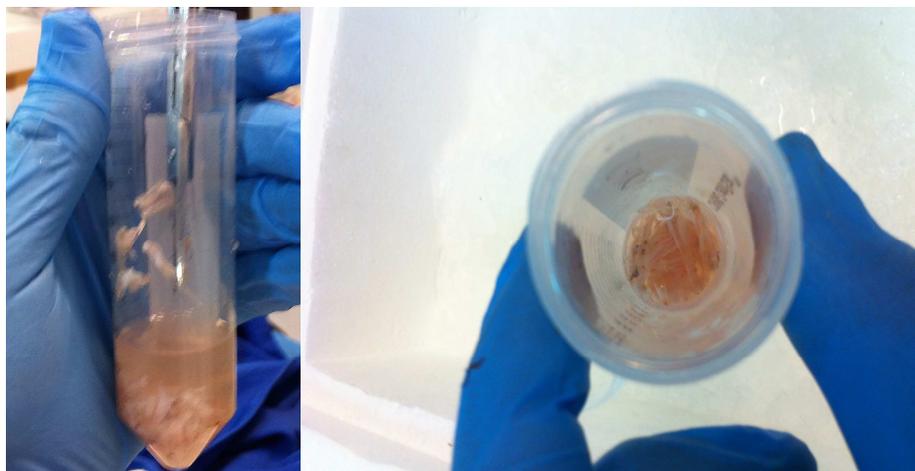


Figura 11 - Falcon contenente le spine successivamente tagliate per favorire la fuoriuscita del veleno contenuto al loro interno e alla loro base.

Dal batch method è stato ottenuto inizialmente un tubo (contenente le spine di *Scorpaena porcus*). Il campione con le spine è stato filtrato, con l'ausilio di un cucchiaino (con maglie filtranti reticolate), sono state recuperate le soluzioni (lavaggio) e conservate in opportuni tubi conservati successivamente a -80°C . Una volta congelati, sono stati tolti i tappi dei tubi e l'apertura è stata ricoperta con del parafilm opportunamente forato per favorire la liofilizzazione, la quale è stata condotta attraverso una macchina di liofilizzazione (fig.12).



Figura 12 - Macchinario per liofilizzazione connesso ai tubi contenenti i campioni estratti tramite il metodo di estrazione dell'intero apparato velenifero.

4 Tecniche di conservazione dell'estratto

4.1 Liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo di essiccamento in cui la rimozione dell'acqua sotto forma di ghiaccio da un campione congelato, avviene direttamente senza passare per la fase liquida. Vi è, quindi, la diretta conversione del ghiaccio in vapore acqueo (sublimazione). Il processo di liofilizzazione consiste di tre fasi principali: una fase di congelamento del campione; una fase di essiccamento primario, sublimazione, secondo i valori limite prescelti sia per la temperatura che per la pressione; una fase di essiccamento secondario, o finale, desorbimento, del campione, da cui viene rimossa l'acqua di cristallizzazione. Una volta avvenuta la liofilizzazione i tubi sono stati conservati in freezer per il loro utilizzo per le successive analisi d'interesse. Alcune proprietà tossiche vengono perse nella liofilizzazione (Mariscal R., 2012).

4.2 Crioconservazione

Oltre alla difficoltà di ottenimento e alle possibili contaminazioni dovute alle secrezioni mucose, ematico-linfatiche e sierose, facilmente prelevabili durante il campionamento l'estratto grezzo presenta un'estrema labilità a diversi fattori (Ziegman R. and Alewood P., 2015). Questa spiccata labilità è causata dal calore, dal pH, dalla liofilizzazione, dallo stoccaggio e dai ripetuti congelamenti e scongelamenti. La stabilità del veleno dipende quindi anche dai cambiamenti di temperatura. In letteratura ad esempio viene riportato che il veleno di *Scorpaena guttata* è altamente termolabile (Coats J.A. et al., 1980). Un altro esempio riguarda un esperimento mirato a valutare tale stabilità dell'estratto di veleno grezzo di *Scorpaena plumieri*, in un lavoro condotto da diversi ricercatori in Brasile, sono stati conservati diversi campioni di veleno grezzo stesso a varie condizioni di temperatura: 25°C, 4°C, -20°C e -196°C. Tali campioni sono stati analizzati per osservare l'attività proteolitica, emolitica, ipotensiva e letale. Dopo un giorno è stata riscontrata una parziale perdita tali attività nei campioni conservati a 25°C, 4°C e -20°C. Inoltre attraverso un esperimento di zimografia utilizzando come substrato la gelatina (SDS-PAGE-Gelatin) è stato osservato che il veleno catalizza l'idrolisi di substrati proteici come la gelatina e la caseina. Tale osservazione è stata effettuata attraverso la visualizzazione di bande incolore che mostravano il medesimo peso molecolare nei campioni conservati a 4°C, 20°C e 196°C, tali bande sono risultate inoltre identiche a quelle del veleno liofilizzato e all'estratto grezzo fresco, suggerendo un'attivazione o auto-attivazione dello zimogeno. Nonostante l'instabilità dell'attività biologica di alcuni veleni, l'attività proteolitica sembra essere stabile anche dopo diverse settimane e indipendentemente dalla temperatura di conservazione (Carrijo L. C. et al., 2005). Tuttavia nella zimografia la banda caratteristica dei campioni conservati a temperature inferiori ai 4°C non risultano nel campione conservato a 25°C per cui ipotizziamo che la stabilità dei componenti presenti nel veleno dipenda dalla temperatura ed aumenta al diminuire della stessa. A supporto di quanto detto in un lavoro di alcuni ricercatori a Tolosa: "Study of *Scorpaena scrofa* and *Scorpaena porcus* venom: the preliminaries of a qualitative analysis" è stato sviluppato un metodo di estrazione del veleno a bassa temperatura (4 ° C) a impedire instabilità proteica (Eon- Gerhardt R., 1995).

5 Discussione

I veleni dei pesci sono meno studiati rispetto ai veleni di animali terrestri a causa della difficoltà di ottenimento, della loro estrema labilità e a causa delle possibili contaminazioni dovute a diversi tipi di secrezioni facilmente prelevabili durante il campionamento. Questa spiccata labilità è causata dal calore ed altri fattori e rappresenta un ostacolo per i ricercatori ma una salvezza per le vittime offese.

Nonostante ciò è interessante poter selezionare tossine da animali velenosi per le loro potenziali proprietà utili in contesti biomedici, compresi ad esempio i loro usi come trattamenti per diverse patologie. Questi studi preliminari potrebbero essere interpretati come un inizio di ricerca che getta le basi per favorire ulteriori analisi riguardanti ad esempio la purificazione del veleno estratto, l'isolamento delle tossine, la completa caratterizzazione del veleno nonché l'adozione di altri strumenti utili per la valutazione e l'identificazione delle attività di tali tossine.

La riproduzione biotecnologico-industriale di tali molecole potrebbe avere risvolti applicativi in campo farmacologico non indifferenti, qualora venisse dimostrato che possano essere utilizzate, in maniera selettiva, per combattere diversi tipi di patologie come quelle neuro-degenerative o tumorali, come tutt'ora in corso di studio per altre tossine. Inoltre dal momento che le tossine sembrano avere caratteristiche simili e funzioni omologhe, è possibile che l'azione farmacologica mostrata da una può valere anche per le altre (Gomes H.L. et al., 2013). Per cui noi pensiamo che successivi e consequenziali studi di purificazione possano confermare le nostre ipotesi.

6 Bibliografia

- Abirami P., Arumugam M., Giji S., Nagarajan S., 2013. Bio-Prospecting Of Catfish Sting Venom *Arius Maculatus* Available Along South East Coast Of India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1): 110–115.
- Al-Hassan J.M., Thomson M., Ali M., Criddle R.S., 1987. Toxic and pharmacologically active secretions from the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell). *Toxin Rev.*, 6: 1-43.
- Alluè R., Lloris D.A.R., Rucabado J., 1981. *Scorpaena stephanica* Cadenat, 1943 (Osteichthyes, Scorpaenidae), primera cita para la ictiofauna europea, localizada en al Mediterràneo Occidental. *Inv. Pesq.* 45(2): 433-439.
- Antoniazzi M.M., Benvenuti L.A., Lira M.S., Jared S.G., Neto D.G., Jared C., Barbaro K.C., 2011. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. *Toxicon*, 57(2): 297-303.
- Bailly Nicolas, 2013. "*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758". *World Register of Marine Species*.
- Balasubashini M.S., Karthigayan S., Somasundaram S.T., Balasubramanian T., Viswanathan P., Menon V.P. 2006. *In vivo* and *in vitro* characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish (*Pterios volitans*) venom in mice. *Toxicol. Mech. Methods.*,16(9): 525-531.
- Barbaro K.C., Lira M.S., Malta M.B., Soares S.L., Garrone Neto D., Cardoso J.L., Santoro M.L., Haddad Junior V., 2007. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*, 50(5): 676-678.
- Bariche M., Torres M., Azzurro E., 2013. The presence of the invasive Lionfish *Pterois miles* in the Mediterranean Sea. *Mediterranean Marine Science*, 292-294.
- Baumann K., Casewell N.R., Ali S.A., Jackson T.N., Vetter I., Dobson J.S., Cutmore S.C., Nouwens A., Lavergne V., Fry B.G., 2014. A ray of venom: Combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray

(*Neotrygon kuhlii*). J Proteomics, 109: 188-98.

Berg L.S., 1958. Sistema der rezenten und fossilen Fischartigen und Fische. VEB Verlag der Wissenschaften, Berlino.

Bertol Elisabetta, Analitica Tossicologica: Aspetti tecnici interpretativi, giuridici e deontologici. Esculapio, 2011 pag.1-2.

Bilgin, S., Çelik E.S., 2009. Age, growth and reproduction of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus* (Pisces, Scorpaenidae), on the Black Sea coast of Turkey. J. Appl. Ichthyol., 25: 55-60.

Borondo J.C., Sanz P., Nogué S., Poncela J.L., Garrido P., Valverde J.L., 2001. Fatal weeverfish sting. Hum. Exp. Toxicol., 20(2): 118-119.

Capasso F., Borrelli F., Castaldo S., Grandolini G., 2007. Fitofarmacovigilanza: Vigilanza sulla sicurezza dei prodotti fitoterapici. Springer Science & Business Media, pag.19.

Carlson R.W., Schaeffer R.C. Jr., La Grange R.G., Roberts C.M., Russell F.E., 1971. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. I. Toxicon, 9: 379-391.

Carlson R.W., Schaeffer R.C. Jr., Whigham H., Weil M.H., Russell F.E., 1973. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. II. Toxicon, 11: 167-180.

Carrijo L.C., Andrich F., de Lima M.E., Cordeiro M.N., Richardson M., Figueiredo S.G., 2005. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. Toxicon, 45(7): 843-850.

Cerrano Carlo, Massimo Ponti e Stefano Silvestri, Guida alla Biologia Marina del Mediterraneo, Ananke Edizioni, 2004, Specie pericolose (par. 6.8).

Church J.E., Hodgson W.C., 2000. Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. Toxicon, 38(3): 391-407.

Church J.E., Hodgson W.C., 2001. Stonefish (*Synanceia spp.*) antivenom neutralises the *in vitro* and *in vivo* cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. Toxicon, 39: 319-324.

- Church J.E., Hodgson W.C., 2002. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, 40:1083-1093.
- Coats J.A., Pattabhiraman T.R., Russel F.E., Gonzalez H., 1980. Some physiopharmacology properties of the scorpionfish venom. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 23: 113–115.
- Collette B.B., 1966. A review of the venomous toadfishes, subfamily Thalassophryinae. *Copeia*, 4: 846–864.
- Costa Francesco, 2004. Atlante dei pesci dei mari italiani. Mursia.
- De Araújo Tenório H., da Costa Marques M.E., Machado S.S., Pereira H.J., 2015. Angiotensin processing activities in the venom of *Thalassophryne nattereri*. *Toxicon*, 98: 49-53.
- De Sola, L., Herrera, J., Keskin, Ç., de Morais, L., Smith-Vaniz, W.F., Carpenter, K.E. & de Bruyne, G. 2015. *Scorpaena porcus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015.
- Endean R. A., 1961. Study of distribution, habitat, behaviour, venom apparatus, and venom of the stone-fish. *Freshw. Res.*, 12: 177–190.
- Eon-Gerhardt R., 1995, Study of *Scorpaena scrofa* and *Scorpaena porcus* venom the preliminaries of a qualitative analysis. *Toxicon*, 33(9): 1122-1122(1).
- Eschmeyer W. N., 1969. A systematic review of the Scorpionfishes of the Atlantic Ocean (Pisces, Scorpaenidae). *Occ. Pap. Calif. Acad. Sci.*, (79):130.
- Eschmeyer William N. and Fong Jon David, Catalog of Fishes database, 2016.
- Ferri Josipa, Petrić Mirela and Matić-Skoko Sanja, 2010. Biometry analysis of the black Scorpionfish, *Scorpaena Porcus* (Linnaeus, 1758) From The Eastern Adriatic Sea, Croatia. *Acta. Adriat.*, 51(1): 45 – 53.
- Fishelson L., 1974. Histology and ultrastructure of the recently found buccal toxic gland in the fish *Meiacanthus nigrolineatus* (Blenniidae). *Copeia*, 2: 386–392.
- Fitzgerald G.J., 1993. Analysis of 24 cases of bullrout envenomation. *Emerg. Med.*, 5: 199–200.
- Fonseca L., Lopes-Ferreira M., 2000. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim) *An. Bras. Dermatol.*, 75: 435-443.

- Galil B., Goren M., Mienis H., (2011). Checklist of marine species in Israel. Compiled in the framework of the EU FP7 PESI project.
- Gargiullo Stefano, Gargiullo Claudio, Pesci del Mediterraneo, Ireco, 2006.
- Garnier P., Goudey-Perrière F., Breton P., Dewulf C., Petek F., Perrière C., 1995. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*, 33(2): 143-155.
- Goffredo S. and Dubinsky Z., 2014. The Mediterranean Sea: Its history and present challenges
Editors: Goffredo, Stefano, Dubinsky, Zvy (Eds.).
- Gomes H.L., Andrich F., Fortes-Dias C.L., Perales J., Teixeira-Ferreira A., Vassallo D.V., Cruz J.S., Figueiredo S.G., 2013. Molecular and biochemical characterization of a cytolytic factor from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. *Toxicon*, 74: 92-100.
- Gwee, M.C.E., Gopalakrishnakone P., Yuen R., Khoo H.E., Low K.S.Y., 1994. A review of stonefish venoms and toxins. *Pharmacol. Ther.*, 64: 509–528.
- Haddad V. Jr., Martins I.A., 2006. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. *Toxicon*, 47(8): 838-843.
- Haddad V. Jr., Martins I.A., Makyama H.M., 2003. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, 42(1): 79-83.
- Hahn S.T., O'Connor J.M., 2000. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. *Toxicon*, 38(1): 79-89.
- Halstead B.W., Chitwood M.J., Modglin F.R., 1955. The anatomy of the venom apparatus of the zebrafish, *Pterois volitans* (Linnaeus). *Anat Rec.*, 122(3): 317-333.
- Halstead B.W., Chitwood M.J., Modglin F.R., 1956. Stonefish stings, and the venom apparatus of *Synanceja horrida* (Linnaeus). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 75: 381–397.

- Hureau, J.C., N.I. Litvinenko, 1986. Scorpaenidae. In Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J. and Tortonese E. (eds.) Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. UNESCO, Paris. Vol. 3, p.1211-1229.
- Isbister G.K., 2001. Venomous fish stings in tropical northern Australia. *Am. J. Emerg. Med.*, 19(7): 561-565.
- Ishizuka E.K., Ferreira M.J., Grund L.Z., Coutinho E.M., Komegae E.N., Cassado A.A., Bortoluci K.R., Lopes-Ferreira M., Lima C., 2012. Role of interplay between IL-4 and IFN- γ in the in regulating M1 macrophage polarization induced by Nattectin., *Int. Immunopharmacol.*, 14(4): 513-22.
- Kiriake A., Madokoro M., Shiomi K., 2014. Enzymatic properties and primary structures of hyaluronidases from two species of lionfish (*Pterois antennata* and *Pterois volitans*). *Fish Physiol. Biochem.*, 40(4): 1043-1053.
- Kirti, Indumathi S.M., Samanta S. Khora, 2013. Pharmacological Potentials of Scorpaenidae Fish. *International Journal of Drug Development and Research*.
- Kizer K.W., McKinney H.E., Auerbach P.S., 1985. Scorpaenidae envenomation: A five-year poison center experience. *JAMA*, 253(6): 807-810.
- Lameiras J.L.V., Costa O.T.F.D., Moroni F.T., Araújo J.D.R., Caranhas S.M.E., Marques C.M.A., Dos-Santos M.C., Duncan W.L.P., 2014. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. *Toxicon*, 77: 105-113.
- Lee J.Y., Teoh L.C., Leo S.P., 2004. Stonefish envenomations of the hand--a local marine hazard: a series of 8 cases and review of the literature. *Ann Acad Med Singapore*, 33(4): 515-520.
- Lima C., Bianca Clissa P., Amélia Piran-Soares A., Tanjoni I., Moura-da-Silva A.M., Lopes-Ferreira M., 2003. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*, 42(5): 499-507.
- Lopes-Ferreira M., Grund L.Z., Lima C., 2014. *Thalassophryne nattereri* fish venom: from the envenoming to the understanding of the immune system. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.*, 20: 1-12.

- Lopes-Ferreira M., Magalhães G.S., Fernandez J.H., Junqueira-de-Azevedo Ide L., Le Ho P., Lima C., Valente R.H., Moura-da-Silva A.M., 2011. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie.*, 93(6): 971-980.
- Louisy P., 2002, Guide d'identification des poissons marins Europe et Mediterranée Les Éditions Eugen Ulmer Publ., pp. 234-235.
- Low K.S., Gwee M.C., Yuen R., Gopalakrishnakone P., Khoo H.E., 1993. Stonustoxin: a highly potent endothelium-dependent vasorelaxant in the rat. *Toxicon*, 31: 1471-1478.
- Majewsky H., 2009. An Introduction to Pharmacology. *Pharmacology - Vol.1*.
- Mariscal Richard, *Experimental Marine Biology*, Elsevier, 2012, pag. 283.
- Monteiro-dos-Santos J., Conceição K., Seibert C.S., Marques E.E., Silva P.I. Jr., Soares A.B., Lima C., Lopes-Ferreira M., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. *Int. Immunopharmacol.*, 11(9): 1368-1377.
- Nair M.S, Cheung P., Leong I., Ruggieri G.D., 1985. A non-proteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). *Toxicon.*, 23(3): 525-527.
- Nelson J.S., 1994. *Fishes of the world*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Nikiforos G., 2002. *Fauna del Mediterraneo*, Giunti Editore. Tavola 24, pag. 104.
- Noakes David L. G., Lindquist David G., Helfman G.S., Ward J.A., 2012. *Predators and prey in fishes: Proceedings of the 3rd biennial conference on the ethology and behavioral ecology of fishes, held at Normal, Illinois, U.S.A., May 19–22, 1981* Volume 2 di *Developments in Environmental Biology of Fishes* Springer Science & Business Media.
- O'Connor J.M., Hahn S.T., 2001. An epidemiological study of bullrout (*Notesthes robusta*) envenomation on the north coast of NSW. *Aust. Emerg. Nurs. J.*, 4:16-18.
- Pashkov A.N., Shevchenko N.F., Oven L.S., Giragosov V.E., Kruglov M.V., 1999. Distribution, numbers, and principal population indexes of *Scorpaena porcus* under anthropogenic pollution of the Black Sea. *J. Ichthyol.*, 39(8): 634-641.

- Poh C.H., Yuen R., Chung M.C., Khoo H.E., 1992. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 101(1-2): 159-163.
- Portillo Stempel A., Herrera Ceballos E., 2014. Histology of the venom gland of *Trachinus draco* (Actinopterygii, Trachinidae). *Acta Zool.*, 95: 125–132.
- Raju S., 1974. 3 new species of genus *Monognathus* and Leptocephali of order Saccopharyngiformes. *Fish Bull.*, 72: 547–562.
- Reeve, A. 2007. *Scorpaena porcus* Black scorpionfish. In Tyler-Walters H. and Hiscock K. (eds) *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*.
- Russell F.E., Emery J.A., 1960. Venom of the weevers *Trachinus draco* and *Trachinus vipera*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 90: 805-819.
- Saju J. M., Németh Sz., Réka Szűcs, Rashmi Sukumaran, Z. Lim, Wong L., Orbán L., Bercsényi M., 2014. PCR-based identification of Adriatic specimen of three scorpionfish species (Scorpaenidae, Teleostei). *Acta Biologica Hungarica*, 65(2): 132–143.
- Saunders P.R., Taylor P.B., 1959. Venom of the lionfish *Pterois volitans*. *Am. J. Physiol.*, 197: 437-440.
- Scott D. Fell., 2015. Scorpionfish, Lionfish, and Stonefish Poisoning from eMedicineHealth Medically, FAAEM Medical Editor: Charles Patrick Davis.
- Sivan G., Venketasvaran K., Radhakrishnan C.K., 2010. Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon*, 56(6): 914-925.
- Sivan G., Venketesvaran K., Radhakrishnan C.K., 2007. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon*; 50(4): 563-571.
- Skeie E., 1962. Toxin of the weeverfish (*Trachinus draco*): Experimental studies on animals. Copenh. *Acta Pharmacol Toxicol*, 19: 107-120.
- Smith D., 1999, *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific: Batoid fishes, Chimaera and Bony Fishes Part 1 (Elopidae to Linophryniidae) (Order Saccopharyngiformes) Volume 3*. FAO; Rome, Italy. (Cyematidae). p. 1693.

- Smith W.L. and Wheeler W.C., 2006. Venom Evolution Widespread in Fishes: A Phylogenetic Road Map for the Bioprospecting of Piscine Venoms. *The American Genetic Association Journal of Heredity* 2006:97 (3):206–217.
- Ünsal, N. and M. Oral, 1996. A study on the growth and reproduction of black scorpionfish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758) in the Sea of Marmara. *Turk. J. Zool.*, 20: 303-308.
- Williamson John A., Burnett Joseph W., Fenner J. Peter, Rifkin Jacqueline F., 1996. Venomous and Poisonous Marine Animals: A Medical and Biological Handbook. UNSW Press., p.383-385.
- Wright J.J. Diversity, phylogenetic distribution, and origins of venomous catfishes. *BMC Evol. Biol.* 2009;9:282.
- Zhang H., Gao S., Lercher M.J., Hu S., Chen W.H., 2012. EvolView, an online tool for visualizing, annotating and managing phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.*, 40: 569-572.
- Ziegman R. and Alewood P., 2015. Bioactive Components in Fish Venoms *toxins* **2015**, 7(5), 1497-1531; Academic Editor: Bryan Grieg Fry.