INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce
Paratrygon aiereba

RAQUEL DA SILVA AIRES

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade
Profa. Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo
2018

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce
Paratrygon aiereba**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

RAQUEL DA SILVA AIRES

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Deolnei Alves de Andrade
Profa. Dra. Nanci do Nascimento**

**São Paulo
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

AIRES, R. d. S. ***Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce Paratrygon aiereba***. 2018. 67 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aires, Raquel da Silva

Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce Paratrygon aiereba / Raquel da Silva Aires; orientador Delvonei Alves de Andrade. -- São Paulo, 2018. 67 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.

1. Raias. 2. Paratrygon aiereba. 3. Toxinas. 4. Caracterização Bioquímica. I. Andrade, Delvonei Alves de , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO**Autor: Raquel da Silva Aires****Título:** Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce *Paratrygon aiereba***Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações****Data:** 20/04/2018**Banca Examinadora****Prof Dr.:** Delvonei Alves de Andrade**Instituição:** CEN-IPEN**Julgamento:** Aprovado**Prof Dr.:** Patrick Jack Spencer**Instituição:** CB-IPEN**Julgamento:** Aprovado**Prof Dr.:** Regina Affonso**Instituição:** CB-IPEN**Julgamento:** Aprovado**Prof Dra.:** Juliana Moser Sciani**Instituição:** Instituto Butantan**Julgamento:** Aprovado**Prof Dr.:** Andres Jimenes Galisteo Júnior**Instituição:** IMTSP**Julgamento:** Aprovado

DEDICATÓRIA

Ao meu eterno pai, Sinval Aires,
porque me ensinou com o seu exemplo de vida
as lições mais importantes que aprendi.

À Nanci do Nascimento, orientadora de teses e vidas!
Toda minha gratidão a quem era apaixonada pela vida,
Amava o próximo
E se dedicou com tanto carinho à ciência.

Com amor,
À minha mãe Iracema, meu irmão Rafael, tia Landa
Ao meu esposo Lindomar e
Aos meus pequenos Davi e Miguel

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor do meu destino, que por intercessão de Nossa Senhora me fortaleceu durante este período.

À profa. Dra. Nanci do Nascimento (*in memoriam*), minha orientadora, agradeço a confiança, o apoio, a hospedagem e a amizade. Com segurança, sempre me encorajou, mesmo quando os resultados não apareciam, e eles demoraram a aparecer. Com ela, aprendi muito, ri muito. Agradeço a Deus por tê-la conhecido.

Ao Dr. Devolnei Andrade, por me “adotar” neste último ano. Agradeço a atenção, estímulo e compreensão.

Ao Dr. Patrick Spencer, agradeço pela orientação, principalmente na reta final do trabalho, muito obrigada!

Ao prof. Doutor Heitor Franco de Andrade Júnior, do Instituto de Medicina Tropical da USP, pelas longas conversas e discussões sobre o trabalho.

A Andrea da Costa e Jaqueline Rodrigues pela disponibilidade em colaborar com o preparo das amostras e pelos momentos de descontração.

Ao Dr. Andrés J. Galisteo Júnior e Dra. Janaína Alves, pelas sugestões na qualificação.

Ao Dr. Daniel Pimenta pela análise por espectrometria de massa e pelas contribuições no seminário de área.

Em nome da Neide, agradeço a todos do Biotério do IPEN pelo acolhimento e o café entre um experimento e outro.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia do IPEN, José Pedro Prezotto Neto (Podé), Tamara Mieco Fucase e João Ezequiel de Oliveira (Jhonny), agradeço a boa vontade, as dicas e discussões sobre os experimentos e pelos momentos de descontração.

À Marcela Di Giacomo Messias, agradeço a disponibilidade, apoio, paciência durante este período da realização dos experimentos. Sou imensamente grata pela parceria.

Ao Prof. Dr. Rui Seabra, Dr. Airton Jr. (*in memoriam*) e a Dra. Luciana Barros do CEVAP/Unesp/Botucatu, pela semana de aprendizado sobre o manejo das amostras.

À Profa. Dra. Kátia da Conceição, pelo aprendizado sobre peptídeos quando estive na UNIFESP, Campus São José dos Campos.

À Universidade Federal do Tocantins (UFT) em nome das professoras Dra. Carla Seibert, Dra. Elineide Marques e Msc. Juliana Monteiro pela discussão inicial do tema deste trabalho. Ao Dr. Paulo Lucinda e aos colaboradores Everton e Izabel por cederam os espaços nos laboratórios da UFT para o primeiro manejo com as raías.

Ao exímio pescador “Zé” pela captura das raías.

Ao ITPAC Porto e ao IPEN, pelo convênio que permite fomentar a pesquisa no Tocantins. Ao Fernando Moreira, Dr. André Senna que viabilizaram esta parceria de sucesso, e em especial ao Dr. Bertolin, pela confiança.

Aos colegas de trabalho do ITPAC Porto Nacional agradeço o apoio, em especial aos que me ajudaram aplicando prova, trocando horários, para que eu pudesse ir a São Paulo. Em especial ao Msc. Cleber Decarli, diretor desta IES pelos momentos que entendeu minha ausência na faculdade.

Ao Cristiano Granadier, Fabrícia Amaral e Sueleide pela cumplicidade e trabalho em equipe. Quantas vezes tiveram que me cobrir no trabalho para que eu pudesse ir a São Paulo desenvolver as pesquisas?

Gabi, Thompson e André: estivemos juntos na saúde e na doença, na alegria e na tristeza. Nossa união nos permitiu que realizássemos nossos sonhos. Obrigada por tudo.

Ao Northon, Talhita e Bruna pelos momentos de descontração e compreensão.

À Lucília, Marcela, Marijara, primas; Ana Paula, Letícia, Carina, Tathy, Larissa, amigas. Vocês foram mais que irmãs durante esse processo, agradeço todo o encorajamento e apoio incondicional.

À minha querida prima, sobrinha e amiga Natália Nunes por cuidar com tanto zelo e amor dos meus filhos e minha casa, principalmente quando estava em São Paulo. A você sou grata.

Em nome de Nazaré e Juvenal, agradeço a todos dessa querida família que me acolheu com carinho sempre torcendo por mim.

À minha mãe Iracema, meu irmão Rafael, padrinhos Iolanda, Joana e João agradeço as orações, incentivo, dedicação e amor incondicional. Amo vocês!

Ao meu esposo Lindomar, parceiro de todas as horas, agradeço por compartilhar angústias, incertezas, ter me incentivado, me apoiado e se dedicado a cuidar dos nossos filhos principalmente nestes últimos quatro anos nos períodos de minha ausência.

Ao Davi e ao Miguel, minha maior inspiração para viver.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor determina os seus passos.”

Provérbios 16:9

“A ciência, como um todo, não é nada mais do que um
refinamento do pensar diário.”

Albert Einstein

RESUMO

AIRES, Raquel da Silva. **Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce *Paratrygon aiereba*** 2018. 51p. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

As raias de água doce são peixes peçonhentos que vivem no fundo dos rios, podendo esconder-se em covas rasas que são escavadas em locais arenosos ou lodosos. Estes animais não são agressivos, porém devido a estes hábitos, é grande a possibilidade de acidentes, ocorrendo quando os humanos casualmente pisam na parte dorsal destes animais, os quais utilizam a cauda para se defenderem e desferem ferroadas resultando na penetração do aguilhão no corpo da vítima. Esses acidentes ocorrem principalmente no período de estiagem na região norte do país quando os rios estão mais rasos. São descritos vários casos de acidentes por raias na literatura e os ferimentos provocados pelos ferrões destes animais são dolorosos, de difícil cicatrização, causando necroses extensas e, por vezes, fenômenos sistêmicos. Essas manifestações clínicas estão desencadeadas pela ação das proteínas bioativas presentes na peçonha e no muco. Dentre os três gêneros de raias fluviais, a *Paratrygon*, mesmo apresentando ampla distribuição geográfica e abundância no rio Tocantins, não tem registro de estudos bioquímicos do material secretado do ferrão do dorso do animal. O presente trabalho tem por objetivo fazer uma caracterização bioquímica de forma preliminar do muco da raia *Paratrygon aiereba*. Ao comparar as amostras de muco epidérmico e da peçonha da *P. aiereba* verificaram-se perfis proteicos muito parecidos. Através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% foram identificados no muco, vários componentes com massa molecular variando de 8 a 100 KDa. Através da zimografia, foram visualizadas pelo menos três proteínas com atividades gelatinolítica, e pela primeira vez, atividade caseinolítica foi observada no muco. Os dados mostram atividade importante sobre os fosfolipídios. Um peptídeo com 4.907,8 Da, elevada condutividade e discreta atividade antimicrobiana para a bactéria Gram negativa *Micrococcus luteus* foi isolada com características similares a um peptídeo – β -defensina. Os resultados deste trabalho apontam o potencial tóxico do muco epidérmico de *P. aiereba* podendo agravar as lesões provocadas pela peçonha do animal.

Palavras-chaves: Raias. *Paratrygon aiereba*. Toxinas. Caracterização Bioquímica.

ABSTRACT

AIRES, Raquel da Silva. **Preliminary biochemical characterization of toxins from the mucus of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba*** 2018. 51p.
Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

Freshwater stingrays are venomous fish and live at the bottom of rivers and can be hidden in shallow pits that are excavated in sandy or muddy places. These animals are not aggressive, but because of these habits, the possibility of accidents is great, occurring when humans accidentally step on the dorsal part of these animals, who use the tail to defend themselves and deliver stings resulting in penetration of the sting in the body of the victim. These accidents occur mainly in the dry season in the northern region of the country when the rivers are shallower. Several cases of stinging accidents are described in the literature, and injuries caused by the stings of these animals are painful, difficult to heal, cause extensive necrosis, and sometimes systemic phenomena. These clinical manifestations are triggered by the action of the bioactive proteins present in the venom and mucus. Among the three riverine genera, *Paratrygon*, although presenting a wide geographic distribution and abundance in the Tocantins river, has no record of biochemical studies of the material secreted from the sting of the animal's back. The present work aims to make a preliminary biochemical characterization of the mucus of the *Paratrygon aiereba* streak. When comparing the epidermal mucus and *P. aiereba* venom samples, very similar protein profiles were observed. Through 12% SDS-PAGE gel electrophoresis, several components with molecular mass ranging from 8 to 100 KDa were identified in the mucus. Through the zymography, at least three proteins with gelatinolytic activities were visualized, and for the first time, caseinolytic activity was observed in the mucus. The data show important activity on phospholipids. A peptide with 4.907,8 Da, high conductivity and discrete antimicrobial activity for Gram negative bacteria *Micrococcus luteus* was isolated with characteristics similar to a peptide - β -defensin. The results of this work point out the toxic potential of *P. aiereba*'s epidermal mucus, which can aggravate the lesions caused by the venom of the animal.

Keywords: Stingray. *Paratrygon aiereba*. Toxin. Biochemical Characterization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Relação das massas moleculares das proteínas da peçonha e muco de raias Potamotrygonidae e atividade proteolítica.....	33
Tabela 2 - Tabela 2 - Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) do muco de <i>P. aieriba</i> coletadas em diferentes anos congelados a -20°C.....	42
Tabela 3 – Atividade fosfolipásica do muco bruto filtrado, segundo o método descrito por Holzere Masckessy (1996).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Potamotrygon orbigni</i>	21
Figura 2 - A- <i>Heliotrygon gomesi</i> . B- <i>Plesiotrygon iwamae</i>	21
Figura 3 - A- <i>Paratrygon aiereba</i> . B- Cauda da raia evidenciando os ferrões.....	22
Figura 4 - Ferrão de arraia mostrando o serrilhamento.....	24
Figura 5 - Comunidade Ribeirinha utilizando o rio Manuel Alves (afluente do rio Tocantins), Santa Rosa/TO.....	26
Figura 6 - Análise por SDS – PAGE de toxinas usando um gel de gradiente de poliacrilamida 12%. M: Padrão de Massa Molecular (Kda); Muco: material raspado do dorso do animal; Peçonha: material raspado do ferrão.....	41
Figura 7 - Cromatografia de exclusão molecular de 9 mg de muco de <i>Paratrygon aiereba</i> , diluídos em 0,6 mL de bicarbonato de amônio 100mM. Foram injetados 0,6 mL da amostra em uma coluna Superdex 75 10/300GL, com um fluxo de 0,5mL/minuto. Absorvância no UV verificada a 280 nm.....	43
Figura 8 - Gel SDS PAGE 12% das frações coletadas da Exclusão Molecular. Foi aplicado 30 µL de amostra em cada poço. M; padrão de massa molecular (Kda) A e B: gel corado com Coomassie. C e D: gel corado com nitrato de prata	44
Figura 9 - Zimografia dos picos coletados na cromatografia Exclusão molecular. C+: veneno de <i>Brothrops jararaca</i> (2 mg/mL). As bandas claras indicam as	

regiões de atividade hidrolítica. A: Zimografia com gel em gelatina. B: Zimografia com gel em caseína.45

Figura 10 - Cromatografia, em coluna de troca iônica, do primeiro pico da coluna de exclusão molecular (3 mg/mL). Tampão A (Tris HCl 25 mM pH 8,0). Após dez minutos foi introduzido o tampão B (Tris HCl 25 mM + 2M NaCl pH 8,0). Fluxo 0,5 mL/min. 1 mL/tubo. Mono Q fração 1 220nm 280nm.....47

Figura 11 - Análise da massa molecular do pico de alta condutividade da cromatografia de Exclusão molecular por espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF..... 48

LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

BSA– Albumina bovina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

Da – Dalton

D.O. – Densidade óptica

FAPAC/ITPAC – Faculdade Presidente Antônio Carlos/Instituto Tocantinense
Presidente Antônio Carlos Porto

HCl – Ácido Clorídrico

HPLC – High performance liquid chromatography

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IL– Interleucina

IPEN– Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

kDa – Kilodalton

LAOOs – L-aminoácido-oxidases

Log – logaritmo

PLS– Lipoproteínas

m– metro

M – Molar

min– minutos

mg– miligramas

mL– mililitros

mM – Milimolar

MPs – metaloproteinases

MALDI/ToF – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

NaCl – Cloreto de Sódio

PAGE – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAM – Peptídeo antibacteriano

PLA₂ – Fosfolipase A₂

RPM – Rotações por minuto

SPs – Serinoproteinases

µg – microgramas

μL – Microlitros

μM – Micromolar

UFT – Universidade Federal do Tocantins

spp – Várias espécies

SDS – Dodecil Sulfato Sódio

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SIH-SUS – Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde

SIM – Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN – Sistema Nacional de Notificação e Agravos

TFA – Ácido trifluoroacético

TNF α – Fator de necrose tumoral

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

TO – Tocantins

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Ictismo	19
2.2 Raias	20
2.2 Acidentes por raias	23
2.3 Peçonhas Animais	27
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Coleta das raias	35
4.2 Obtenção e processamento das amostras de muco e da peçonha	35
4.3 Dosagem de proteínas	36
4.4 Cromatografia de Exclusão Molecular	36
4.5 Cromatografia de Troca Iônica	36
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>)	37
4.7 Zimografia	37
4.8 Avaliação da atividade fosfolipásica	37
4.9 Ensaios antimicrobianos	38
.....	38

4.10 Análise por MALDI/TOF da massa molecular do pico 7 colhido no ensaio cromatográfico de exclusão molecular da amostra do Muco de <i>P. aiereba</i>	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Perfil das proteínas do muco e da peçonha do ferrão da <i>P. aiereba</i>	40
5.2 Dosagem de proteínas	41
5.3 Caracterização proteica.....	42
5.4 Atividade Proteolítica	44
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

As raias são peixes peçonhentos que vivem em locais arenosos ou lodosos nos rios que compõem as bacias hidrográficas da América do Sul, principalmente na região norte e centro-oeste do Brasil. Estes animais não são agressivos, mas a possibilidade de acidentes aumenta, quando os banhistas estando no rio, casualmente pisam na parte dorsal destes animais, que utilizam a cauda para se defender e introduzem o ferrão no corpo da vítima (Haddad Jr., 2003).

As características do ferrão favorecem o ferimento, pois além de penetrar na pele da vítima com grande facilidade, a bainha que recobre o ferrão é danificada durante a irrupção deste, expondo as células glandulares da peçonha que se rompem no momento da ferroadada e liberam a peçonha no organismo da vítima. Quando o ferrão retrosserrilhado é retirado da vítima, o ferimento se amplia devido à maior laceração dos tecidos, o que facilita a absorção da toxina, ocasionando sintomas e sinais no organismo. São descritos vários casos de acidentes por raias na literatura, neles, as vítimas declaram que os ferimentos provocados pelas ferroadadas destes animais são dolorosos, de difícil cicatrização, causam necroses extensas e fenômenos sistêmicos (Haddad Jr., 2004; Garrone Neto et al., 2007; Garrone Neto & Haddad Jr, 2010; Halstead, 1966; Halstead, 1970).

Dentre os três gêneros de raias fluviais, os estudos de caracterização da peçonha foram realizados com raias dos gêneros *Potamotrygon* e *Plesiotrygon*. Ainda não foram identificados trabalhos que analisem bioquimicamente as toxinas da peçonha de raias do gênero *Paratrygon*, apesar de apresentarem ampla distribuição geográfica e abundância no rio Tocantins (Frederico et al., 2012; Lameiras et al., 2014).

A partir do estudo do perfil das proteínas contidas na peçonha será possível compreender a patogênese das lesões provenientes dos acidentes por raias. Desta forma, o estudo poderia auxiliar na padronização de um tratamento específico que ainda não foi estabelecido, o que poderia abreviar o tempo de morbidade das vítimas dos acidentes por raias.

Componentes bioativos da peçonha também podem ser utilizados para a fabricação de novos fármacos, como marcadores de alterações fisiológicas (Kozlov *et al.*, 2006)

O fato de ter evidências dos efeitos nocivos do muco aliado à facilidade do procedimento de coleta do mesmo e a quantidade de amostra coletada frente à complexidade do método de extração do ferrão e coleta do material da peçonha, o muco epidérmico da *P. aiereba* foi escolhido como objeto de estudo neste trabalho.

Não há na literatura relatos sobre a peçonha da raia *P. aiereba*. Deste modo, o estudo sobre as toxinas do muco de raias do gênero *Paratrygon* é inédito e contribuirá, inquestionavelmente, para a elucidação do modo de ação da peçonha nas vítimas acidentadas nas regiões banhadas pela bacia hidrográfica do Tocantins – Araguaia, lugar onde essa espécie é encontrada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ictismo

Os animais aquáticos venenosos e traumatizantes podem provocar acidentes em humanos causando debilidade considerável. Os episódios com peixes não são os mais ocorrentes, porém tem maior importância médica (Haddad Júnior, 2003).

O ictismo é o acidente provocado por peixes marinhos ou fluviais em humanos. O acidente pode ser passivo (sarcotóxicos) por ingestão de peixes venenosos como os baiacus (*Tetrodontidae*) produtores de tetrodotoxina, bloqueador neuromuscular potente, capaz de paralisar a vítima e levá-la a óbito por falência respiratória. Acidente passivo por ingestão humana de peixe não venenoso ocorre quando este se encontra em decomposição ou contaminado por bactérias. O ictismo ativo não peçonhento acontece quando o peixe Candiru (*Vandellia cirrhosa*) penetra em orifícios naturais dos banhistas, ou em casos dos peixes elétricos poraquê (*Electrophorus electricus*) e a arraia treme-treme (*Narcine brasiliensis*) que liberam descarga elétrica em humanos quando os tocam. O ictismo ativo peçonhento (acantotóxico) se dá pela inoculação da peçonha por mordedura ou ferroadada do animal (Brasil, 2001).

Os peixes peçonhentos são caracterizados por ter um aparato especializado em produzir, secretar e inocular substâncias tóxicas. Atualmente, cerca de 28 000 espécies de peixes são conhecidas. Dessas, aproximadamente 5% são classificados como peçonhentos. No Brasil, o principal representante marinho responsável pelo ictismo acantotóxico é a raia marinha (*Dasyatis guttatus*, *D. americana*, *Gymnura micrura*). Em águas fluviais os acidentes são acometidos principalmente por raias fluviais (*Potamotrygon hystrix*, *P. motoro*), bagres (*Bagre bagre*, *B. marinus*, etc), mandi (*Genidens genidens*, *Pimelodella brasiliensis*), peixe escorpião, beatinha ou mangangá (*Scorpaena brasiliensis*, *S. plumeri*), niquim ou peixe sapo (*Thalassophryne nattereri*, *T. amazonica*) (BRASIL, 2001; Haddad Jr, 2003; Nelson, 2006).

Normamente, a ocorrência dos acidentes advém da inserção das pessoas no ambiente dos animais. Banhistas e pescadores profissionais são, portanto, os mais acometidos por acidentes por peixes peçonhentos. Os sintomas decorrentes dos acidentes gerados por peixes marinhos são amplamente conhecidos; entretanto, são poucos os estudos de caracterização dos acidentes provocados por peixes de água doce (Sarmiento, 2015)

2.2 Raias

As raias ou arraias são peixes e representam o organismo marinho mais conhecido na antiguidade. Originadas a partir de um ancestral marinho, as raias fluviais são peixes encontrados nas principais bacias hidrográficas da América do Sul, região neotropical. No Brasil, sua ocorrência é conhecida nos rios Paraná, Paraguai, Araguaia, Tocantins em alguns rios da região Nordeste, porém, é na Bacia Amazônica onde o maior número de espécies é encontrado (Charvet-Almeida *et al.* 2002; Garrone Neto *et al.*, 2007; Haddad Jr. *et al.*, 2004).

As raias de água doce fazem parte do filo *Chordata*, classe *Chondrichthyes*, por serem constituídos de esqueleto cartilaginoso, pertence à subclasse *Elasmobranchii* e integram a família *Potamotrygonidae*, compreendendo quatro gêneros: *Paratrygon*, *Plesiotrygon*, *Potamotrygon* e *Heliotrygon*. O gênero *Potamotrygon* compreende aproximadamente 20 espécies, *Plesiotrygon* e *Heliotrygon* abrangem duas espécies, e o *Paratrygon* é considerado monoespecífico até o momento, pois alguns estudos indicam que esse grupo pode compreender um complexo de espécies. Dos elasmobrânquios, a família *Potamotrygonidae* é a única adaptada em água doce (Araújo *et al.*, 2004; Carvalho & Lovejoy, 2011; Frederico *et al.*, 2012; Nelson, 1994).

As raias *Potamotrygon* ou raias de fogo, apresentam disco oval, cauda robusta, curta e normalmente menor que o comprimento do disco. Possuem ferrões mais desenvolvidos, localizados na porção mediodistal. Ocorrem na bacia Amazônica, rio Tocantins, rios da Guiana Francesa, Suriname e no rio Orinoco (Silva, 2009).

Figura 1 – *Potamotrygon orbigni* (Fonte: Haddad, 2004 b).

O gênero *Plesiotrygon*, popularmente conhecido como raia chicote, apresenta cauda mais longa que o comprimento do disco, ferrão desenvolvido próximo à base da cauda e disco oval. O gênero *Heliotrygon* apresenta disco circular, ferrão pequeno desprovido de serrilhas, localizado próximo à base da cauda. Ambos os gêneros estão distribuídos na bacia do Rio Amazonas (Carvalho & Ragno, 2011; Carvalho & Lovejoy, 2011).

Figura 2 - A- *Heliotrygon gomesi*. B- *Plesiotrygon iwamae* (Fonte: Carvalho, Lovejoy, 2011; Haddad, 2004 b).

Paratrygon aiereba é uma espécie de raia de grande porte, podendo alcançar até 1m de diâmetro de disco e os seus exemplares estão entre os maiores representantes da família *Potamotrygonidae*. Possui cauda filiforme (tipo chicote), comprida, bem fina nos exemplares juvenis, e geralmente não se encontram completa em exemplares adultos. O ferrão é de tamanho reduzido em relação às outras raias dulcícolas e localizado próximo à base da cauda. Apresenta baixa fecundidade (aproximadamente dois filhotes por gestação), longevidade estimada em torno de 70 anos e análises filogenéticas indicam que este gênero é o mais basal da família *Potamotrygonidae* (Charvet-Almeida & Almeida, 2008; De Carvalho *et al.*, 2003; Frederico *et al.*, 2012).

Figura 3 - A- *Paratrygon aiereba*. B- Cauda da raia evidenciando os ferrões. Foto: Raquel da Silva Aires (Arquivo pessoal).

As raias são peixes cartilginosos, vivíparos aplacentários que possuem guelras localizadas na parte ventral do corpo. São arredondados e achatados dorso-ventralmente. Suas nadadeiras peitorais são ligadas ao corpo desde o

focinho até a margem anterior das nadadeiras pélvicas que são muito desenvolvidas. Alimentam-se preferencialmente à noite, quando caçam principalmente pequenos peixes e crustáceos (Garrone Neto & Haddad JR., V., 2010).

As raias vivem nas partes rasas dos rios, em regiões lamacentas e arenosas. Normalmente não são agressivas, e as ferroadas em humanos ocorrem acidentalmente quando estes pisoteiam ou manejam as raias de forma inadequada. Por isso suas vítimas sofrem as ferroadas principalmente nos pés, tornozelos e às vezes nas mãos, durante a manipulação de raias capturadas em anzóis ou redes (Haddad Jr. *et al.*, 2004).

2.2 Acidentes por raias

As raias possuem de um a quatro ferrões ósseos que têm formato retosserrilhado localizados na base de sua cauda. Os ferrões apresentam estrutura rígida, uma ponta afiada e são recobertos por um epitélio constituído de grandes quantidades de células glandulares que produzem peçonha, cuja composição e mecanismo de ação constituem alvo de estudo e ainda não foram totalmente elucidados nos gêneros já estudados. Além disso, o dorso destes animais é frequentemente coberto por muco espesso produzido pelas células epidérmicas que apresenta atividade tóxica denominada ictiocrinotoxinas. (Garrone Neto *et al.*, 2005; Garrone Neto, *et al.*, 2007; Haddad Jr., *et al.*, 2004; Klesius *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2006; Pedrosa *et al.*, 2007; Weiss; Wolfenden, 2001; Zhao *et al.*, 2008;).

As características do ferrão retroserrilhado facilitam a penetração no corpo da vítima e ampliam a lesão. Durante a introdução do ferrão, a bainha que o recobre é danificada, expondo as células glandulares da peçonha que se rompem no momento da ferroadada e libera a peçonha no organismo da vítima. Esta absorve as toxinas que promovem os sintomas e sinais característicos dos acidentes. (Garrone Neto, D. & Haddad Jr., V., 2010; Halstead, 1966; Halstead, 1970).

Figura 4 - Ferrão de arraia mostrando o serrilhamento. (Fonte: Haddad, 2004 b).

Nos acidentes provocados por raias fluviais (ictismo) a vítima se queixa principalmente de intensa dor, relacionando-a com ardor. Em torno da ferida observa-se eritema e edema, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Em seguida, a área afetada apresenta flacidez no tecido, abscesso, celulite e perda de tecido devido à formação de necroses extensas e úlcera profunda rosa pálido, que evolui lentamente, sendo uma característica peculiar deste tipo de envenenamento. Há relatos de vítimas que apresentaram sintomas sistêmicos como: tontura, febre, frio, sudorese, náuseas, vômitos, agitação, arritmias cardíacas, congestão pulmonar, além de sequelas de cicatrizes e amputações (Cook *et al.*, 2006; Haddad Jr *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2011).

O ferrão da raia, ao perfurar a vítima, pode levar consigo bactérias e fungos presentes nas águas, areias e no substrato de pedras podendo causar graves complicações. Infecções bacterianas, especialmente causadas por *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.*, são as mais associadas a estas lesões. Embora não existam casos comprovados de mortes provocadas por raias de água doce, processos graves de necrose de pele e altos índices de infecções bacterianas já foram descritos (Haddad Jr., 2003; Torrez *et al.*, 2015).

O fato de não haver terapia específica e eficaz para os acidentes por raia, as vítimas, que normalmente são ribeirinhas ou banhistas, são induzidas a buscarem terapias alternativas para minimizar o quadro clínico desencadeado. Normalmente, as vítimas usam urina como minimizador da dor e, ervas e óleos para cicatrização (Haddad Jr., 2003; Haddad Jr. *et al.*, 2004).

O procedimento mais adequado para o tratamento desse tipo de ferimento consiste em aplicação de água quente (em torno de 60°C), no membro atingido por 30-90 minutos, tendo em vista que reduz muito a dor já que a peçonha de peixe é termolábil. Após este procedimento, o doente deve ser encaminhado a um hospital para limpeza do ferimento local afetado e extração de possíveis fragmentos de ferrões ou espículas do ferimento. A abordagem terapêutica nestes casos é sintomática, baseia-se na utilização de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos. Além disso, é recomendado o uso de anestésicos locais, profilaxia para o tétano, radiografia de tecidos moles para descartar a possibilidade de retenção de parte do ferrão, além do debridamento de áreas necróticas. Estudos recentes em animais indicam que o uso de anti-histamínicos e anti-inflamatórios não-esteroides são eficazes no combate à inflamação decorrente deste tipo de envenenamento. O ideal seria um tratamento como a soroterapia específica que é utilizada para a neutralização de peçonhas inoculadas após acidente por animal peçonhento, como nos casos dos acidentes ofídicos (Antoniuzzi *et al.*, 2011; Torrez *et al.*, 2015; Kimura *et al.*, 2015; Tomazi, 2016).

Devido à ampla distribuição geográfica da raia no Brasil, acredita-se que acidentes com estes animais aconteçam em todo o país, porém são nas regiões Norte e Centro-oeste, onde se tem registrado o maior número de agravos.

Localizado na região norte do país, o Estado do Tocantins é banhado pela bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia. As comunidades ribeirinhas e indígenas utilizam esses rios para lavar roupas, utensílios domésticos, pesca de subsistência ou profissional. No período de junho a setembro (inverno), ocorre uma diminuição dos volumes dos rios Tocantins, Araguaia e seus afluentes. Devido à redução do volume pluviométrico forma-se uma variedade de ilhas e praias fluviais, atraindo turistas para região. Nas cidades de Palmas e Porto Nacional as praias são permanentes por serem banhadas pelo reservatório da

Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães (Lajeado – TO). (Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2012; Brasil, 2009).

No Estado do Tocantins o uso frequente do rio, seja por turistas ou residentes da região, eleva o número de casos de acidente por raias. Esses eventos são muito temidos, pois eles estão quase sempre associados a casos de incapacidade física temporária ou permanente e mantém a vítima afastada do trabalho por semanas ou mesmo meses. (Garrone Neto *et al.*, 2007; Garrone Neto & Haddad Jr., 2010; Magalhães, 2008).

Figura 5 - Comunidade Ribeirinha utilizando o rio Manuel Alves (afluente do rio Tocantins), Santa Rosa/TO. Foto: Raquel da Silva Aires (arquivo pessoal).

Vários trabalhos relatam os acidentes com raias dulcícolas. Sá-Oliveira *et al.* (2011), estudaram sobre os acidentes que ocorreram com 22 vítimas no Amapá. Haddad Jr. *et al.* (2003) acompanharam a cicatrização de lesões de 25 vítimas de raias no Estado do Tocantins. Garrone Neto (2005) relatou intercorrências de pescadores com raias durante o período de trabalho no município de Araguacema/TO. Castro *et al.* (2016) traçaram o perfil epidemiológico de 60 vítimas de raia registradas no SINAN do município de Porto Nacional/TO entre os anos de 2009 e 2013. Passos *et al.* (2016) analisaram 45 prontuários de acidentados atendidos no Hospital Público Regional de Porto Nacional/TO. Monteiros *et al.* (2016) descreveram um caso de agravamento de um ferimento provocado por raia que culminou em amputação do hálux devido à necrose em decorrência de uma infecção bacteriana.

Na maioria dos acidentes as vítimas são homens, pescadores, ribeirinhos que usam a água do rio; ou banhistas, no período de estiagem. Os

acidentes ocorrem com mais frequência no período da tarde. Esta parte do dia, é mais utilizada pelas comunidades ribeirinhas para atividades como pesca, lavagem de roupa, recreação ou higiene. Os membros inferiores, principalmente na região abaixo do tornozelo, são os mais afetados nos acidentes. Os sintomas mais frequentes são dor de grande intensidade e edema. E apesar da dificuldade de identificação do animal causador do acidente, o gênero *Potamotrygon* é o mais relacionado a estes agravos (Clark *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2009; Haddad Jr. *et al.*, 2003; Garrone Neto, Haddad Jr., 2010; Sá-Oliveira, Costa 2015; Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2014; Passos *et al.*, 2016).

Porém, mesmo que o acidente com animal peçonhento seja de notificação compulsória nos serviços de saúde, vários autores acreditam que os casos sejam subnotificados nos programas de epidemiologia do país (Garrone Neto *et al.*, 2007; Haddad Jr. *et al.*, 2004; Haddad Jr. *et al.*, 2012; Brasil, 2014).

Os agravos por animais peçonhentos podem ser registrados via SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), SIH-SUS (Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde), o SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade) e no SINAN (Sistema Nacional de Notificação e Agravos), sendo este último, o único sistema nacional que possui um módulo específico para tratar de agravo com animal peçonhento e deve ser preenchido por determinação pelo Ministério da Saúde. Na ficha do SINAN, há campos específicos para os agravos por serpente, aranha, escorpião, abelha, lagarta, mas não há um campo específico para acidentes provocados por peixes. Neste caso deve ser preenchido o campo outros e descrever qual animal provocou o acidente (Bochner & Struchiner, 2002; Brasil, 2014; Gualberto, 2016).

2.3 Peçonhas Animais

As peçonhas são compostas por um conjunto de moléculas orgânicas e inorgânicas biologicamente ativas formando uma mistura complexa. Os animais utilizam a peçonha principalmente na captura e digestão de alimento ou para sua defesa, as substâncias nela encontrada também apresentam potenciais de uso médico e biotecnológico. Mesmo dentro da espécie há uma variação na composição da peçonha, pois sua produção sofre influência de vários fatores:

sexo, idade, habitat, alimentares, clima, distribuição geográfica, herança genética (Chippaux *et al.*, 1991; Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2012).

Quanto maior a quantidade e a variedade de componentes bioativos na constituição da peçonha, mais pronunciados serão os efeitos clínicos nos indivíduos envenenados. As moléculas podem interferir na atividade de enzimas, receptores ou canais iônicos provocando alterações na homeostasia, coagulação sanguínea, e ainda nos sistemas neuromuscular, cardiovascular, nervoso central e periférico (Calvete *et al.*, 2009).

Os componentes orgânicos bioativos mais comuns são proteínas, peptídeos vasoativos, aminas biogênicas, aminoácidos livres, lipídios e carboidratos. Ferro, cobre, cálcio, manganês, magnésio, zinco são os componentes inorgânicos mais encontrados nas peçonhas e alguns atuam como cofatores enzimáticos, se ligando aos domínios catalíticos das enzimas com a função de ativá-las. (Calvete *et al.*, 2009; Fox, 2013).

A peçonha é constituída principalmente por proteínas e peptídeos agrupadas em famílias como desintegrinas, lectinas, peptídeos, natriuréticos, miotoxinas, fatores de crescimento endotelial e neuronal, cistatinas, inibidores de peptidase do tipo Kunitz, e enzimas como peptidases, fosfolipases, hialuronidases e L-aminoácido-oxidases (LAAOs), nucleotidases, e esterases (Fry, 2005 e Calvete, 2007).

As peptidases já foram descritas em peçonhas de serpentes, abelhas, escorpiões, aranhas e peixes. Estão classificadas em dois grandes grupos as metaloproteinases (MPs) e as serinoproteinases (SPs) (Renet *et al.*, 2001; Carrijo *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2009).

As metaloproteinases, descritas principalmente nas peçonhas ofídicas, são endopeptidases pertencem à família M12, também denominadas reprotinas, metaloproteinases dependentes de zinco. De acordo com a organização e domínio, as MPs são classificadas em três classes principais, P-I, P-II, P-III. As P-I possuem massa molecular entre 20-30 kDa são compostos por um único domínio catalítico de metaloproteinase e apresenta pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. As P-II têm massa molecular entre 30-60 kDa, além do domínio catalítico de metaloproteinase, também é constituída por um domínio de desintegrina na porção C-terminal. As P-III, cuja massa molecular varia entre 60-

100 kDa), além de possuírem os dois domínios anteriormente citados, metaloproteínase e desintegrina, também possuem um outro domínio rico em cisteína que atua em receptores de adesão plaquetária e glicoproteínas e por isso são consideradas, entre as três classes, as enzimas com maior atividade hemorrágica (Calvete, 2005; Fox e Serrano, 2005; Sajevec *et al.*, 2011).

Vários efeitos biológicos estão associados as MPs dentre eles edema, inflamação, necrose, hemorragia e hipotensão. Isso se deve ao fato do íon Zn^{2+} ligar no domínio catalítico, ativar uma molécula de água e atacar a carbonila peptídica (Gutiérrez e Rucavado, 2000, Berg, *et al* 2004; Escalante & Serrano, 2005).

As serinoproteases atuam no controle e regulação da coagulação sanguínea, sistema imune, inflamação e digestão. Com massa molecular variando entre 26 e 67 KDa, são glicoproteínas de cadeia simples. Quando presentes na peçonha, estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas de vários substratos. As serinoproteases atuam no sistema fibrinolítico ativando a cascata da coagulação e por vezes promovendo a agregação plaquetária (Murakami & Arni, 2003; Cunha *et al.*, 2012).

As fosfolipases são hidrolases que catalisam a clivagem de moléculas de fosfolipídios, hidrolisando uma ou mais ligações ésteres dos glicerofosfolipídeos. As fosfolipases que agem sobre as ligações éster carboxílicas são denominadas acil hidrolases, compreendem este grupo, as fosfolipases A₁, A₂ e B. Já as fosfolipases responsáveis pela hidrólise das ligações fosfodiéster, são as fosfodiesterases, neste grupo encontram-se fosfolipase C e D.

Dentre as fosfolipases, a fosfolipase A₂ (PLA₂) é a mais investigada nas peçonhas dos animais. Isso se deve ao fato desta enzima apresentar atividades neurotóxica, miotóxica, hipotensiva, convulsivante, alteração da homeostase, efeitos coagulantes e inibição da agregação plaquetária (Mukherjee, 2014; Dennis, 2011)

As fosfolipases A₂ são enzimas que hidrolisam fosfolipídios na ligação éster do carbono dois, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres, entre eles o araquidônico. PLA₂s são capazes de atuar em diversos fosfolipídios, como, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, plasmogênio e

fator de agregação plaquetária. Estas hidrolases podem ser classificadas de acordo com sua massa molecular em PLA₂ de baixa massa molecular (13 a 15 KDa) e PLA₂ de alta massa molecular (140 a 400 KDa), sendo a última agrupada em dois grandes grupos; PLA₂cálcio dependente e PLA₂Ca²⁺ independente (Six e Dennis, 2000).

Nas peçonhas, as hialuronidas não têm atividades tóxicas, mas contribuem para que as toxinas se espalhem na vítima e tenha uma repercussão sistêmica, pois facilita a difusão das toxinas da peçonha nos tecidos. A hialuronidase hidrolisa ligações glicosídicas internas de mucopolissacarídeos, como ácido hialurônico e sulfato de condroitina (Stern e Jedrzejewski, 2006).

As L-aminoácidos oxidase (110 – 150 KDa) são enzimas catalizadoras da deaminação oxidativa de L-aminoácidos em α -cetoácido gerando amônia e peróxido de hidrogênio. Na peçonha, seus efeitos biológicos estão ligados a ação do peróxido de oxigênio, um dos responsáveis pela apoptose celular. As L-aminoácidos oxidase tem ação hemorrágica, hemolítica, citotóxica, indução à apoptose, atividade antitumoral, atividade antibiótica, antiparasitária e antiviral (Costa et al., 2015).

A enzima 5' nucleotidase catalisa a hidrólise do fosfato esterificado do carbono 5' de ribose e desoxirribose. Esta fosfomonoesterase tem ação anticoagulante que pode ser potencializada na presença de outras peptídeos (Fox, 2013).

As fosfodiesterases são endonucleases que hidrolisam ligações fosfodiéster clivando DNA e RNA liberando 5' mononucleotídeos. Atuam em processos como diferenciação celular, apoptose, contração muscular e inflamação (Fox, 2013).

2.3.1 Peçonhas de Raias

Os acidentes com raias dulcícolas parecem ser mais graves quando comparados com as raias marinhas, devido ao fato das lesões por raias de água doce desenvolver necrose com mais frequência. Porém, sintomas como dor intensa e as infecções bacterianas são comuns em ambos os casos. (Haddad Jr., 2000)

Poucos estudos sobre as atividades tóxicas da peçonha do ferrão e das toxinas do muco das raias de água doce têm sido desenvolvidos. A falta de dados é principalmente, devido à dificuldade em extrair o material da peçonha, além de ser muito difícil e perigoso capturar os animais. A quantidade da peçonha do ferrão de muco do dorso do animal é muito baixa, e é termolábil (Aguiar e Valentin, 2010; Baumann *et al.*, 2014; Haddad *et al.*, 2004)

Os trabalhos dedicados ao estudo das raias de água doce estão voltados a compreender o mecanismo de ação e caracterização dos compostos responsáveis pelas manifestações clínicas das vítimas, considerando como peçonha o material obtido da raspagem do ferrão e muco o produto obtido pela raspagem do dorso ou cauda. Dentre as espécies existentes, apenas os gêneros *Potamotrygon* e *Plesiotrygon* tiveram suas toxinas estudadas (Thomazi, 2016).

Estudos realizados para compreender os efeitos biológicos causados pelo material obtido do raspado da peçonha das raias fluviais foram feitos utilizando modelo animais. O material obtido da peçonha da raia *Potamotrygon falkneri* provocaram edema, reação inflamatória, miototoxicidade, dermonecrose e nocicepção. (Antoniuzzi, 2011; Barbaro, *et al.*, 2007).

O muco e o material obtido da peçonha da *Potamotrygon motoro* apresentou toxicidade para células epiteliais humanas, rabdomiólise sistêmica e resposta inflamatória (Domingos *et al.*, 2011; Lameiras *et al.*, 2014; Kimura, 2014 e 2015)

O muco e o raspado do ferrão da raia *Potamotrygon henlei* apresentam atividade edematogênica, nociceptiva e proteolítica e o grau de toxicidade varia de acordo com o sexo e o período ontogenético do peixe. Testes apenas com o muco comprovaram efeitos antimicrobianos e resposta inflamatória (Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2011; Monteiro-dos-Santos, 2012)

Plesiotrygon iwamae apresentou rabdomiólise sistêmica e inflamação induzida pelo muco (Lameiras *et al.*, 2014).

Ao comparar a toxicidade obtida da peçonha das espécies *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi* observou-se diferenças na intensidade das atividades edematogênica e nociceptiva. Também foi detectado que o muco potencializa a ação tóxica da peçonha (Magalhães *et al.*, 2006)

Com o intuito de identificar os componentes moleculares responsáveis pela ação tóxica do material da peçonha e do muco, estudos foram realizados principalmente com o material obtido da peçonha das espécies *P. falkneri*, *P. motoro* e *P. henlei* que detectaram fosfolipases, fosfatases ácidas, hialuronidases e peptidases com ação sobre caseína, gelatina e elastina. Apesar de testada, não apresentaram atividade fosfodiesterase (Magalhães *et al.*, 2006; Barbaro *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008, Monteiro-dos-Santos *et al.*, 2011).

Dois peptídeos foram isolados a partir da peçonha de *P. orbignyi* denominados Orpotrin e Porflan. O primeiro mostrou efetivo na microcirculação, causando forte vasoconstrição. Já Porflan parece atuar nos fosfolipídios de membrana, sugerindo envolvimento direto no processo inflamatório da lesão provocada pela raia (Conceição *et al.*, 2006 e 2009).

A presença das enzimas encontradas na peçonha e no muco das raias contribui para rápida difusão dos componentes moleculares do material inoculado e altera a homeostase da matriz extracelular contribuindo para a manutenção dos processos inflamatórios por longos períodos e para a evolução dos processos necróticos (Pukrittayakamee *et al.*, 1988).

Na maior parte dos trabalhos, a identificação da massa molecular das proteínas bioativas do muco e da peçonha de raias foi realizada através do método de eletroforese SDS-Page os resultados foram descritos na Tabela 01 (Thomazi, 2016).

Tabela 1– Relação das massas moleculares das proteínas da peçonha e muco de raias Potamotrygonidae e atividade proteolítica

Autores	Espécie/amostra	Eletroforese (SDS-Page)	Atividade Proteolítica
Haddad Jr. et al., 2004.	<i>Potamotrygon falkneri</i> (peçonha)	12, 25 e 70kDa.	<u>Caseinolítica</u> : entre 200 e 100kDa. <u>Gelatinolítica</u> : entre 200 e 80kDa. <u>Hialuronidásica</u> : 84kDa.
Magalhães et al., 2006.	<i>Potamotrygon scobina</i> (peçonha)	15, 25, 45kDa.	
MonoQ	<i>Potamotrygon orbignyi</i> (peçonha)	15, 25, 45 e 66kDa.	
Barbaro et al., 2007.	<i>Potamotrygon falkneri</i> (peçonha)	18 e 22kDa; entre 43 e 84kDa.	<u>Caseinolítica</u> : 83kDa. <u>Gelatinolítica</u> : 83kDa. <u>Hialuronidásica</u> : entre 41 e 65kDa. <u>Fibrinogenolítica</u> : 83kDa.
Magalhães et al., 2008.	<i>Potamotrygon motoro</i> (peçonha)		<u>Hialuronidásica</u> : 79kDa.
Monteiro-dos-Santos et al., 2011.	<i>Potamotrygon henlei</i> (peçonha e muco)	15, 40, 50 e 70kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : entre 18 e 60kDa.
Lameiras et al., 2014.	<i>Potamotrygon motoro</i> (muco dorso)	10, 15, 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : 6, 41 e 58kDa.
	<i>Potamotrygon motoro</i> (muco ferrão)	10, entre 27 e 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : acima de 58kDa.
	<i>Plesiotrygon iwamae</i> (muco dorso/ferrão)	16, entre 15 e 20, 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : 6 e 40kDa.

Fonte: Tomazi, 2016.

Os componentes bioativos caracterizados nas peçonhas de peixes têm despertado interesse, pois representam uma ampla fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas (Church e Hodgson, 2002; Barbaro *et al.*, 2007).

O presente trabalho retrata com exclusividade a investigação de preliminar de toxinas do muco de água doce a *P. aiereba*, com o propósito de contribuir para elucidação do modo de ação da peçonha nas vítimas de ictismo por este animal.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal caracterizar bioquimicamente, de forma preliminar e inédita, a peçonha da raia *Paratrygon aiereba*, e como objetivos secundários:

- Comparar o perfil proteico do muco produzido no dorso do animal com o material produzido no ferrão da raia *P. aiereba*;
- Identificar atividade enzimática de peptidases no muco epidérmico de raia *P. aiereba*;
- Identificar atividade enzimática de fosfolipases no muco epidérmico de raia *P. aiereba*;
- Testar preliminarmente a atividade microbiana dos componentes do muco de raia *P. aiereba*.
- Identificar peptídeo com características similares a β -defensina no muco de raia *P. aiereba*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das raias

Foram coletadas raias *Paratrygon aiereba* (n=17) no Ribeirão do Carmo, afluente do rio Tocantins e no reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães (Lajeado) ambos no município de Porto Nacional – TO, coordenadas geográficas: 10°42.17.41"S48°30.23.62"O; e 10°41.59.73"S 48°26.18.55"O, respectivamente.

A coleta dos animais foi realizada sob amparo da licença ambiental nº 6781-1/2014 concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Todos os animais capturados foram depositados na Coleção de Peixes do Laboratório de Ictiologia Sistemática da Universidade Federal do Tocantins (UFT) campus da cidade de Porto Nacional – TO, sob o tombo UNT-14304.

4.2 Obtenção e processamento das amostras de muco e da peçonha

Os peixes foram transferidos vivos do seu habitat para uma caixa com gelo. A extração do muco e da peçonha de raias *Paratrygon* foi realizada no Laboratório de Ictiologia da UFT/Porto Nacional – TO e no laboratório de Pesquisa da FAPAC/ITPAC Porto por meio de raspagem do epitélio que recobre o dorso (muco) e extração do ferrão (peçonha) (Monteiro-dos-Santos et al., 2011).

Foi formado um *pool* do muco e um *pool* do material coletado da peçonha de todas as raias capturadas anualmente. Nos anos de 2014 e 2015, as amostras foram diluídas em água de injeção e centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm (161 G) e o sobrenadante foi filtrado à vácuo com filtro de 8 µm e depois com filtro de seringa de 0,22 µm. O material foi armazenado a - 20°C até o momento do uso. Em 2016, as amostras foram submetidas aos mesmos passos de processamento, exceto a filtração à 0,22 µm.

Os experimentos foram conduzidos a partir do *pool* do raspado da peçonha e do *pool* do muco extraído de todas as raias capturadas, independente de variações de gênero, idade e tamanho.

Nos trabalhos publicados sobre raias considera-se peçonha como o produto obtido a partir da raspagem do ferrão do animal, e o muco, aquele produto obtido pela raspagem do epitélio do dorso ou da cauda.

4.3 Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelos seguintes métodos: Bradford (1976) e leitura no aparelho Nanovue (NanoDrop 2000, ThermoScientific, USA).

O método de Bradford foi utilizado para verificar a concentração de proteínas da peçonha e muco total, utilizando albumina bovina como padrão. Em um tubo de ensaio 100 μ L da amostra foi diluído em 3 mL de solução de Bradford. Após a incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente foi realizada a leitura da absorbância das amostras a 595 nm. Os testes foram realizados em triplicata e foi considerada a média dos resultados.

A dosagem da concentração de proteínas dos picos coletados foi realizada no aparelho Nanovue. Foi analisado no aparelho 2 μ L de amostra, este volume equivale a 1mg/mL. A água destilada foi utilizada como branco.

4.4 Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a realização desta cromatografia foi injetado 0,6 mL do muco dissolvido em tampão Bicarbonato de Amônio 100mM, em uma coluna Superdex 75 10/300 GL conectada a um sistema Äkta *purifier*, previamente equilibrada com o tampão acima. O fluxo foi de 0,5 mL/min e a absorvância do eluato foi monitorada a 220 e 280 nm. Foram coletadas frações de 0,5 mL.

4.5 Cromatografia de Troca Iônica

O pico 1 colhido na cromatografia de exclusão molecular foi submetido à Cromatografia de Troca Iônica. Foram utilizados 3 mg da amostra dissolvidos em 0,6 mL de tampão TRIS 25mM, pH8,0. O material foi injetado em coluna Mono Q 5/50 GL previamente ambientada com tampão TRIS 25mM, pH8,0. O gradiente foi realizado de 0 a 50% de tampão TRIS 25mM NaCl 2M, pH8,0, em um fluxo de

1 mL/min. A absorbância do eluato foi medida em 220 e 280 nm. Foram coletadas frações de 1 mL.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis*)

Foi realizada a separação das proteínas da peçonha por eletroforese SDS-PAGE, para analisar o grau de pureza das proteínas e determinar a massa molecular, conforme método de Laemmli (1970).

O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 4% de poliacrilamida e para o gel de separação utilizou-se 12% de poliacrilamida. Para polimerização foram utilizados agentes catalizadores persulfato de amônio e N, N, N, N-tetrametil etilenodiamina – TEMED)

As amostras foram diluídas em um tampão de amostra (glicerol, SDS 10%, Tris, 1 M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidas à 70°C por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese sob uma voltagem de 90V.

Após a eletroforese os géis foram corados com solução corante nitrato de Prata e Coomassie Blue G-250 de Neuhoﬀ modificada, conhecido como *Blue Silver*, coloração mais rápida e mais sensível que a coloração clássica de Coomassie (Candiano *et al*, 2004)

4.7 Zimografia

O ensaio de zimografia foi utilizado para análise da atividade proteolítica utilizando gelatina e caseína como substrato. O experimento consiste em uma eletroforese das amostras em um sistema SDS PAGE, que inclui substrato no gel de separação. Após a eletroforese e incubação por 16 horas, os géis foram corados com solução corante Coomassie Blue G-250 (*Blue Silver*) e com nitrato de Prata.

4.8 Avaliação da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica do muco foi avaliada seguindo o protocolo descrito por Holzer e Mackessy (1996). Para a realização do experimento foi utilizado 5µg de proteínas do muco bruto processado; 5µg de proteínas do

veneno de *Bothrops jararaca* usado como controle positivo; solução tampão Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, 100 mM NaCl em pH 8,0 e 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico (4N3OBA) a 1mg/mL diluído em 3,0 mM de Acetonitrila foi usado como substrato. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro Beckman DU 7400 em 425 nm a 37°C, em 60 e 148 min. O ensaio com o muco e do controle positivo foi realizado em triplicata e a média dos resultados foi calculada, subtraindo o valor do branco. O aumento da absorbância de 0,10 UA a 425 nm é equivalente a 25,8 nmoles de liberação de cromóforo.

4.9 Ensaios antimicrobianos

As bactérias utilizadas no experimento foram *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. As culturas das bactérias citadas foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) Agar 1,5%. O repique ocorre semanalmente em meio LB líquido, por 18 horas, 37°C, a 120 RPM em agitador orbital. Para quantificar as bactérias, a relação foi de 1 O.D. (600 nm) = 8×10^8 células/mL (Sambrook, 1989).

Para a avaliação preliminar de atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de ágar-difusão (Bauer & Kirby, 1966). O método foi adaptado, para utilizar a difusão em gota, ao invés de usar difusão em disco. O teste consiste na aplicação de 10 µL do peptídeo antimicrobiano a ser testado, em uma concentração de 10 mg/mL, utilizando como diluente das amostras e controle negativo ácido glacial 0,01%.

Para a realização do ensaio, foi produzido um inóculo em meio LB líquido e as bactérias foram mantidas por 18 horas (*overnight*). Para monitorar o crescimento bacteriano, leituras em 600 nm foram realizadas e pelo valor da densidade óptica obtido foi possível rastrear a fase de crescimento exponencial (fase log), já estabelecido em estudos prévios, de acordo com as curvas de crescimento para cada espécie.

A placa de petri foi preparada com a adição de 1 mL do inóculo em 9 mL de ágar LB (1%) e a mistura foi homogeneizada cuidadosamente. Após a solidificação do meio, as frações foram diluídas em ácido acético glacial 0,01% e 10 µL de cada amostra foi aplicada sob a placa e incubada por 18 horas a 37°C.

A atividade antimicrobiana da amostra foi detectada pela observação de halos no Ágar, indicando de forma qualitativa a inibição do crescimento bacteriano.

4.10 Análise por MALDI/TOF da massa molecular do pico 7 colhido no ensaio cromatográfico de exclusão molecular da amostra do Muco de *P. aiereba*

O Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto Butantan sob supervisão do Dr. Daniel Carvalho Pimenta realizou as análises para a identificação da massa do peptídeo. O material foi analisado por espectrômetro de massas tipo MALDI/TOF (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz) em modo linear positivo. A amostra foi diluída em 0,1% de ácido acético em água deionizada e uma alíquota da amostra diluída foi cristalizada com uma solução saturada de acetonitrila (ACN)/água/0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil das proteínas do muco e da peçonha do ferrão da *P. aiereba*

Para iniciar o processo de caracterização do perfil proteico da peçonha e do muco da *P. aiereba* foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e empilhamento a 4% corado com nitrato de prata. Foram aplicadas no gel 10 µg de proteínas das amostras do raspado de muco do dorso da raia e raspado do ferrão devidamente processados. As duas amostras apresentam um perfil protéico similar, porém as bandas da amostra do muco se apresentaram mais visíveis que as bandas referentes à amostra do ferrão, com exceção da banda com massa molecular de aproximadamente, 12 KDa. Foram visualizados componentes variando entre 8 e 100 KDa. (figura 06).

Para a realização do segundo gel, o ferrão foi congelado em nitrogênio líquido, macerado e foi ressuspendido no tampão de amostra. Foi analisado o perfil de proteínas de amostras de muco filtradas a vácuo no filtro de 8 µm, e de amostras de filtrado a 0,22 µm. As amostras da base do ferrão e da ponta do ferrão coletadas em anos diferentes foram aplicadas 6 µg de proteínas. Nas amostras do ferrão foram visualizadas inúmeras bandas o que inviabilizou a leitura do gel. Este fato pode ser atribuído a outras proteínas da estrutura óssea do ferrão além da peçonha.

Figura 6 – Análise por SDS – PAGE de toxina usando um gel de poliacrilamida 12%. M: Padrão de Massa Molecular (Kda); Muco: material raspado do dorso do animal; Peçonha: material raspado do ferrão.

5.2 Dosagem de proteínas

A tabela 02 mostra dados da dosagem de proteínas realizada pelo método de Bradford (1976) em amostras de muco coletadas em diferentes anos. Foi observado que a dosagem de proteínas do muco filtrado a 0,22 μm em anos diferentes tiveram resultados muito próximos, isto mostra, que as proteínas não degradaram ao longo dos anos e que o processamento das amostras tem reprodutibilidade. A concentração de proteínas no material coletado apenas no filtro de 8 μm é quase o dobro da concentração de proteínas encontradas nas amostras 0,22 μm , mostrando que o filtro apesar de esterilizar o material, retira proteínas dele. Dessa forma, o material escolhido para desenvolver este trabalho foi o muco filtrado a 8 μm a vácuo. O material coletado nos anos de 2014 e 2015 foi utilizado pelo grupo em outros experimentos.

Tabela 2 - Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) do muco de *P. aiereba* coletadas em diferentes anos congelados a -20°C

Amostra	Abs (595 nm)	Resultado (µg/mL)
Muco filtrado com filtros de 8 µm e 0,22 µm coleta ano 2014	0,200	359,920
Muco filtrado com filtros de 8 µm e 0,22 µm coleta ano 2015	0,205	369,535
Muco filtrado apenas com filtro à 8 µm a vácuo ano 2016	0,363	673,369

Fonte: a autora.

5.3 Caracterização proteica

Na cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL foram injetados 9 mg de muco epidérmico de *P. aiereba*. As frações foram separadas em treze picos que foram congeladas a -80°C e liofilizados. Ao observar o cromatograma, vê-se que o sétimo pico tem alta condutividade e representa aproximadamente 8% da área total do cromatograma (Figura 07).

Figura 7– Cromatografia de exclusão molecular de 9 mg de muco de *Paratrygon aiereba*, diluídos em 0,6 mL de bicarbonato de amônio 100mM. Foram injetados 0,6 mL da amostra em uma coluna Superdex 75 10/300GL, com um fluxo de 0,5ml/minuto. Absorvância no UV verificada a 280 nm.

Os picos coletados foram submetidos a uma eletroforese em gel SDS Page 12% para análise do grau de pureza das frações e identificação de bandas (figura 8). Na coloração com Coomassie foram observadas proteínas nos três primeiros picos, já com a coloração de nitrato de prata, técnicas de coloração mais sensível, as bandas são observadas até o quinto pico. Proteínas com massa molecular abaixo de 116 KDa foram visualizadas no gel.

Figura 8 – Gel SDS PAGE 12% das frações coletadas da Exclusão Molecular. Foi aplicado 30 μ L de amostra em cada poço. M; padrão de massa molecular (KDa) A e B: gel corado com Coomassie. C e D: gel corado com nitrato de prata

5.4 Atividade Proteolítica

Amostra do muco total e de todos os treze picos coletados da coluna de exclusão molecular foram submetidos à zimografia tendo gelatina (Figura 9A) e caseína (Figura 9B) como substratos. Nas duas condições, foram observadas presença de componentes com atividades proteolíticas nos três primeiros picos.

No zimografia tendo gelatina como substrato, foram detectadas pelo menos três proteínas com atividade proteolítica, duas com massa molecular entre 66,2 e

45 KDa e uma banda difusa com massa molecular de aproximadamente 45 KDa (figura 9A).

Na zimografia com caseína como substrato, várias bandas abaixo de 116 KDa foram visualizadas, elas foram mais evidentes no primeiro pico coletado na cromatografia de exclusão molecular.

Figura 9 – Zimografia dos picos coletados na cromatografia Exclusão molecular. C+: veneno de *Bothrops jararaca* (2mg/mL). As bandas claras indicam as regiões de atividade hidrolítica. A: Zimografia com gel em gelatina. B: Zimografia com gel em caseína.

O muco bruto filtrado de *P. aiereba* foi submetido ao ensaio enzimático para avaliar atividade fosfolipásica segundo o método descrito por Holzer e Mackessy (1996). No ensaio, o muco reagiu com o substrato liberando 14,47 nmoles de cromóforo em 60 minutos e 20,037 nmoles de produto em 148 minutos, confirmando a atividade fosfolipásica A₂ do muco de *P. aiereba*.

Tabela 3 – Atividade fosfolipásica do muco bruto filtrado, segundo o método descrito por Holzere Masckessy (1996)

Amostras	Atividade (nmoles/60 minutos)	Amostras	Atividade (nmoles/128 minutos)
Controle positivo	27,864	Controle positivo	30,444
Muco	14,470	Muco 1	20,037

Fonte: a autora.

Devido ao pico 1 colhido do HPLC de exclusão molecular ter apresentado maior atividade gelatinolítica e caseinolítica, ele foi submetido a cromatografia de troca aniônica; 3 mg de proteína desta amostra foi diluída em 0,6 mL do tampão A (Tampão TRIS 25 mM pH 8,0) e injetada numa coluna Mono Q (Figura 10). A coluna tem o seu gel carregado com cátions (carga positiva), possui assim, afinidade por proteínas com carga negativa. A eluição foi realizada com adição de tampão com alta concentração de sal. O tampão A constituía-se de Tris HCl 50 mM pH 8,0. Após dez minutos foi introduzido o tampão B (Tris HCl 50 mM + 2M NaCl pH 8,0) o qual atingiu 50% de sua concentração em 30 mL. As frações foram separadas em 6 picos e foi analisado em SDS PAGE 12%. A cromatografia de troca iônica não favoreceu o isolamento das proteínas com atividade proteolítica para estudo.

Figura 10 – Cromatografia, em coluna de troca iônica, do primeiro pico da coluna de exclusão molecular (3 mg/mL). Tampão A (Tris HCl 25 mM pH 8,0). Após dez minutos foi introduzido o tampão B (Tris HCl 25 mM + 2M NaCl pH 8,0). Fluxo 0,5 mL/min. 1 mL/tubo. Mono Q fração 1 220nm 280nm.

Na cromatografia de exclusão molecular do muco, o sétimo pico eluído apresentou alta condutividade e foi submetido a uma avaliação preliminar da atividade antibacteriana. A amostra foi testada contra cepas de bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Um halo de inibição muito discreto foi observado na placa com cepas de *Micrococcus luteus*, porém não nítido em imagens fotográficas. Pelo ponto em que este pico foi eluído na cromatografia de exclusão molecular esta proteína tem baixa massa molecular.

O pico com alta condutividade coletado na cromatografia de exclusão molecular teve sua massa molecular analisada em espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF e apresentou baixa massa molecular, 4.907,8 Da e alto grau de pureza (Figura 11).

O material que compõe o sétimo pico coletado na cromatografia de exclusão molecular apresenta elevada condutividade, baixa massa molecular e inibiu o crescimento da cepa de *Micrococcus luteus*, estas características são similares a β -defensinas.

Figura 11 – Análise da massa molecular do pico de alta condutividade da cromatografia de Exclusão molecular por espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF.

6. DISCUSSÃO

Na região norte do país, as raias são responsáveis por acidentes graves associados à dor intensa, eritema, edema, necrose, sem tratamento eficaz e que na maioria dos casos causam incapacidade física temporária e/ou permanente (Haddad, 2004). Nos últimos anos, foram realizados trabalhos com raias de água doce apenas do gênero *Potamotrygon* e *Plesiotrygon* que objetivaram a identificação dos mecanismos de ação e a identificação e caracterização dos compostos responsáveis pelo quadro clínico do envenenamento por estes animais. Não há registro na literatura de trabalhos neste âmbito sobre o gênero *Paratrygon*, mesmo sendo este, um peixe comum na bacia Tocantins-Araguaia.

Com o objetivo de caracterizar preliminarmente as toxinas do muco e peçonha da raia *Paratrygon aiereba*, amostras de ambos os materiais foram aplicados em um gel SDS PAGE 12% (Figura 8). Neste procedimento, o perfil protéico da peçonha apresenta proteínas de massa molecular aproximadamente entre oito e 100 KDa. As proteínas com bandas mais expressivas apresentaram massa de aproximadamente 8 KDa e 12 KDa. Haddad e colaboradores (2004) ao analisar o perfil protéico em gel SDS PAGE 12% da peçonha de *Potamotrygon falkneri*, também observaram que a proteína com maior banda tinha uma massa aproximada de 12 KDa. Estudos comparativos, entre as duas proteínas com mesma massa molecular encontrada na peçonha de raias de diferentes gêneros, poderiam confirmar se esta proteína é comum interespecies.

Utilizando a técnica de eletroforese em gel SDS PAGE, Haddad e colaboradores (2004), além da proteína de 12 KDa, identificaram mais duas proteínas (25 e 70 KDa) na peçonha da raia *Potamotrygon falkneri*. Magalhães et al. (2006) também observaram proteínas (15, 25 e 45 KDa) na peçonha de *Potamotrygon scobina* e quatro proteínas (15, 25, 45 e 66 KDa) na peçonha da raia *Potamotrygon orbignyi*. Barbaro et al. (2007) identificaram três proteínas na peçonha da raia *Potamotrygon falkneri* (18, 22 KDa e uma terceira variando a massa molecular entre 43 e 84 KDa). Na peçonha da raia *Paratrygon aiereba* foram observadas proteínas de massa molecular entre oito e 100 KDa corroborando com os resultados encontrados na literatura, em que as proteínas

identificadas na peçonha das raias de água doce, tem massas moleculares variando entre 12 e 85 KDa.

Ao comparar o perfil protéico do muco com o perfil protéico da peçonha no mesmo gel SDS PAGE 12% (Figura 8), observa-se que eles são similares, sugerindo que o muco também possui componentes deletérios.

Vários trabalhos descrevem atividade tóxica do muco das raias. Monteiro-dos-Santos et al. (2011) observaram sintomas do envenenamento em camundongos inoculados com o muco *Potamotrygon henlei*. O muco e a peçonha da raia *Potamotrygon henlei* também apresentaram perfil protéico semelhantes entre si. Em ambos os perfis, observa-se a presença de mediadores vasoativos derivados de grânulos de mastócitos liberados de células inflamatórias participantes do início do processo inflamatório. Magalhães et al. (2006) verificaram que o muco das raias *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi* potencializaram a ação necrotizante quando inoculado em camundongos juntamente com o material obtido das suas respectivas peçonhas. Já foram identificados peptídeos com atividade antimicrobiana no muco de animais aquáticos isso seria um mecanismo de defesa desses animais já que os mesmos vivem sob constante ataque de microrganismos. Thomazi (2017) verificou que o muco e o material da peçonha da raia *P. aiereba* são imunogênicos, visto que apresentaram reação antigênica cruzada e que o muco estimulou resposta imune celular e humoral.

Os estudos citados acima evidenciam os efeitos nocivos do muco. Este fato aliado à facilidade do procedimento de coleta do mesmo e a quantidade de amostra coletada contribuíram para que o muco epidérmico da *P. aiereba* fosse escolhido como objeto de estudo neste trabalho.

A cromatografia de exclusão molecular por gel filtração foi o procedimento escolhido para o fracionamento do muco por separar moléculas pelo tamanho. Neste processo foram observados treze picos. O sétimo pico apresentou elevada condutividade e corresponde a oito por cento da área total do cromatograma.

A cromatografia de exclusão molecular do muco de *P. aiereba* apresenta padrão cromatográfico pouco semelhante aos perfis cromatográficos de muco de raias de outros gêneros quando submetido ao mesmo tipo de

fracionamento. Ensaios de purificação do material da peçonha e do muco de *Potamotrygon* empregando técnicas cromatográficas são descritas por Conceição et al. (2006; 2011) que detectaram, por cromatografia líquida de fase reversa, no material da peçonha de *P. orbignyi* picos não encontrados por Monteiro-dos-Santos et al. (2011) na *P. henlei*, corroborando com a existência de constituintes diferentes entre peçonhas de animais interfamiliar, intergêneros, inter e intraespécies e individualmente.

Grande parte dos pesquisadores dedicados ao estudo de componentes tóxicos do muco e da peçonha de raia de água doce optou por fracionar seu material de estudo utilizando a técnica de cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). Este procedimento tem sido a primeira escolha para isolar moléculas de baixa polaridade, como peptídeos, que normalmente estão envolvidos nos processos bioativos (Conceição, 2006; Conceição, 2009; Conceição, 2012; Lanças, 2010; Monteiro, 2011). Este trabalho tem objetivo de identificar moléculas no muco de *P. aiereba* com atividades tóxicas, independente da sua massa molecular, por isso a técnica de cromatografia de exclusão molecular foi empregada.

Os 13 (treze) picos coletados do procedimento anterior foram congelados a -80°C , liofilizados e submetidos à eletroforese em gel SDS PAGE a 12% corados com nitrato de prata. Foram visualizadas bandas proteicas apenas nos cinco primeiros picos.

Em cromatografia de exclusão molecular, as primeiras moléculas a serem coletadas são as de maior massa molecular devido à característica fase estacionária. Quando submetido à eletroforese, as proteínas de menor massa que se encontram nos últimos picos migram mais rapidamente entre a malha do gel de eletroforese, sendo eliminadas no tampão de corrida e muito provavelmente por isso não foram visualizados no gel de poliacrilamida a 12% sob condições desnaturantes.

No gel SDS PAGE a 12% foram visualizados nos cinco primeiros picos coletados da cromatografia de exclusão molecular componentes abaixo de 116 KDa, aproximadamente. Apesar de a amostra apresentar banda com maior massa molecular, o resultado corrobora com grande parte dos trabalhos que se dedicaram ao estudo protéico do muco de raias de água doce. O perfil protéico do

muco da raia *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae* apresentaram massa molecular variando entre 10 e 41 kDa e entre 16 e 41 KDa, respectivamente (Lameiras et al., 2014). Monteiro-dos-Santos et al. (2011) identificaram proteínas no muco de *Potamotrygon henlei* com massa molecular entre 15 e 70 kDa.

O muco bruto filtrado e os 13 picos coletados no processo de cromatografia de exclusão molecular foram submetidos à zimografia em gel polimerizado com gelatina a fim de identificar proteínas com atividade gelatinolítica (figura 9A) e à zimografia com gel na presença de caseína com o intuito de observar proteínas com atividade caseinolítica (figura 9B). Foram visualizadas pelo menos três proteínas com atividade gelatinolítica, sendo duas com massa molecular aproximada entre 66,2 e 45 KDa e uma com massa molecular de aproximadamente 45 KDa. Várias proteínas com atividade caseinolítica com diferentes massas moleculares foram observadas.

Proteínas e peptídeos de diversos tamanhos com atividade gelatinolítica já foram descritas tanto na peçonha quanto no muco de várias espécies de raias de ambiente dulcícola. Moléculas com tal atividade foram descritas na peçonha da *Potamotrygon falkneri* com massa molecular variando entre 200 e 80 KDa (Hadad Jr. et al, 2004), e 83 KDa (Barbaro et. al, 2007); na peçonha e no muco de *Potamotrygon henlei* com massa molecular entre 18 e 60 KDa (Monteiro-dos-Santos, et al., 2011); e nos mucos de *Potamotrygon motoro* com massa molecular de 6KDa, 41 KDa, 58 KDa e variando entre 42 e 58 KDa; e *Plesiotrygon iwamae* com massa molecular de 6 KDa, 15KDa e 40 KDa (Lameiras et. al, 2014)

Proteínas com atividade caseinolítica tinham sido identificadas apenas na peçonha de raia *Potamotrygon falkneri* (Hadad Jr. et al, 2004; Barbaro et. al, 2007), sendo inédito, a identificação de enzimas caseinolíticas no muco de raia de água doce.

Vários efeitos fisiopatológicos do envenenamento são atribuídos às enzimas presentes na composição da peçonha. Nas lesões causadas por arraias de água doce, além da intensa dor local, são características comuns: a edema, eritema, flacidez tissular ao redor da lesão, formação de úlcera, necrose e a cicatrização lenta. Esses eventos sugerem distúrbios da matriz extracelular. Segundo Gutiérrez e Rucavado (2000), as collagenases, elastases e gelatinases são as metaloproteínases mais comumente isoladas nas peçonhas de animais.

Essas enzimas tem papel importante na resposta inflamatória local pois degradam colágeno, fibronectina, proteoglicana e laminina, componentes importantes da matriz extracelular e membrana basal.

Oliveira Jr. (2014) identificou em células do ferrão das raias *P. falkneri* e *P. motoro* transcritos de metaloproteínases como: collagenases; gelatinases capazes de degradar a matriz extracelular, proteínas de monócitos quimioatrativos, pro-TNF- α , pro-IL-1 β , pro-IL-8; estromalisina capaz de degradar colágeno tipo IV, V, IX e X, proteoglicanas, fibronectina, laminina e fibrilina-1.

O muco bruto filtrado também foi submetido ao ensaio de atividade fosfolipásica A₂ (Figura 11) e apresentou uma atividade importante nos tempos de 60 minutos e 128 minutos, considerando o controle positivo o veneno de *Bothrops jararaca*. Barbaro et al. (2007) identificaram uma atividade fosfolipásica A₂ mínima somente nas peçonhas de raia de água doce *Potamotrygon falkneri* e *Dasyatis guttata*, raia marinha. Portanto, é a primeira vez que se constata atividade fosfolipásica A₂ significativa no muco de raia de água doce.

Samy (2012) afirma que as fosfolipases A₂ têm atividade catalítica sobre os fosfolipídios de membrana celular em alguns tecidos, o que justifica sua ação tóxica. As fosfolipases A₂ são enzimas hidrolíticas que atuam nos fosfolipídios liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado, precursor das prostaglandinas e tromboxanos. Essas moléculas são responsáveis por várias atividades biológicas como: contração do músculo liso, bronquioconstrição, permeabilidade vascular aumentada, aumento da quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares, liberação de enzimas lisossômicas e adesão dos leucócitos (Harvey, 2014)

Magalhães e Cols (2006) observaram aumento considerável de leucócitos que rolam e aderem ao endotélio do cremaster de camundongos, e necrose, quando estes foram expostos as peçonhas de *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi*. Neste estudo, as alterações fisiológicas potencializaram quando as peçonhas das referidas espécies foram inoculadas juntamente com seus respectivos mucos, evidenciando a ação tóxica do muco.

Conceição et al. (2006; 2011; 2012) isolaram e caracterizaram dois peptídeos da peçonha de *Potamotrygon orbignyi* denominado Orpotrin e Porflan. Sem semelhança com qualquer peptídeo bioativo, Orpotrin tem efeito

vasoconstritor de arteríolas e Porflan age na promoção no recrutamento e aderência de leucócitos na microcirculação em modelos animais.

Segundo Oliveira Jr. (2014), as enzimas fosfolipases A₂ também são conhecidas por bloquearem as transmissões neuromusculares e induzirem a lesão muscular aguda no local da lesão provocada pela ferroadada das raia. Monteiro-dos-Santos et al. (2011) verificaram atividade miotóxica no muco de raia *P. falkneri*.

Segundo Haddad (2004), entre os tratamentos caseiros realizados pelos ribeirinhos logo após a ferroadada, o mais eficaz é imergir o ferimento provocado pelo ferrão da raia em água quente. Este procedimento desnaturaria as proteínas presentes na peçonha, reduzindo sua bioatividade e consequentemente amenizando os sintomas do envenenamento. Magalhães e Cols (2006) ao testar a ação da peçonha de espécies de *Potamotrygon* em camundongos observaram que as respostas edematogênicas e nociceptivas foram reduzidas quando o material obtido da peçonhas foi incubado 56 °C antes de ser aplicado no animal.

Pelo menos parte da atividade tóxica do muco se deve à ação das proteínas bioativas encontradas: gelatinolinasas, caseinolases e fosfolipases A₂ encontrada no muco de *P. aieriba*. Os ferrões das raia causam ferimentos dolorosos, edema, necrose; e o muco que recobre todo o corpo desses peixes pode aumentar a gravidade desses ferimentos.

Além de peptídeos, foi identificado na amostra de muco de *P. Aieriba* um peptídeo bioativo. O sétimo pico eluído na cromatografia de exclusão molecular apresentou elevada condutividade e teve sua atividade antimicrobiana testada contra cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. A amostra apresentou um fraco halo de inibição na presença de *Micrococcus luteus*, indicando que na fração testada há molécula com atividade antimicrobiana.

Peptídeos antimicrobianos foram identificados no muco presente em epitélio de peixes e podem desempenhar papel significativo na defesa do hospedeiro. As superfícies mucosas estão continuamente expostas a organismos potencialmente patogênicos, porém a incidência de doenças infecciosas é

relativamente baixa (Bevins, 1994, Thomson et al., 1987, Mozumder, 2005; Hellio et al., 2002, Subramanian, 2008).

As raias vivem em covas rasas dos rios, em regiões lamacentas e arenosas. O habitat é propício para o desenvolvimento de microrganismos no dorso desses animais, e por isso, a presença moléculas antimicrobianas no muco do dorso desses peixes os protegeriam de infecções.

Monteiro-dos-Santos et al. (2011) e Conceição et al. (2012) comprovaram a atividade antimicrobiana do muco de *Potamotrygon henlei*. O muco inibiu o crescimento da levedura *Candida albicans*. Uma proteína do muco foi isolada, a qual é similar à cadeia beta da hemoglobina e se mostrou ativa contra *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*.

Domingos et al. (2011) analisaram o muco de *Potamotrygon motoro* e a água do rio onde foram pescadas, e detectaram a presença de bactérias potencialmente patogênicas e multirresistentes. Estas bactérias podem causar infecção secundária severa em feridas causadas pelas ferroadas das raias.

O ferrão e muco contaminados, normalmente introduzem na vítima no momento da ferroadada, microrganismos causando infecções bacterianas. *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.* são comumente associados a essas lesões e resultam no desenvolvimento de necrose (Haddad, 2000).

O pico com elevada condutividade e atividade antimicrobiana a *Micrococcus luteus* teve sua massa molecular analisada em espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF e apresentou massa molecular de 4.907,8 Da e alto grau de pureza (Figura 11). Este peptídeo antibacteriano (PAMs) isolado tem características compatíveis ao peptídeo β -defensina.

Os PAMs são constituintes do sistema imune inato e apresenta atividade antimicrobiana contra um largo espectro de microrganismos (bactérias, fungos e parasitas) e são atóxicos para as células eucarióticas. Devido ao aumento progressivo da resistência de microrganismos patógenos aos antibióticos em decorrência do uso indiscriminado do mesmo, os PAMs despertam crescente interesse farmacológico pelo fato de destruir rapidamente as células alvo (Matsuzaki, 1997).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas pequenas, anfipáticas e catiônicas. Com massa molecular abaixo de 10 KDa se caracterizam por possuir

uma região hidrofóbica que interage com lipídeos e uma região hidrofílica carregada positivamente com elevado número de aminoácidos lisina, arginina e/ou histidina capaz de interagir com resíduos aniônicos. Algumas PAMs são resistentes a peptídeos presentes no plasma, por serem ricas em resíduos de cisteína, favorecendo a formação de pontes de dissulfeto (Löfgren, 2007).

O aumento da permeabilidade da membrana plasmática é o principal modo de ação dos peptídeos antimicrobianos. Alguns agem contra bactérias Gram negativa através da interação eletrostática com os fosfolipídeos aniônicos da membrana plasmática e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular formando pequenos poros tipo “barril”, podendo atuar como canais iônicos permitindo a entrada e saída indiscriminada de íons da célula (Brogden, 2005; Strus, Hancock, 2006).

Dentre as famílias de peptídeos antimicrobianos mais estudados estão os PAMs cíclicos denominados defensinas, ricas em folha beta pregueada, estabilizadas por três pontes de dissulfeto. Nos vertebrados, as defensinas são organizadas em três famílias: α – (α), β - (β) e θ - (θ) defensinas; sendo as β -defensinas, a maior família (Ganz, 2003; Lehrer, Ganz, 2002).

As β -defensinas são expressas de forma constitutiva ou induzidas em várias células como: linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e queratinócitos. Algumas apresentaram ação inflamatória com efeito sobre células epiteliais e no sistema imunológico inato e adaptativo por induzir quimiotaxia e liberação de citocinas (Bals, 2000, Corrêa, 2013; Jenssen *et al*, 2006, Zou *et al.*, 2007).

Peptídeos com estrutura β -defensina-símile já foram descritos em venenos de serpentes (Rádis-Baptista *et al.* 2004), lagartos (Dalla Valle *et al.*, 2012) e peixes, como peixe zebra (Zou *et al.*, 2007), mas é a primeira vez identificada em raias. Análise antimicrobiana quantitativa e a caracterização biológica da β -defensina-símile isolada da raia *P. aiereba* poderão esclarecer se esta proteína bioativa é de interesse farmacológico e se há ação inflamatória e nociceptivas no local da lesão.

Ao realizar a caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia *P. aiereba* observou-se a similaridade entre o perfil protéico da peçonha e o muco da raia *P. aiereba*. A presença de proteínas com atividades gelatinolíticas,

casenolíticas e fosfolipásicas A₂ no muco comprovam que seus efeitos nocivos são semelhantes aos da peçonha. O fato de a peçonha apresentar manifestações clínicas mais potentes que o muco pode estar ligado à forma de como a peçonha é introduzido na vítima, através do ferrão retrosserrilhado dilacerando os tecidos, uma vez que, isto por si só já causa ativação dos processos inflamatórios e nociceptivos.

As peptídeos encontradas no muco *P. aiereba* nos testes de atividade não foram classificadas, mas de acordo com o que está amplamente descrito, as gelatinases e caseínases, juntamente com as fosfolipases, também observadas no muco, teriam principalmente efeitos locais contribuindo de forma ímpar para exacerbação dos processos inflamatórios por distúrbio na matriz extracelular, potencializando os efeitos necróticos.

Um peptídeo com elevada condutividade, baixa massa molecular e atividade antimicrobiana para a bactéria Gram negativa *Micrococcus luteus* foi isolada com características similares a um peptídeo β -defensina. Esta descoberta confirma a presença de proteínas e peptídeos com diferentes funções.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas do muco epidérmico e da peçonha da *P. aiereba* apresentaram perfis protéicos muito parecidos.
- Foram visualizadas pelo menos três proteínas gelatinolíticas no muco da raia *P. aiereba*.
- Pela primeira vez foi detectada atividade caseinolítica no muco da raia *P. aiereba*.
- O muco da raia *P. aiereba* apresentou atividade significativa contra fosfolipídios A₂.
- Um peptídeo com alta condutividade apresentou discreta atividade antimicrobiana contra Gram negativo *Micrococcus luteus*.
- Um peptídeo com características similares a uma β -defensina foi isolado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. A.; VALENTIN, J. L. Biologia e ecologia alimentar de elasmobrânquios (*Chondrichthyes: Elasmobranchii*): uma revisão dos métodos e do estado da arte no Brasil. **Oecologia Australis**.14 (2):464-489, 2010.

ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L.; LIRA, M. S.; JARED, S. G. S.; GARRONE NETO, D.; JARED, C.; BARBARO, K. C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. **Toxicon**, 57: 297–303, 2011.

ARAÚJO, M.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA M.P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (*Potamotrygonidae*): status, conservation and management challenges. **Information document AC**. 20:1-6, 2004.

BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respiratory Research**. v.1, n.3. p 141, 2000.

BARBARO, K. C., LIRA, M. S., MALTA, M. B., SOARES, S. L., GARRONE NETO, D., CARDOSO, J. L. C., SANTORO, M. L., HADDAD JÚNIOR, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatisguttata*) stingrays. **Toxicon**, vol. 50, p. 676–687, 2007.

[BAUER, A. W.](#); [KIRBY, W. M.](#); [SHERRIS, J. C.](#); [TURCK, M.](#) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. [Am J Clin Pathol](#). 45 (4): 493-6, 1966.

BAUMANN, K.; CASEWELL, N.R.; ALI, S.A.; JACKSON, T.N.W.; VETTE, I.; DOBSON, J.S.; CUTMORE, S.C.; NOUWENS, A.; LAVERGNE, V.; FRY, B.G. A ray of venom: combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*). **Journal of proteomics**. 109:188-198, 2014.

BEVINS, C. L. Antimicrobial peptides as agents of mucosal immunity. **Ciba Found. Symp. Journal** 86, 250–260. 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding -Biochem. **Anal. Biochem**. 72:248-254,1976.

BRASIL. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde: 81-85 p. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Água. Plano Estratégico de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica dos rios Tocantins e Araguaia. **Relatório Síntese**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1.271, de 6 de junho de 2014. Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. **Diário Oficial da União** n.º 108, Seção 1, p. 67-69, 2014.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n. 3, p. 735-746, 2002.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bactéria. **Nature Rev. Microbiol.** v.3, p.238-250, 2005.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS letters**. v. 583, n. 11, p. 1736-1743, 2009.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, 25 (9), 1327-1333, 2004.

CARVALHO, M.R., LOVEJOY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of the Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*). **Zootaxa**, 2776, p. 13-48, 2011.

CARVALHO, M.R.; RAGNO, M. P. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 51 (7), 2011.

CASTRO, T. A.; AIRES, R. S.; TURÍBIO, T. O.; NEVES, A. C. D.; GEMELLI, T. F.; ARAÚJO, R.O. PACIENTES ACIDENTADOS POR RAIAS REGISTRADOS NO SINAN DE PORTO NACIONAL - TO ENTRE 2009 E 2013. In: Josefa Moreira do Nascimento-Rocha; Raquel Silva Aires; André Moreira Rocha; Anne Caroline Dias Neves; Ronyere Olegário Araújo; Thiago Moreira rocha. (Org.). **COLETÂNEA CIENTÍFICA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS: Utilizando o DATASUS Como Ferramenta de Investigação**. 1ed. Porto Nacional: FAPAC/Itpac Porto Nacional, v. 2, p. 173-180. 2016.

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCÓN, C. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. **Shark News**, vol. 14, p. 1–2, 2002.

CHARVET-ALMEIDA, P.; DE ALMEIDA, M. P. Contribuição ao conhecimento, distribuição e aos desafios para a conservação dos elasmobrânquios (raias e tubarões) no sistema Solimões-Amazonas. In: **Conservação da várzea. Identificação e caracterização de regiões biogeográficas**. ALBERNAZ, L. K.M. Organizadora. Manaus: Ibama/ProVárzea, p. 199-235, 2008.

CLARK, R. F.; GIRARD, R. H.; RAO, D.; LY, B. T.; DAVIS, D. P. Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. **The Journal of Emergency Medicine**. v. 33, n. 1, p. 33-37, 2007.

CONCEIÇÃO K.; KONNO K.; MELO R. L.; MARQUES E. E.; HIRUMA-LIMA C. A.; LIMA C.; RICHARDSON M.; PIMENTA D. C.; LOPES-FERREIRA M. **Orpotrin**: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of th Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*. **Peptides**, 27: 3039–46, 2006.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* freshwater stingray venom. **Peptides**. v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.

CONCEIÇÃO, K.; BRUNI, F. M.; SANTOS, J. M.; LOPES, R. M.; MARQUES, E. E.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. The action of fish peptide Orpotrin analogs on microcirculation. **J. Pept. Sci.**, v. 17, p. 192–199, 2011.

CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; SILVA JR., P. I.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. *Potamotrygon cf. henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein. **Toxicon**, vol. 60, p. 821–829, 2012.

COOK, M. D.; MATTEUCCI, M. J.; LALL, R.; LY, B. T. Stingray envenomation. **J. Emerg. Med.** 30:345–347, 2006.

CORRÊA, P. G. **Prospecção e atividade antimicrobiana de beta-defensinas similares de viperídeos**. 2013. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas em Biotecnologia Universidade de São Paulo/IPT/Instituto Butantan. São Paulo, 2013.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; PRINHOLATO Da Silva, C.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R. C.; GHISLA, S.; ANTUNES, L. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. **Int J Biol Macromol.** v. 80, p. 489-97, 2015.

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

DALLA VALLE, L.; BENATO, F.; MAISTRO, S.; QUINZANI, S.; ALIBARDI, L. Bioinformatic and molecular characterization of beta-defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 36, n. 1, p. 222-229, 2012.

DE CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. "Family Potamotrygonidae". In: **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America** (R.E. REIS, S.O.KULLANDER & C.J. FERRARIS JR., editors). Porto Alegre, EDIPUCRS, p. 22-28, 2003.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.-H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev.** v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DOMINGOS, M. O., FRANZOLIN, M. R., DOS ANJOS, M. T., FRANZOLIN, T. M. P., ALBES, R. C. B., DE ANDRADE, G. R., LOPES, R. J. L., BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**, v. 58, p. 147–153, 2011.

FREDERICO, R. G.; FARIAS, I. P.; ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygonaiereba* Müller & Henle, 1841 (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*). **Neotropical Ichthyology**, 10(1): 71-80, 2012.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**.v. 62, p. 75-82, 2013.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature/Rev Immunol.** 3, 710-720, 2003.

GARRONE NETO, D.; CORDEIRO, R.C.; HADDAD JR., V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, TO, Brasil. **Cad. Saúde Púb.**, 21(3):795-803, 2005.

GARRONE NETO, D., HADDAD JR, V., VILELA, M. J. A., UIEDA, V. S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**, v7 (n1) - bn0070701, 2007.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.43 n.1 Uberaba Jan./Feb. 2010.

GUALBERTO R.M; MENDONÇA A.P.; SANTOS, M. C. Uma Contribuição para a Notificação de Acidentes com Arraias: Desenvolvimento de um Sistema Web para Gerir as Notificações. **J. Health Inform.** 8(2):57-65, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie.** v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

HADDAD JR., V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** set-out, 36 (5):591-597, 2003.

HADDAD JR., V.; GARRONE NETO, D.; DE PAULA NETO, J. B.; DE LUNA MARQUES, F. P.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, 43:287–94, 2004.

HADDAD JUNIOR, V. Infecções cutâneas e acidentes por animais traumatizantes no Brasil: descrição de 18 casos e revisão do tema. **AnbrasDermatol**, Rio de Janeiro, 79(2):157-167, mar./abr. 2004.

HADDAD JR. V.; FÁVERO JR., E. L.; RIBEIRO, F. A. H.; ANCHESCHI, B. C.; CASTRO, G. I. P.; MARTINS, R. C.; PAZUELO, G. B.; FUJII, J. R.; VIEIRA, R. B.; GARRONE NETO, D. Trauma and envenoming caused by stingrays and other fish in a fishing community in Pontal do Paranapanema, State of São Paulo, Brazil: epidemiology, clinical aspects, and therapeutic and preventive measures. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 45, n. 2, p. 238-242, 2012.

HALSTEAD, B. W. Venomous marine animals of Brazil. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 33, 126p. 1966.

HALSTEAD, B. W. Poisonous and venomous marine animals of the world. Washington, D. C. United States Government Printing Office, V. 3: **Vertebrates**, 997 p. 1970.

HARVEY, Richard A.. **Bioquímica ilustrada**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 528p. Cap 17. 2014.

HELLIO, C.; PONS, A.M.; BEAUPOIL, C.; BOURGOUGNON, N.; GAL, Y.L.. Antimicrobial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 20, 214–219. 2002.

HOLZER, M.; MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 34. n. 10, p. 1149 – 1155, 1996.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n.3, p. 491-511, 2006.

KIMURA, L. F.; PREZOTTO-NETO, J.P.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, S.G.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K.C. Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. **Experimental Biology and Medicine**, 239, p. 601-609, 2014.

KIMURA, L. F.; PREZOTTO-NETO, J. P.; TAVORA, B.C.L.F.; FAQUIM-MAURO, E. L.; PEREIRA, N. A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, S.G.; TEIXEIRA, C. F. P.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. **Toxicon**, vol. 103, p. 65-73, 2015.

KLESZIUS PH, SHOEMAKER CA, EVANS JJ. *Flavobacterium columnare* chemotaxisto channel catfish mucus. **FEMS Microbiology Letters**. 288 (2):216-220, 2008.

KOZLOV, S. A.; VASSILEVSKI, A. A.; FEOFANOV, A. V.; SUROVOY, A. Y.; KARPUNIN, D. V.; GRISHIN, E. V. Laticins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 30, p. 20983-20992, 2006.

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

LAMEIRAS J. L. V.; DA COSTA O. T. F.; MORONI, F.T.; ARAÚJO, J.R.; CARANHAS S. M. E.; MARQUES, C. M. A.; DOS-SANTOS M. C.; DUNCAN W. L. P. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of fresh water stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (*Chondrichthyes-Potamotrygonidae*) from the Amazon Basin. **Toxicon**. 77:105–13. 2014.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). Instituto Internacional de Cromatografia. **Scientia Chromatographica** Vol.2, Nº1, 49-57, 2010.

LEHRER, R.I.; GANZ, T. Defensins of vertebrate animals. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n.1, p. 96-102, 2002.

LÖFGREN, S. E. **Atividades Antimicrobiana, Antiparasitária e Hemolítica De Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Animais Aquáticos**. Dissertação de Mestrado. 2007. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A. A.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbignyi*. **Toxicon**, 5:575–83, 2006.

MAGALHÃES, M. R.; DA SILVA, N. J.; ULHOA, C. J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (fresh water stingrays) venom: isolation and characterization. **Toxicon**, 51: 1060–7, 2008.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K. I.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1327, p.119-130, 1997.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; SILVA JR., P. I.; SOARES, A. B.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and stingvenom of *Potamotrygon cf. henlei*. **International Immunopharmacology**, v. 11p. 1368–1377, 2011.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J. **Toxicidade da peçonha de arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* (*Chondrichthyes Potamotrygonidae*) em relação ao sexo e fases do desenvolvimento ontogenético (jovem e adulto)**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO, 2012.

MONTEIRO, W. M.; Oliveira, S. S.; Sachett, J. A. G.; Silva, I. M.; Ferreira, L. C. L.; Lacerda, M. V. G. Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**. 49(3):389-392. 2016.

MOZUMDER, M.M.H. Antimicrobial Activity in Fish Mucus from Farmed Fish. **Norwegian College of Fishery Science**, University of Tromsø, Norway. 2005.

MUKHERJEE, A. K. A major phospholipase A2 from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. **Biochimie**. v. 99, p. 153-61, 2014.

MURAKAMI, M. T. & ARNI, R. K.. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A2s. **Toxicon**, 42, 903–913, 2003.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 57-58, 1994.

OLIVEIRA, J. C. S.; COSTA, E. A.; PENA, F. P. S. Acidentes por raias (*Potamotrygonidae*) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. **Biota Amazônia** - Macapá, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2011.

OLIVEIRA Jr., N. G. **Análises transcritômicas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília. 137 p. 2014.

PASSOS, A. P; PIMENTA, M. A.; THOMAZI, G. O. C.; AIRES, R. S.; TURÍBIO, T. O. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES VÍTIMAS DE ACIDENTES POR RAIAS ATENDIDOS NO HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO NACIONAL/TO, 2012 A 2015. In: Josefa Moreira do Nascimento -Rocha; Raquel Silva Aires; André Moreira Rocha; Anne Caroline Dias Neves; Ronyere Olegário Araújo; Thiago Moreira rocha. (Org.). **COLETÂNEA CIENTÍFICA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS: Informação Científica Baseada em Evidências**. 1ed.Porto Nacional: FAPAC/Itpac Porto Nacional, v. 1, p. 105-114, 2016.

PEDROSO, C. M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M.P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M.S.; HADDAD JR., V.; BARBARO, K.C.; ANTONIAZZI, M. M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 50, p. 688–697, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARREL D.A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A. J.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**. 26(7): p. 629-637. 1988.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; PRIETO DA SILVA, A. R. B; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Identificación of crostin, a crostamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 43, n.7, p. 751-759, 2004.

SÁ-OLIVEIRA, J. C. S.; COSTA, E. A.; PENA, F. P. S. Acidentes Por Raias (*Potamotrygonidae*) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. **Biota Amazônia**, Macapá.1(2):74-78, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, EUA. 2. ed, 1546 p, 1989.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. K. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A₂. **Bioinformation**, v.8, n.1, p. 48, 2012.

SILVA, L. L.; DONNICI, C. L. L.; AYALA, J. D.; FREITAS, C. H.; MOREIRA, R. M.; PINTO, A. M. F. Traçadores: o uso de agentes químicos para estudos hidrológicos, ambientais, petroquímicos e biológicos. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1576-1585, 2009.

SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. **Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms**. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 3, p. 206-217, 2006.

STERN, R.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. **Chem Rev**. v. 106, n. 3, p. 818-39, 2006.

STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v 1758, p.1215-1233, 2006.

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N.W.; MACKINNON, S.L. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. May; 150(1):85-92. 2008.

THOMSON, M.; AL-HASSAN, J.M.; SUMMERS, B.; CRIDDLE, R. S. Protein composition of the threat induced epidermal secretion from the Arabian Gulf catfish, *Arius thalassinus* (Ruppell). **Comp. Biochem. Physiol.**, B 88, 813–822. 1987.

THOMAZI, Gabriela Ortega Coelho. **Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de 60 Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba***. 2016. Tese (Doutorado em

Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

TORREZ, P. P.Q.; QUIROGA, M. M.; SAID, R.; ABATI, P. A. M.; FRANÇA, F. O. S. Tetanus after envenomations caused by freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 97, p .32-35, 2015.

WEISS, B. F.; WOLFENDEN, H. D. Survivor of a stingray injury to the heart. **Medical Journal of Australia**. 175 (1):33-34, 2001.

ZHAO, X.; FINDLY, R.C.; DICKERSON, H. W. Cutaneous antibody secreting cell sand B cells in a teleost fish. **Dev. Comp. Immunol**. 32:500–508. 2008

ZOU, J.; MERCIER, C.; KOUSSOUNADIS, A.; SECOMBES, C. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. **Mol. Immunol**. 44, 638-647, 2007.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.