

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO FERRÃO DE ARRAIA**  
***Potamotrygon falkneri* (Myliobatiformes:Potamotrygonidae)**

**LILIBETE PEREIRA DE OLIVEIRA**

Brasília-DF  
(2015)

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DO FERRÃO DE ARRAIA**  
*Potamotrygon falkneri* (Myliobatiformes:Potamotrygonidae)

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Animal  
da Universidade de Brasília,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Animal.

**Lilibete Pereira de Oliveira**  
**Orientadora: Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz**

Brasília-DF  
(2015)

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À prof. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz pela confiança, correções, revisões, sugestões e apoio durante a realização deste.

Aos meus pais Divina e Alfredo pelo auxílio e apoio durante estes dois anos de muita estrada. Aos meus familiares Cynara, Rogério e Artur por terem me acolhido em Brasília.

Às doutorandas Marta Regina Magalhães e Sayonara Ay More de Oliveira pelo auxílio, apoio, paciência e principalmente pelos ensinamentos, conselhos e companheirismo. O que seria dos meus dias de laboratório sem vocês e o café?

Ao meu namorado Matheus Godoy Pires pelo auxílio, paciência e pelos dias de estudo nestes últimos meses.

Ao Centro de Estudos e Pesquisas e Biológicas (CEPB), ao laboratório Replicon da PUC-GO na pessoa do prof. MSc. Hélder Lúcio Rodrigues Silva e Esp. Eduardo Rocha Pedrosa pela disponibilização de materiais e equipamentos para realização de parte deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório pelo auxílio com pequenos detalhes que fizeram toda a diferença, aos acadêmicos: Pedro Victor Brasil Ribeiro e Bruno Barros Bittar.

À prof. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer pela disponibilização de equipamentos, laboratório e conselhos.

Ao mestrando Rafael Cosme Machado pela companhia, auxílio, companheirismo, por me escutar e compartilhar vários momentos desde a graduação.

Ao prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, Marta Regina Magalhães e Carolina Barbosa pelos conselhos e auxílio durante as cromatografias.

Ao mestrando Carlos Correa Santana por me auxiliar em diversos momentos, pela companhia em Brasília e pelo incentivo desde o início.

À doutoranda Élide Cleyse Gomes da Mata e o prof. Dr. Luis Isamu Barros Kanzaki por me acolherem no laboratório de bioprospecção, por me ensinarem e auxiliarem na citotoxicidade agradeço pela paciência e carinho.

À mestranda Beatriz Elena Sarmiento pela amizade, contribuição e incentivo.

Aos doutorandos: Jacqueline Coimbra Gonçalves, Tânia Barth e Harry Morales pelos conselhos e conversas nos corredores.

À Carolina Barbosa pelo auxílio na espectrometria de massa.

À Solange Rego por me acolher na sua casa.

Aos meus amigos: Leticia Gomes de Oliveira e Tiago Azevedo, pelo incentivo e carinho nestes dois anos.

À CAPES, pela concessão da bolsa e pelo apoio recebido por meio do projeto aprovado pelo Edital Toxinologia. À Rede Pró-Centro-Oeste, com a qual esta pesquisa também está vinculada.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. ICTISMO .....	1
1.2. ARRAIAS .....	2
1.3. APARATO DE VENENO .....	3
1.4. EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES .....	6
1.5. ASPECTOS CLÍNICOS .....	8
1.6. TRATAMENTO .....	9
1.7. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DE PEÇONHAS DE ARRAIAS .....	10
1.8. ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	13
1.9. FOSFOLIPASE .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	17
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	18
4.1. EXTRAÇÃO DO EXTRATO DO FERRÃO .....	18
4.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	18
4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	19
4.3.1. COLORAÇÃO DO GEL .....	19
4.4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA .....	20
4.5. ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA .....	20
4.5.1. TESTE HEMOLÍTICO .....	20
4.5.2. ENSAIO PRELIMINAR .....	21
4.6. TESTE DE EXCLUSÃO DE CORANTE AZUL DE TRYPAN .....	21
4.6.1. MEIO DE CULTURA .....	21
4.6.2. MANUTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS .....	23

4.6.3. TESTE DE EXCLUSÃO DE CÉLULAS INVIÁVEIS PELO AZUL DE TRYPAN .....	23
4.7. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	23
4.8. ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA .....	24
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
5.1. EXTRATO PROTÉICO .....	25
5.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO .....	25
5.3. GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	26
5.4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	27
5.5. FOSFOLIPASE E FOSFOLIPASE A <sub>2</sub> .....	27
5.6. CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	28
5.7 ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	31
5.8 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A <sub>2</sub> DA REGIÃO 5 .....	31
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ferrão de arraia <i>Potamotrygon</i> sp. Fonte : Wallice Duncan (LAMEIRAS et al., 2014) .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Mecanismo utilizado pelas arraias (FENNER <i>et al.</i> , 1988) .....	6
<b>FIGURA 3.</b> Sítio de clivagem das fosfolipases. (YANG <i>et al.</i> (2014). .....	14
<b>FIGURA 4.</b> Perfil cromatográfico do extrato do ferrão de <i>Potamotrygon falkneri</i> , representado as regiões. Foi utilizada uma coluna analítica Vydac C18 (218TP54, 250 mm X 5 mm), acoplada em um equipamento Shimadzu LC-20AT utilizando um detector PDA SPD-20AV, eluição das frações foi conduzida em um gradiente de 0-100% de acetonitrila acidificada com TFA 0,1% v/v, em água, durante 80 min, em um fluxo de 1,0 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm e 280 nm. O gradiente de acetonitrila é mostrado pela linha azul. Foram utilizados 200µL do sobrenadante da extração .....	26
<b>FIGURA 5 -</b> Perfil protéico do extrato de <i>P. falkneri</i> em SDS-PAGE 12%. MM-Marcador molecular , 5µL, 7µL e 10 µL utilizados em cada slot .....	27
<b>FIGURA 6.</b> Efeito sobre a viabilidade celular causado pela região 1 do perfil cromatográfico do extrato do ferrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais se diferem estatisticamente a $p < 0,05$ .....	28
<b>FIGURA 7.</b> Efeito sobre a viabilidade celular causado pela região 5 do perfil cromatográfico do extrato do ferrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais se não diferem estatisticamente a $p < 0,05$ .....	29

**FIGURA 8.** Perfil da recromatografia da fração 2 de *Potamotrygon falkneri*. Foi utilizada uma coluna analítica Vydac C18 218TP54, 250 mm X 5 mm), acoplada em um equipamento Shimadzu LC-20AT utilizando um detector PDA SPD-20AV, eluição das frações foi conduzida em um gradiente de 30-90% de acetonitrila acidificada com TFA 0,1% v/v, em água, em um fluxo de 1,0 mL/min. A fração eluída foi monitorada a 216 nm e 280 nm. O gradiente de acetonitrila está demonstrado pela linha azul ..... 30

**FIGURA 9.** Efeito sobre a viabilidade celular causado pela fração da recromatografia da região 5. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais não se diferem estatisticamente a  $p < 0,05$ ..... 30

**FIGURA 10.** Espectro de massa da fração 2 purificados por RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub>. O espectro foi obtido plaqueando as amostras em ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico e analisada no modo linear positivo. Demonstrando a presença de 3 componentes e suas respectivas cargas ..... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D	<i>Biochemical oxygen demand</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
PBS	Tampão fosfato
kDa	Kilodalton
LDH	Lactato Desidrogenase
mM	Milimolar
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro fetal bovino
TFA	Ácido trifluoroacético

## RESUMO

Em diversas regiões brasileiras os acidentes provocados por arraias dulcícolas são temidos por serem causa comum de necrose tissular e infecções bacterianas secundárias, que frequentemente implicam em incapacidade física temporária ou permanente. Estudos anteriores relatam a presença de atividades tóxicas, dentre as quais cardiotoxicidade, hiperalgesia, necrosante e edematogênica. Entretanto componentes envolvidos na citotoxicidade permaneceram sem caracterização. Identificação destes componentes é útil para a busca de tratamentos mais eficazes para este tipo de acidente. O presente trabalho objetivou identificar e caracterizar componentes citotóxicos do extrato do epitélio glandular que reveste o ferrão da arraia *Potamotrygon falkneri*. Os resultados obtidos evidenciam que o extrato obtido de um ferrão desta arraia possui aproximadamente 86 µg de proteínas, e seu perfil cromatográfico revelou 6 regiões com massa molecular variando de 14,4 a 97 kDa quando analisadas em SDS-PAGE. O extrato bruto do ferrão apresentou atividade hemolítica, fosfolipásica e citotóxica. 34 µg/mL do extrato bruto induziu 59 % de hemólise e a atividade fosfolipásica na presença de cálcio foi de 28.276 U/mg de proteína, enquanto na ausência de cálcio foi de 22.680 U/mg. O ensaio de citotoxicidade do extrato bruto foi realizado pelo método exclusão de azul de trypan na linhagem H9 em 6, 12 e 24 horas, resultando positivo no tempo de 24 horas. O extrato bruto e as regiões cromatográficas foram submetidas ao ensaio citotóxico e hemolítico, do qual uma fração apresentou índice citotóxico (região 1) e outra região apresentou hemolítico de 26% (região 5). O ensaio de citotoxicidade da região 5 também revelou citotoxicidade, além da capacidade hemolítica. A fração hemolítica e citotóxica foi purificada e submetida a espectrometria de massa, revelando três componentes com massas de 11.330,146 Da, 13.577,574 Da e 16.808,068 Da. Por fim, realizou-se o teste de hemólise indireta de fosfolipase A<sub>2</sub> nesta fração, resultando em uma atividade de 103,33 U/mg de fração. O presente trabalho, portanto, evidencia a presença de enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, com atividade citotóxica em hemácias e células H9, no extrato da peçonha de *P. falkneri* e na fração estudada.

**Palavras-chave:** Ferrão, arraia, citotóxico, fosfolipase.

## ABSTRACT

In several Brazilian regions accidents caused by freshwater stingrays are feared by causing tissue necrosis and secondary bacterial infections, often promoting temporary or permanent disability. Previous studies reported toxic activities as cardiotoxicity, hyperalgesy, necrotic and edematogenic, however cytotoxic compounds remained uncharacterized. Identifying these compounds is useful for the development of more effective treatments for this type of accident, and the present work aimed to identify and characterize cytotoxic components from the extract of the glandular tissue sting sheath of the stingray *Potamotrygon falkneri*. The results reveal approximately 86 µg/mL of protein on this extract, and its chromatographic profile revealed 6 regions with molecular masses between 14.4 and 97 kDa when analyzed on SDS-PAGE. The sting sheath extract also revealed haemolytic, phospholipase and cytotoxic activities. 34 µg/mL of the crude extract induced 59.57% hemolysis and the phospholipase activity was 28276 U/mg protein in the presence of calcium, and 22680 U/mg in the absence of calcium. Cytotoxicity assay of the crude extracts was performed by blue trypan exclusion upon H9 lineage at 6, 12 and 24 hours, and with positive results in 24 hours. The crude extract and chromatographic fractions were subjected to hemolytic and cytotoxic assays, with one fraction revealing cytotoxic activity (region 1) and another with 26% hemolytic index (region 5). Region 5 also revealed cytotoxicity, in addition to its haemolytic action. The cytotoxic and haemolytic fraction were purified and analyzed by mass spectrometry, revealing three compounds with masses of 11330.146Da, 13.577.574 Da and 16,808,068 Da. Further, an indirect hemolysis phospholipase A<sub>2</sub> test was performed, resulting in 103.33 U/mg fraction activity. The present work reveals the presence of a phospholipase A<sub>2</sub> enzyme, toxic for erythrocytes and H9 cells, on the extract of *P. falkneri* and the studied fraction.

**Keywords:** Sting, stingray, cytotoxic, phospholipase.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ICTISMO

Os acidentes provocados por peixes, tanto fluviais quanto os marinhos, são denominados de ictismo. Estes acidentes podem ser classificados como acidentes sarcotóxico e acantotóxico, sendo o primeiro provocado pela ingestão de toxinas presentes em órgãos ou tecidos, e o segundo por mordeduras ou ferroadas (LIMA e FERREIRA, 2000; SAÚDE, 2001)

No acidente acantotóxico o peixe introduz na vítima o ferrão, geralmente serrilhado e envolvido por bainha de tegumento, sob o qual estão as glândulas de veneno, que geralmente encontram-se associadas aos raios ossificados das nadadeiras peitorais, dorsais ou caudais e também na base dos ferrões. Os principais peixes causadores destes acidentes são as arraias (*Dasyatis guttatus*, *Gymnura micrura*, *Potamotrygon sp*, *Plesiotrygon sp.*), peixes pimelodídeos como bagres (*Bagre bagre*, *B. marinus*, *Pimelodella hystrix*, *Pimelodus maculatus*) e escorpionídeos (*Scorpaena brasiliensis*) (SAÚDE, 2001; HADDAD JR, 2003).

Os acidentes sarcotóxicos são subdivididos em: tetrodontóxico, ciguatóxico e escombrótico (SAÚDE, 2001). Os acidentes tetrodontóxicos são causados pela ingestão de peixes da família Tetraodontidae (baiacus). Estes peixes são bastante utilizados na culinária (Fugu), sua manipulação e preparo devem ser executadas somente por pessoas especialmente habilitadas para tal (HADDAD JR, 2003; HADDAD JR, VIDAL *et al.*, 2004; NETO *et al.*, 2010). Os acidentes ciguatóxicos ocorrem pela ingestão de peixes contaminados pelo ciguatoxina. Os principais causadores desta contaminação são as garoupas (*Cephalopholis argus*) e bicuda (*Sphyrnaena picudilla*), que acumulam toxinas

presentes em suas presas que, por sua vez, as acumulam conforme se alimentam de fitoplâncton (SAÚDE, 2001; FIELD-CORTAZARES *et al.*, 2008).

Os acidentes escombróticos são antropogênicos e ocorrem pela acumulação metabólica de metil-mercúrio causada pelo consumo de peixes oriundos de corpos d'água contaminados, desencadeando um conjunto de sintomas e sinais que caracterizam o Mal de Minamata (AKAGI *et al.*, 1998; SAÚDE, 2001).

## 1.2. ARRAIAS

As arraias (Chondrichthyes: Elasmobranchii: Batoidea) são peixes cartilagosos, principalmente marinhos com o corpo fortemente comprimido dorso-ventralmente e, com aberturas branquiais na face ventral. Estão distribuídas em 22 famílias, com 535 espécies descritas (HALSTEAD, 1966; COMPAGNO, 1999; NELSON, 2006). No Brasil, são importantes, no ponto de vista médico, as arraias das famílias Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae, Rhinopteridae, Urolophidae (marinhas) e Potamotrygonidae (dulcícolas) (LESSA *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2005). Os Potamotrygonidae atingem cerca de 40 cm (HALSTEAD, 1988) e possuem algumas características biológicas modificadas de ancestrais marinhos, como adaptações para viverem em ambientes de água doce (COMPAGNO e COOK, 1995).

Existem duas teorias a respeito desta origem. A primeira prevê que, por volta de 3-5 milhões de anos, durante o Mioceno, houve a última transgressão marinha, evento que propiciou a dispersão das primeiras arraias marinhas do Oceano Atlântico. A segunda teoria, baseada na coevolução, indica, por análises biogeográficas e filogenéticas de helmintos que parasitavam as arraias, que estes animais tenham surgido de arraias urolofideas do Oceano Pacífico, que ficaram presas em água doce, durante a elevação da Cordilheira dos Andes, no período do Cretáceo Inferior, ocasionando a

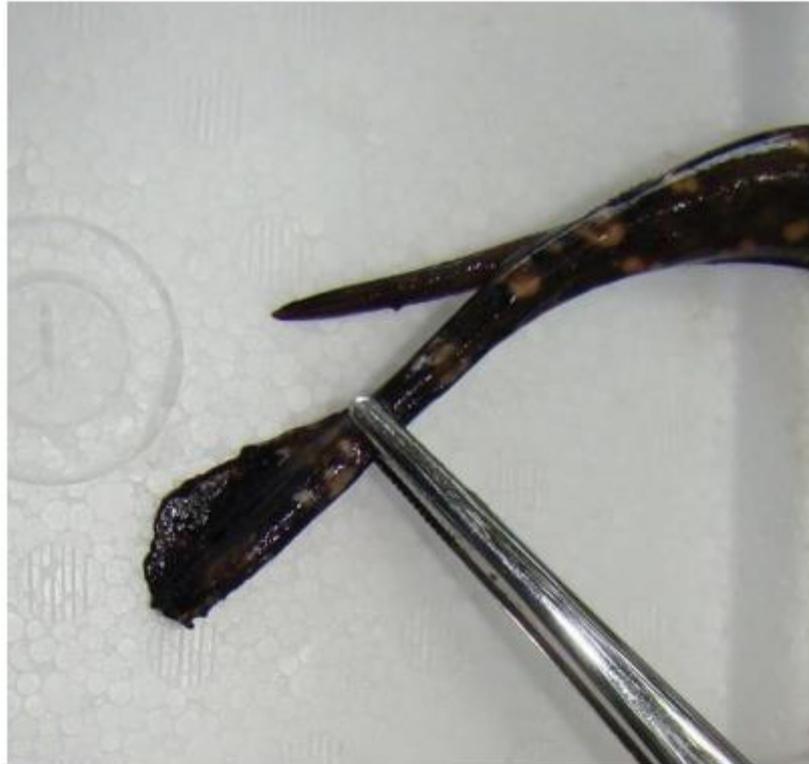
modificação do curso do Rio Amazonas, que percorria para o Oceano Pacífico (BROOKS, 1992).

Os Potamotrygonidae são os únicos elasmobrânquios adaptados para viverem exclusivamente em ambientes de água doce e, para tanto, exibem adaptações tanto metabólicas quanto comportamentais, tais como a ventilação na superfície em águas estagnadas, cuidado parental, baixa concentração de ureia nos fluidos biológicos (ajuste osmolar) e redução da glândula retal (ARAÚJO *et al.*, 2004).

De taxonomia complexa (16-20 espécies), os potamotrigonídeos são restritos aos sistemas fluviais da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Uruguai, Suriname e Venezuela), sendo o Brasil o país com a maior biodiversidade com aproximadamente 13 espécies descritas (GARRONE NETO *et al.*, 2007). A espécie *Potamotrygon falkneri*, animal utilizado neste estudo, é encontrada em rios da Argentina e Paraguai, nas bacias dos rios Paraná e Paraguai (CARVALHO *et al.*, 2003).

### 1.3. APARATO DE VENENO

O aparato de peçonha das arraias, denominado de ferrão ou espinho (Figura 1) (CARAS, 1974), está localizado na linha dorsal mediana da cauda, havendo variação entre as espécies sobre sua localização na cauda, geralmente se localizando após a metade do comprimento da mesma, a partir de sua base (THORSON *et al.*, 1988).



**FIGURA 1.** Ferrão da arraia *Potamotrygon sp.* Fonte: Wallace Duncan (LAMEIRAS, DA COSTA, *et al.*, 2014).

Consiste em uma estrutura longa e acuminada, composta por vaso-dentina coberta por uma camada delgada de esmalte, e ancorada em uma rede densa de colágeno na região dorsal da cauda. As arraias, com algumas exceções, possuem 1 ou 2 ferrões, cuja substituição é um fenômeno periódico (CARAS, 1974; THORSON *et al.*, 1988).

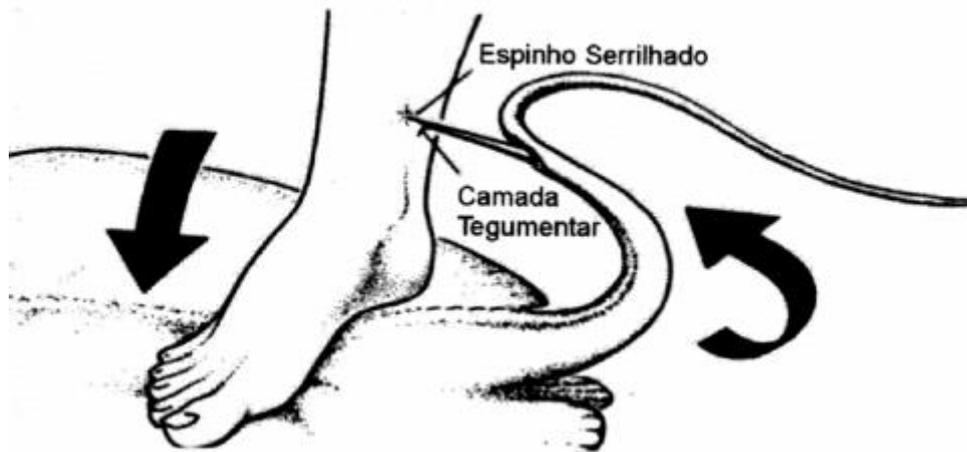
Na superfície dorsal, o ferrão apresenta ranhuras rasas paralelas, mais densamente arranjadas na porção basal, tornando-se menos profundas e evidentes distalmente. Lateralmente, o ferrão possui cristas denteadas. Observam-se ranhuras ventrolaterais, separadas pela região rugosa medial nas quais estão abrigadas, em seu interior, uma lâmina de tecido constituído de um epitélio glandular vascularizado, identificado como a região produtora da peçonha (BUCHERL e BUCKLEY, 1971).

Os primeiros estudos sobre os ferrões de arraias foram realizados por BOTTARD (1889), os quais não detectaram a presença de glândulas capazes de

produzir peçonha. Porém PORTA (1905), em um estudo subsequente descreveu a glândula produtora de peçonha. Com isso, HALSTEAD e BUNKER (1953) e OCAMPO *et al.* (1953) realizaram os primeiros estudos histológicos nos quais relatam a organização tissular do ferrão e constaram a ausência de um sistema complexo de ductos para realizar a injeção do veneno, sugerindo a inoculação da peçonha por meio do rompimento das células holócrinas. Posteriormente, CASTEX e LOZA (1964), caracterizam mais acuradamente a arquitetura histológica do epitélio venenífero das arraias dulcícolas.

Recentemente, DEGHANI *et al.* (2010) realizaram um estudo comparativo entre os ferrões de algumas espécies marinhas e dulcícolas, observando diferenças histológicas entre as mesmas. Enquanto nas espécies marinhas as células especializadas na produção de peçonha estão localizadas na epiderme, nas ranhuras ventrolaterais ou próximas desta, nas espécies dulcícolas as células especializadas recobrem, em camadas, a totalidade da periferia do ferrão e possuem grânulos de secreção em seu citoplasma.

Para a utilização do aparelho inoculador, as arraias podem recorrer a três distintos comportamentos reflexos defensivos: quando estimuladas no terço posterior do disco, movem a cauda lateralmente em direção ao estímulo (Figura 2); se o estímulo é pontual em uma região mais anterior a arraia arqueia o dorso, direcionando verticalmente a introdução do ferrão; com um estímulo difuso sobre o disco, uma dinâmica complexa combinando o repertório mecânico de ambas as situações acima descritas é aplicada (HALSTEAD, 1965).



**FIGURA 2.** Mecanismo utilizado pelas arraias para a utilização do aparelho inoculador (FENNER *et al.*, 1988).

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES

Devido ao elevado índice de acidentes ocasionados por arraias, estes frequentemente resultam em incapacitação temporária ou definitiva em seres humanos, ocasionando impactos socioeconômicos sensíveis devido ao prejuízo no turismo em numerosas localidades, perdas econômicas e de condições de saúde entre pescadores e aquaristas. Este fato é ainda mais grave em regiões não nativas destas espécies, porém por elas colonizadas, pelo fato da população ignorar sua presença e desconhecer seu manuseio, métodos e hábitos adequados para a prevenção e o tratamento dos acidentes envolvendo esses animais, às vezes em proporções capazes de alterar o perfil epidemiológico de determinadas regiões (p. ex. sudeste do Brasil) (ARAÚJO *et al.*, 2004; GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010).

Entre banhistas e pescadores a região do corpo mais acometida são os membros inferiores, principalmente envolvendo tornozelos e pés, a incidência maior se dá por parte de espécimes juvenis, que tem por hábito manterem-se semienterradas próximas às margens, o que facilita seu pisoteio. Em períodos chuvosos há um aumento na

ocorrência destes acidentes devido ao aumento da turbidez da água (GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010), porém os acidentes permanecem corriqueiros nas estações secas devido ao uso recreativos das coleções d'água. Entre banhistas verifica-se uma maior incidência de acidentes no período vespertino, pela maior utilização dos corpos d'água para banho e lazer (HADDAD JR, V. *et al.*, 2004).

Pescadores e banhistas, tanto esportivos quanto profissionais, são também atingidos em membros superiores devido ao manuseio destes animais e pela facilidade de sua captura em redes ou anzóis. Acidentes acometendo mãos são comuns especialmente entre os aquaristas da Europa, Japão e EUA, devido á ausência de informação de procedimentos de manutenção dos aquários (GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010).

A sazonalidade é outro fator que pode ser determinante na epidemiologia destes acidentes. Na região norte e centro-oeste do Brasil, entre maio e outubro (estação seca), formam-se praias de areia, onde a prática de banho é intensa e tradicional. Este é, por exemplo, o período o de maior incidência de acidentes no Rio Araguaia (HADDAD JR *et al.*, 2013). Num pronunciado contraste com esta situação, o Rio Tocantins possui elevada incidência de acidentes durante todo o ano, devido à existência permanente de praias de areia formadas pelo alagamento de barragens e construções de usinas hidrelétricas, sendo procuradas por moradores ribeirinhos para recreação e pesca (GARRONE NETO *et al.*, 2005).

Nas regiões de ocorrência dos gêneros *Potamotrygon* e *Paratrygon*, as espécies mais frequentemente envolvidas em acidentes são *Potamotrygon henlei*, *Potamotrygon orbgnyi*, *Potamotrygon scobina* e *Paratrygon aiereba*. As espécies do gênero *Potamotrygon* são mais frequentemente envolvidas nesses casos devido à localização do

ferrão na região média-distal da cauda, aparentemente facilitando o acidente (GARRONE NETO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010).

Não há descrição de acidentes fatais causados pela peçonha de arraias. A fatalidade ocorre, em acidentes que envolvem espécimes com ferrões muito grandes, os quais atingem órgãos vitais após perfurações torácicas, abdominais ou cardíacas (CROSS, 1975; ARAÚJO *et al.*, 2004; GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010). Apesar de incomuns, é prudente ainda considerar como subnotificada a ocorrência de acidentes com arraias, pois tendem a ocorrer em lugares de difícil acesso e isolados, atrasando a procura por serviço médico (HADDAD JR, V. *et al.*, 2004).

#### 1.5. ASPECTOS CLÍNICOS

Os acidentes por arraias são caracterizados pela reação inflamatória e hiperalgesia local (MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2011). A dor relatada é característica do acidente com arraias, atingindo intensidade mais pronunciada entre os 30 e 60 minutos após o acidente e persistindo por até 48 horas (SADHASIVAM *et al.*, 2013). As manifestações mais precoces do acidente são o surgimento de eritema e edema ao redor do local do trauma, evoluindo com a formação de necrose central, resultando em flacidez tissular e ulceração de difícil cicatrização (MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2011).

Sintomas sistêmicos também foram relatados como: náuseas, vômitos, febre, agitação, taquicardia, sudorese fria (GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010). Vertigem, convulsões, hipotensão e contraturas musculares induzidas pela dor (SADHASIVAM *et al.*, 2013). Apesar dos acidentes causados por diferentes espécies de arraias serem clinicamente semelhantes, sua gravidade apresenta variação entre as diferentes espécies e habitats (DEHGHANI *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que a

peçonha da espécie dulcícola *Potamotrygon falkneri* induz manifestações clínicas mais severas como dor em animais experimentais e humanos do que sobre animais marinhos, quando comparado ao da espécie marinha *Dasyatis guttata* (BARBARO *et al.*, 2007).

Além dos sintomas provocados pela peçonha, a lesão pode apresentar infecções secundárias causadas principalmente por *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp.. Estas infecções ocorrem devido à ação mecânica do ferrão que, além de introduzir o veneno, permite a entrada de bactérias do muco e principalmente de água na lesão (DOMINGOS *et al.*, 2011).

#### 1.6. TRATAMENTO

A pequena incidência deste tipo de acidente, sua evolução geralmente benigna e a disponibilidade de drogas para tratamento dos sintomas não justificam o desenvolvimento de antiveneno específico (HADDAD JR, V. *et al.*, 2004).

Desta forma, o tratamento é baseado na extensão e caráter da lesão e nos sintomas clínicos manifestados (GARRONE NETO *et al.*, 2009). Os acidentados por arraias, via de regra, são tratados com a administração de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos (ANTONIAZZI *et al.*, 2011), além de receberem imunização antitetânica (SCHARF, 2002).

Tipicamente, o tratamento do acidentado dá-se pela imobilização do membro afetado, higienização da lesão, e controle da dor por meio medicamentoso e aquecimento localizado da lesão (45°C). Após os primeiros socorros, procede-se a limpeza profunda do ferimento, se necessário com intervenção cirúrgica para remoção do ferrão ou de seus fragmentos. É necessário evitar-se o uso de vasoconstritores para diminuir a extensão da necrose tissular decorrente dos efeitos da peçonha (WEISS e

WOLFENDEN, 2001; SCHARF, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010; SADHASIVAM *et al.*, 2013).

### 1.7. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DE PEÇONHAS DE ARRAIAS

Peçonhas de peixes são misturas complexas, com ampla variedade de moléculas bioativas e fonte de diversas substâncias com atividades farmacológicas (CHURCH e HODGSON, 2002), porém poucas pesquisas com peçonhas de arraias dulcícolas e seus mecanismos de ação têm sido desenvolvidas, provavelmente pela dificuldade na obtenção em quantidades relevantes do material.

Os pioneiros sobre as propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha de arraias foram desenvolvidos por RUSSELL e VAN HARREVELD (1954), RUSSELL *et al.* (1957) e RODRIGUES (1972), que demonstraram respectivamente efeitos cardiovasculares, presença de polipeptídeo de alta massa molecular, serotonina e atividades enzimáticas como fosfodiesterase e 5'-nucleotidase na peçonha de *Urobatis helleri* e o isolamento de um princípio ativo e hipotensivo de *Potamotrygon motoro*.

Recentemente, alguns componentes vêm sendo identificados nas peçonhas de arraias fluviais. Fosfolipase, 5'-nucleotidase, fosfatase ácida, hialuronidase, atividades caseinolítica, gelatinolítica, elastinolítica foram encontradas na peçonha de *P. motoro* e *Potamotrygon falkneri* (HADDAD JR, 2008; MAGALHÃES, 2008). Em uma pesquisa realizada com o muco dorsal e o ferrão das espécies *Plesiotrygon iwamae* e *P. motoro* revelou que 400 µg do muco de ambas as espécies foram capazes de induzir rabdomiólise sistêmica, através da injeção nos músculos gastrocnêmicos de camundongos e estudos histológicos do mesmo. O extrato do ferrão de *P. motoro* se mostrou mais potente na atividade miotóxica tanto local como sistêmica, quando

comparado com o extrato dorsal da mesma. E as amostras da espécie *Potamotrygon iwamae* também foram capazes de induzirem efeitos similares (LAMEIRAS *et al.*, 2014). A peçonha de *Himantura gerrardi* induziu alterações cardíacas e alterações no eletrocardiograma foram observadas em ratos e apresentou DL50 de 100mg/Kg em camundongos (DEHGHANI *et al.*, 2009).

Atividade nociceptiva, entretanto, é menos pronunciada na espécie marinha *Dasyatis guttata* do que em *Potamotrygon falkneri*, além de letalidade, atividades dermonecrótica, miotóxica e hialuronidásica serem observadas somente nesta última, o que explica a maior gravidade dos acidentes causados por arraias dulcícolas (BARBARO *et al.*, 2007).

Em um estudo comparativo entre as peçonhas de *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi*, MAGALHAES *et al.* (2006) identificaram respostas edematogênica, nociceptiva e necrótica induzidas em ambas às peçonhas. Atividade proteolítica, inflamatória e antimicrobiana também foi identificada no muco de *Potamotrygon henlei* (MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2011).

No muco de *P. henlei* foram identificadas três frações com atividade antimicrobiana, sendo que uma das frações apresentou atividade antibacteriana e antifúngica. A fração purificada, denominada PcfHb, de massa molecular de 16 kDa, atua como promotor e agente de recrutamento ou potencializador do sistema imunológico. Quando comparada com sequências descritas PcfHb é semelhante às sequências das subunidades beta das hemoglobinas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012). O muco das arraias marinhas *Dasyatis sephen* e *Himantura gerrardi* são igualmente ativas contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus aureus* e *Vibrio cholerae* e fungos *Alternaria alternaria*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, sugerindo que a ação proteolítica encontrada

na ação do muco destes animais possa ser proveniente da imunidade inata do próprio animal (VENNILA *et al.*, 2011).

Na peçonha de *Potamotrygon orbignyi*, foram identificados dois peptídeos, o Orpotrin (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) e o Porflan (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009). O Orportin é um peptídeo hidrofílico que apresenta a sequência: HGGYKPTDK, que apresentam similaridade com à creatina quinase (CK) nos resíduos 95-105, porém não apresenta semelhança com nenhum outro peptídeo ativo conhecido. Orpotrin apresentou um elevado efeito vasoconstritor atuando em arteríolas da rede microcirculatória (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). Porflan apresenta a seguinte sequência de aminoácidos ESIVRPPPVEAKVEETPE, e não possui semelhança com qualquer outro peptídeo ou proteína já conhecida. Possui atividade pró-inflamatória, aumentando o recrutamento de leucócitos circulantes em vênulas pós-capilares e aderência no ambiente microcirculatório (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009), efeito similar ao observado para peçonha de *Potamotrygon orbignyi* por MAGALHAES *et al.* (2006). O mecanismo pelo qual a peçonha induz este recrutamento não foi determinado, podendo estar relacionado com a presença do Porflan e de outras toxinas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

Poucos trabalhos relacionados com a citotoxicidade de peixes são relatados na literatura, em uma pesquisa realizada com o “peixe sapo”, *Thalassophryne nattereri*, foi descrita atividade citotóxica. Os resultados mostraram que a maior atividade ocorreu em 24h em todas as doses testadas (0,3, 1,0 e 3,0 µg). E em 48 e 72h as doses mais eficazes foram as maiores (1,0 e 3,0 µg). Podendo-se concluir que a peçonha de *Thalassophryne nattereri* possui atividade citotóxica em células mononucleadas (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2002). Também já foi relatada atividade citotóxica da peçonha de *Thalassophryne nattereri* em mioblastos, células endoteliais e plaquetas (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2001).

A peçonha bruta dos peixes marinhos *Gymnapistes marmoratus*, *Pterois volitans* e *Synanceia trachynis* apresentaram atividade citotóxica em células corticais murinas cultivadas (CHURCH *et al.*, 2003).

Foi realizado ensaio citotóxico com o muco que recobre o ferrão de *Potamotrygon motoro* nas doses de 5 mg, 1 mg, 500 µg e 100 µg, com o muco da epiderme de diferentes regiões do dorso e com uma cultura de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Pseudomonas aeruginosa* as quais são bactérias encontradas em cultura realizada a partir da água da superfície e do fundo do rio, dos pontos que foram realizadas a coleta das arraias. Mostrando que tanto o veneno, o muco e a cultura testada apresentaram atividade citotóxica em células epiteliais, com exceção da concentração de 100 µg do muco que recobre o ferrão (DOMINGOS *et al.*, 2011).

#### 1.8. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Ações defensivas e ofensivas são desempenhadas por diversas proteínas e peptídeo citolíticos. Estes auxiliam no ataque e degeneração do hospedeiro, fornecendo proteção a qualquer invasão ou prevenindo-o, através da lise celular por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos. A lise celular ocorre de forma direta ou tornam-as suscetíveis a danos, hidrolisando a camada lipídica através da ação enzimática (KINI e EVANS, 1989; HARVEY *et al.*, 1990).

Diferentemente das fosfolipases que causam atividade hemolítica devido habilidade de ocasionar danos na membrana plasmáticas, algumas proteínas não enzimáticas e peptídeos ocasionam lise celular através da formação de poros transmembranas característicos da ação. Desta forma, o interior da célula torna-se hiperosmótico, permitindo a entrada de água o que resulta na lise celular. A literatura relata que algumas toxinas interagem com glycophorin ou banda 3 que são

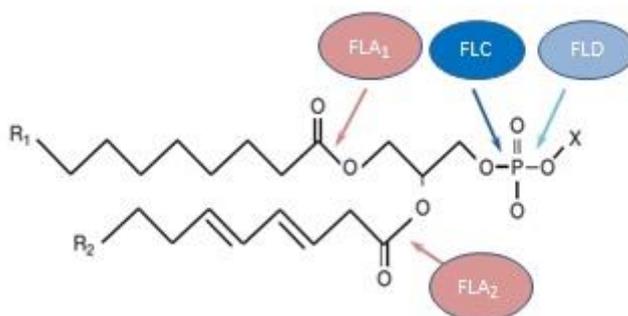
glicoproteínas existentes em membrana de eritrócitos (GARLAND e BUCKLEY, 1988).

A atividade citolítica de eritrócitos foram descritos em diversos animais, incluindo peçonhas de peixes, que apresentaram alta atividade hemolítica (CHURCH e HODGSON, 2002).

### 1.9. FOSFOLIPASE

As composições dos venenos animais estão diretamente relacionadas com a função exercida pela mesma, seja para captura e digestão ou defesa individual e/ou coletiva. As atividades biológicas são compostas por toxinas, proteínas, amins biogênicas, aminoácidos, lipídeos, carboidratos entre outros componentes, sendo que esta variação possa sofrer influência de diversos fatores como distribuição, idade, sexo e também dentre os níveis interfamiliar, intergênero e até mesmo individualmente (CHIPPAUX *et al.*, 1991). Dentre os diversos componentes dos venenos estão as fosfolipases.

Fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídios, produzindo ácidos graxos e outras substâncias e são classificadas em quatro classes (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C e D), de acordo com o sítio de clivagem do fosfolipídio (KINI,1997)



**FIGURA 3.** Sítio de clivagem das fosfolipases. Modificado por YANG *et al.* (2014).

As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas estáveis que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil de fosfolípido de membrana celular e causa a liberação de ácido graxo e fosfolípido (KINI, 1997). Sendo que estes produtos podem ser usados como substratos para a síntese de eicasanóides ou precursores em diversas reações inflamatórias (MOREIRA; NELSON *et al.*, 2008). As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas de grande interesse científico e médico devido o seu envolvimento em danos inflamatórios e acidentes causados por animais peçonhentos (STÁBELI *et al.*, 2012). Porém, a fosfolipase A<sub>2</sub> Lys 49, assim denominada, devido à substituição do resíduo usual Asp49, não possui atividade catalítica mensurável (LOMONTE *et al.*, 2003). WATANABE *et al.* (2005) apresentaram uma hipótese acerca da perda catalítica, que supõe que com a presença da Lys49 localizada na região hidrofóbico do sítio catalítico capta o ácido graxo substrato, interrompendo a ação catalítica da molécula.

As fosfolipases A<sub>2</sub> estão diretamente ligadas a diversas propriedades tóxico-farmacológico, assim contribuem para o efeito tóxico de diversos envenenamentos. Sendo a miotoxicidade e apoptose ações que podem ser mediados pelas fosfolipases A<sub>2</sub> (FULY *et al.*, 2002).

De acordo com a origem biológica, características bioquímicas e estrutura primária as fosfolipases A<sub>2</sub> são agrupadas em quatorze grupos (SIX e DENNIS, 2000; MURAKAMI e KUDO, 2002; FRY *et al.*, 2006). As fosfolipases A<sub>2</sub> pertencentes aos grupos I,II, III, V,IX,X,XII,XIII e XIV são enzimas que possui massa molecular que apresenta variação de 12000 a 19000 Da, são secretórias e Ca<sup>++</sup> - dependentes, encontrados em diversos organismos como artrópodo, cnidários, moluscos e serpentes. As fosfolipases A<sub>2</sub> pertencentes aos grupos VII e VIII possuem massa molecular superior oscilando entre 26000 a 45000 Da, são consideradas Ca<sup>++</sup> independentes e são encontradas no sangue de mamíferos. Por fim, as fosfolipases A<sub>2</sub> grupos IV e VI são

independentes ou pouco dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ , possuem massa molecular aproximada de 84000 e 114000 Da, são enzimas citosólicas encontradas em diversas células e órgãos humano como: plaquetas, linfócitos B, monócitos, coração e rins. As fosfolipases com maior quantidade de pesquisas são as fosfolipases  $A_2$  ofídicas, que são classificadas nos grupos I e II, baseado nos padrões de pontes de dissulfeto e também em base nas estruturas primárias (BALSINDE *et al.*, 1999; SIX e DENNIS, 2000; SOARES *et al.*, 2001).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Em diversas regiões brasileiras, os acidentes provocados por arraias são temidos, pois geralmente causam incapacidade física temporária ou permanente, devido à grande dor e necrose provocadas pelo acidente em níveis variados de acordo com a espécie envolvida no acidente. Uma vez comparada arraias marinhas e dulcícolas, a proporção de necrose cutânea é maior em arraias dulcícolas da família Potamotrigonidae, com índice de 90% enquanto as marinhas apresentam índice de 25% de necrose. Em um trabalho realizado com 84 casos de envenenamentos ocasionados por arraias, a necrose foi relatada em 76 acidentados totalizando em 90,4% dos casos estudados (HADDAD JR, V. *et al.*, 2004). Eventos como estes sugerem que a peçonha de arraia possa conter enzimas que causem distúrbios e degradação da matriz extracelular. E a alucidação destes componentes podem auxiliar na buscar de tratamentos mais eficazes neste tipo de acidente.

## **3. OBJETIVO GERAL**

Identificar e caracterizar componentes citotóxicos na peçonha da arraia fluvial da espécie *Potamotrygon falkneri*.

### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Fracionar a peçonha de *P. falkneri*;
- Identificar as principais frações citotóxicas por meio do ensaio de viabilidade por exclusão do corante azul de Trypan na linhagem H9 e de hemólise em eritrócitos humanos;
- Testar quanto à atividade fosfolipásica;

- Identificar a massa molecular do(s) componente(s) citotóxicos.

#### 4. METODOLOGIA

##### 4.1. EXTRAÇÃO DO EXTRATO DO FERRÃO

As arraias da espécie *Potamotrygon falkneri* foram coletadas no Rio Paraná, no estado do Mato Grosso do Sul, no município de Três Lagoas, através da pesca subaquática realizada sob a licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio nº 34975-2. Para obtenção do extrato, os ferrões foram retirados inteiros dos espécimes com bisturi e mantidos a uma temperatura de -78°C durante o deslocamento. No laboratório, a epiderme e a derme do ferrão foram raspadas e o material obtido macerado e ressuspenso em 1 mL água. Em seguida, centrifugado a 6000 g por 15 min a -4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

##### 4.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O conteúdo de proteína do extrato bruto do ferrão foi determinado pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão (1mg/mL). Uma amostra do extrato bruto do ferrão (40 µL) foi misturada a 1,0 mL da solução “C”, reagente constituído de 98% de solução “B” (Carbonato de Sódio 0,188 M, Hidróxido de Sódio 1 M, diluídos em água destilada suficiente para 1 L) e 2% de solução “A” (Sulfato de Cobre Pentahidratado 0,2 M, Citrato de Sódio Hihidratado 0,3 M), diluído em água destilada suficiente para 100 mL. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionada 100µl da solução “D”, constituído de Folin 1 N e água destilada. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Transcorrido este tempo a absorbância foi monitorada a 750 nm.

### 4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O perfil protéico do extrato do ferrão foi analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com um gel a concentração de 12% conforme o método de LAEMMLI (1970). Após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata. Utilizou-se o sistema mini-gel, com tampão de corrida tris glicina (tris-base 25 mM, glicina 2,6 M, SDS 1%, pH 8,7). O gel separador (acrilamida 12%; bis-acrilamida 0,4%; tris-base 400 mM; SDS 0,1%; pH 8,7), e o gel concentrador (acrilamida 4%; bis-acrilamida 0,1%; tris-base 120 mM; SDS 0,1%; pH 6,8), foram polimerizados com temed 0,1% e persulfato de amônio 0,2%. 10 µg do extrato bruto foram preparados em 25 µL de tampão de amostra (tris-base 60 mM, pH 6,8; β-mercaptoetanol 1%; SDS 4%; glicerol 5%, azul de bromofenol 0,0001%) e logo depois colocadas em banho-maria fervente durante 5 minutos e 5 µL, 7 µL e 10 µL foram aplicadas no gel. A voltagem de corrida foi de 120 V constante e amperagem de 30 mA, com um tempo de corrida de aproximadamente 90 minutos.

#### 4.3.1. COLORAÇÃO DO GEL

Coloração do gel – baseado no método descrito por BLUM *et al.* (1987). Os géis foram deixados em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético glacial 12% e formaldeído 0,05%), sob leve agitação durante duas horas. Logo depois, lavados três vezes em solução de etanol 50% durante 20 minutos cada lavagem. Em seguida, pré-tratados durante 1 minuto com solução de tiosulfato de sódio 0,01%, e lavados três vezes com água destilada por 20 segundos, cada lavagem. Após o pré-tratamento, o gel foi transferido para a solução corante (nitrato de prata 0,2% e formaldeído 0,075%). Após 20 minutos, foram lavados três vezes com água destilada durante 20 segundos, cada lavagem, e colocados na solução reveladora (carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05% e tiosulfato de sódio 0,01%), até a visualização das bandas de proteína. A

revelação foi interrompida pela adição da solução de parada (metanol 50% e ácido acético glacial 12%).

#### 4.4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Os extratos do ferrão de *Potamotrygon falkneri* referente a cinco ferrões escolhidos aleatoriamente foram solubilizados em 1,0 mL de água contendo 0,1% de ácido trifluoracético. A solução foi então centrifugada a 1000 g durante 5 min, e 200 µL do sobrenadante contendo 86 µg de conteúdo proteico foram aplicados em uma coluna analítica Vydac C18 (218TP54, 250 mm X 5 mm), acoplada em um equipamento Shimadzu LC-20AT com detector PDA SPD-20AV. A eluição das frações foi conduzida em um gradiente de 0-100% de acetonitrila acidificada com TFA 0,1% v/v, durante 80 min, em um fluxo de 1,0 mL/min. A absorbância foi monitorada a 280 e 214 nm e as frações coletadas manualmente. As frações coletadas foram secas a vácuo em rotavapor Centrivap Cold Trap, Labconco e recromatografadas em uma coluna analítica Vydac C18 (218TP54, 250 mm X 5 mm), com otimização do gradiente de acetonitrila.

#### 4.5. ENSAIOS DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

##### 4.5.1. TESTE HEMOLÍTICO

O ensaio hemolítico foi realizado segundo o método de RANGEL *et al.* (1997). Eritrócitos de sangue humano A+ heparinizado foram utilizados no ensaio hemolítico. As hemácias foram separadas do plasma por centrifugação e lavadas três vezes em solução fisiológica Krebs-Henseleit (NaCl 113mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM; KCl 4mM; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; glicose 11,1mM) com centrifugação de 10 minutos a 1000 g entre elas. Utilizou-se o mesmo tampão para

solubilizar as amostras e preparar uma solução de 4% (v/v) de hemácias. Amostras do extrato bruto e as regiões cromatográficas foram ressuspendidas em 80 µL de tampão e incubadas por 60 min a temperatura ambiente com 150 µL da suspensão de eritrócitos a 4%. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1000 g por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância realizada a 540 nm em espectrofotômetro (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific). Como controle positivo foi utilizado 150 µL da suspensão de eritrócitos a 4% (v/v) incubada com 80 µL de Triton X- 100 1%(v/v) e como controle negativo foi utilizado 150 µL da suspensão de eritrócito 4% (v/v) com o tampão.

#### 4.5.2. ENSAIO PRELIMINAR

A fim de verificar quais componentes do extrato bruto de *Potamotrygon falkneri* apresentariam atividade hemolítica, cada região cromatográfica de cinco corridas de RPHPLC e também o extrato bruto (34 µg) foram solubilizadas em tampão e incubadas com a suspensão de hemácias de acordo com o método descrito acima.

#### 4.6. TESTE DE EXCLUSÃO DE CORANTE AZUL DE TRYPAN

##### 4.6.1. MEIO DE CULTURA

O meio utilizado neste trabalho foi o RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), o mesmo foi reidratado em 1L de água bidestilada, adicionado 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e o pH ajustado para 6,8 com HCl 5M. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm sob pressão de bomba de vácuo e armazenado a 4°C. Foi realizado o teste de esterilidade do meio, pelo método que utiliza Luria-Bertani. Foram utilizados 2 mL do meio RPMI-1640 que foram incubados com 10 mL de Luria-Bertani por 48h a 37°C em estufa B.O.D. Após comprovada a esterilidade, o

meio RPMI-1640 foi suplementado com 10% de soro bovino fetal, inativado previamente em banho-maria por 30 minutos a 56°C e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina)(Sigma).

#### 4.6.2. MANUTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS

As células da linhagem H9 (linfoblastos humanos) foram cultivadas em garrafas de 25 e 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Suíça) em meio de cultura viável para as células em suspensão e mantidas em incubadora (SANYO), em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com temperatura de 37°C e umidade controlada. De acordo com a proliferação celular, o meio foi trocado após a centrifugação das células por 5 minutos a 1006 g, e adicionado meio novo ao sedimento celular. O crescimento celular foi constantemente monitorado em microscópio invertido.

A quantidade de células viáveis foi determinada pelo método que possui como princípio a exclusão do corante azul de Trypan o qual avalia a integridade da membrana celular. Foram utilizados 20 µL de suspensão de células H9 (linfoblastos humanos) homogeneizadas e 20 µL de azul de Trypan, na concentração de 0,4% p/v em PBS, pH 7,0. A solução preparada foi transferida para a câmara de Neubauer e as células foram contadas em 4 quadrantes existentes na câmara. As células vivas não absorvem o corante e as células mortas coram-se em azul. Para o cálculo das células viáveis por mililitro foi usada a seguinte equação:

$$VC = \text{Total}/4 \times 20000 = \text{número de células/mL}$$

Após a contagem, o meio RPMI foi ajustado para o volume total de 10 mL.

#### 4.6.3. TESTE DE EXCLUSÃO DE CÉLULAS INVIÁVEIS PELO AZUL DE TRYPAN

O ensaio de exclusão de azul de Trypan foi realizado na presença das frações cromatográficas como estratégia de busca pelos componentes citotóxicos. As células H9 (linfoblastos humanos) foram incubadas com o extrato bruto do ferrão na concentração 86 µg/mL por 6h, 12h e 24h, quanto na presença das regiões cromatográficas resultantes de cinco corridas cromatográficas (Região 1: 72 µg/mL; Região 2: 150 µg/mL; Região 3: 480 µg/mL; Região 4: 90 µg/mL; Região 5: 240 µg/mL e Região 6: 90 µg/mL), porém com alteração dos tempos de leitura para 24, 48 e 72 horas. Com observação dos resultados deste ensaio com as frações cromatográficas foi realizado o mesmo ensaio com a região que apresentou uma tendência a inibição celular denominada de região 1 (72 µg/mL, 180 µg/mL e 360 µg/mL) e com a região que apresentou maior índice de hemólise denominada de região 5 (29.25 µg/mL, 58.5 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL e 315 µg/mL ). E com fração recromatografada (88.5 µg/mL e 177 µg/mL). Após os períodos de incubação, uma alíquota de 20 µL da suspensão de células foi diluída em azul de Trypan (0,4% p/v em PBS).

#### 4.7. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A fração de interesse foi dissolvida em uma matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico dissolvida em acetonitrila/água/TFA 3%, (2,5/2/0,5), na proporção 3:1 (matriz:amostra). As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF operando no modo linear positivo, utilizando calibração externa.

#### 4.8. ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Para a atividade fosfolipásica foram utilizados dois testes. O primeiro baseado no método de (MARINETTI, 1965), tratando-se de um ensaio geral de fosfolipase, na qual a mistura da reação contém 12,5 µL de emulsão de gema de ovo (2mg/mL) em PBS (1,37 mM NaCl, 26,8 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Após equilíbrio térmico a 30°C, adiciona-se 10 µL do extrato bruto (4,3 µg), sendo que a mesma quantidade de PBS foi adicionada ao controle negativo. Todos os tubos foram incubados durante 30 min a 30°C. A diminuição da turbidez foi medida espectrofotometricamente a 920 nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific) e comparada com o controle negativo. A atividade foi realizada na presença e ausência de CaCl 10 mM (25µL). A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima capaz para produzir um decréscimo de 0,001 unidade de absorbância por miligrama de proteína.

Realizou-se também o teste de hemólise indireta (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984), para o ensaio utilizou-se eritrócitos humanos (A+) heparinizados previamente centrifugados a 2790 g e lavadas três vezes com PBS (1,37 mM NaCl, 26,8 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) e em seguida, utilizado para o preparo de uma diluição de 2,0% no mesmo tampão. A mistura de incubação continha 10 µl do extrato bruto (4,3 µg), 15 µl de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 173 µl de eritrócitos 2% e 7 µl de emulsão de gema de ovo (2 mg/ml). Após incubação por 30 minutos a 37°C, os tubos de reação foram centrifugados por 5 minutos a 690 g e a absorbância medida a 540nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific). Como controle negativo a amostra foi substituída por PBS e como controle positivo foi utilizado peçonha de *Crotalus* a 1mg/ml. A atividade específica foi definida como a

quantidade de enzima que provoca o aumento de 0,001 unidades de absorvância por miligrama de proteína.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à distribuição normal usando o teste de Shapiro Wilk. Para verificar a variação estatística foi usado o teste de ANOVA (Two way;  $\alpha = 5\%$ ), e os resultados foram expressos pela média e desvio padrão. Sendo que para análise foram utilizados os *software* GraphPad Prism v. 5.04 e R x64 3.2.1.

### 5. RESULTADOS

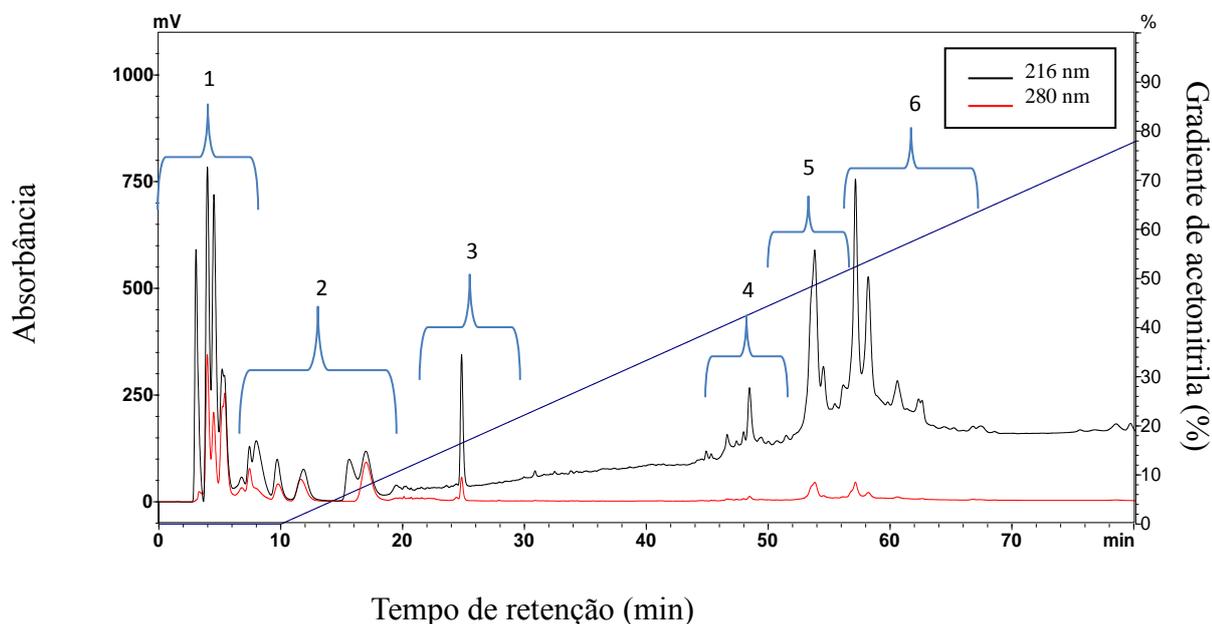
#### 5.1. EXTRATO PROTÉICO

Cinco ferrões de arraia *P. falkneri* foram macerados e solubilizados em água, obtendo-se 430  $\mu\text{g}$  de conteúdo protéico total. Estimando, portanto que cada ferrão possui aproximadamente 86  $\mu\text{g}$  de extrato.

#### 5.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

O fracionamento resultou na obtenção de 6 regiões representadas na Figura 4. Estas foram separadas para realização do teste hemolítico e exclusão de azul de Trypan como um rastreamento para identificar o componente citotóxico e hemolítico. O perfil cromatográfico apresentou dois grupos de componentes, um grupo hifrofílico que foram eluídos 0-10% do solvente B (acetonitrila). E o segundo grupo foi representado por

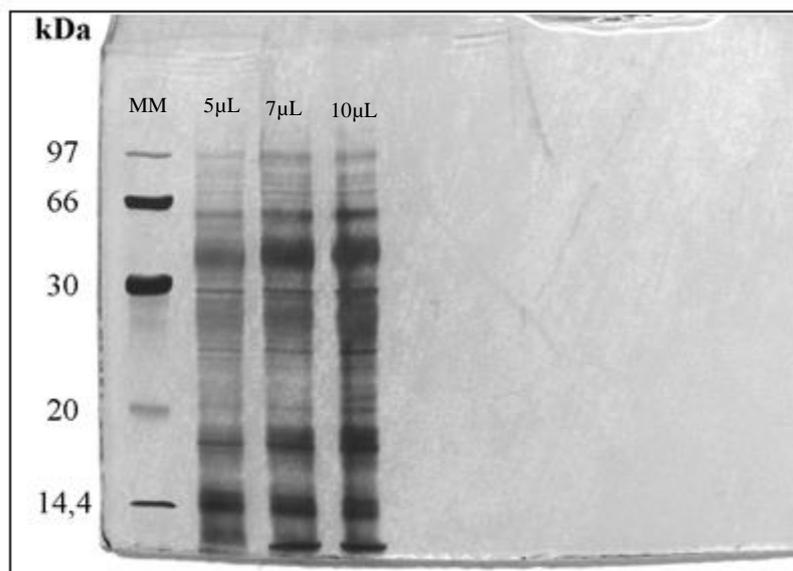
componentes hidrofóbicos que foram eluídos com aproximadamente 45% do solvente B (acetonitrila).



**FIGURA 4.** Perfil cromatográfico do extrato do ferrão de *Potamotrygon falkneri*. Foi utilizada uma coluna analítica Vydac C18 (218TP54, 250 mm X 5 mm), acoplada em um equipamento Shimadzu LC-20AT utilizando um detector PDA SPD-20AV, eluição das frações foi conduzida em um gradiente de 0-100% de acetonitrila acidificada com TFA 0,1% v/v, em água, durante 80 min, em um fluxo de 1,0 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm e 280 nm. O gradiente de acetonitrila é mostrado pela linha azul. Foram utilizados 200µL do sobrenadante da extração.

### 5.3. GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para o conhecimento do perfil protéico do extrato do ferrão, realizou-se um gel de poliacrilamida para a verificação do mesmo. Os componentes apresentaram massas entre 97-14,4 Da e também componentes inferior a este valor de massa. Foi observado um componente no valor aproximado de 14,4 Da que pode indicar a presença de fosfolipase (Figura 5).



**FIGURA 5** - Perfil protéico do extrato de *P. falkneri* em SDS-PAGE 12%. MM- Marcador molecular, 5µL, 7µL e 10 µL utilizados em cada slot.

#### 5.4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

No ensaio hemolítico, 34 µg/mL do extrato bruto foi capaz de induzir 59% de hemólise. A região que produziu hemólise intensa foi à região 5 (Figura 4) que apresentou hemólise de 26% na concentração de 5,2 µg/mL .

#### 5.5. FOSFOLIPASE E FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>

O extrato bruto do ferrão de *P. falkneri* apresentou atividade tanto na presença de CaCl com 28.067 U/mg de proteína quanto na ausência que apresentou 22.680 U/mg de proteína, enquanto o controle positivo (*Crotalus*) apresentou 1.954 U/mg e 619 U/mg de proteína respectivamente.

A atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> foi realizada através da hemólise indireta, apresentou atividade positiva com 9.556 U/mg de proteína, enquanto a peçonha de *Crotalus* usada como controle positivo apresentou 112.971 U/mg de proteína.

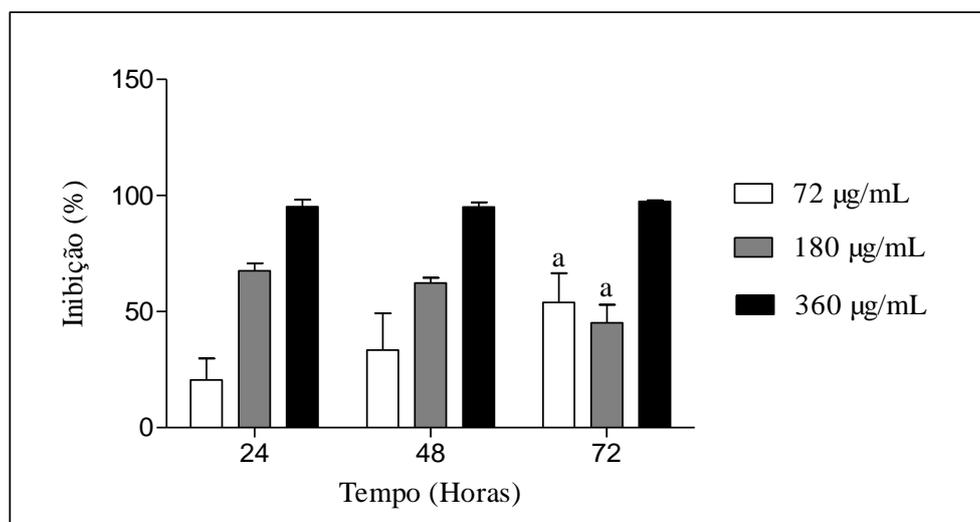
## 5.6. CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O teste de exclusão de azul de Trypan foi realizado para avaliar a viabilidade celular com a linhagem H9 cultivada em RPMI e mantida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Um ensaio realizado com o extrato bruto do ferrão nos tempos 6,24 e 48 horas demonstrou que 86 µg/mL em 24 horas foi capaz de inibir aproximadamente 52% das células utilizadas.

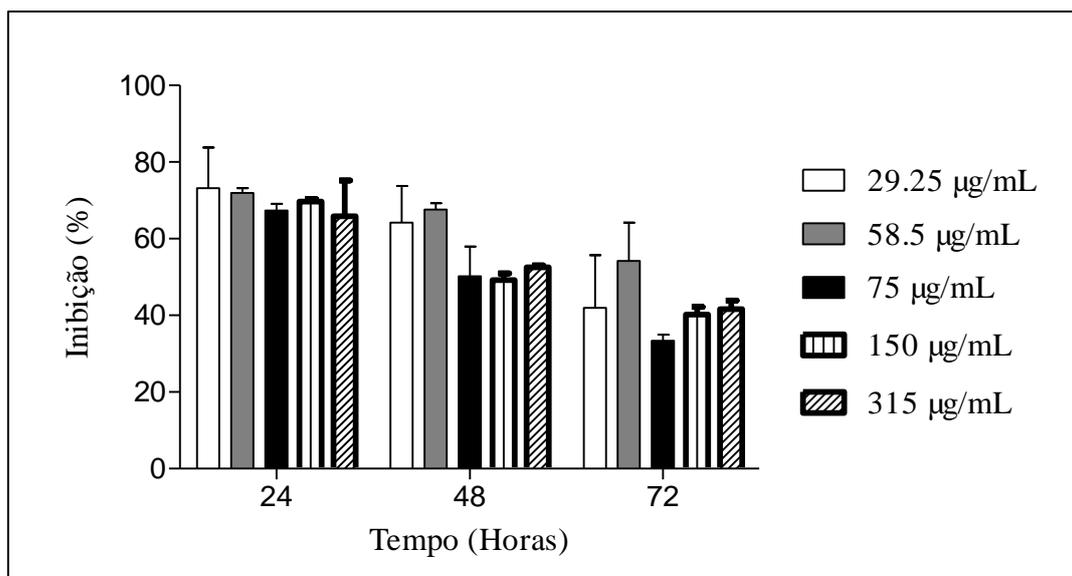
O mesmo ensaio foi realizado com as regiões do perfil cromatográfico porém com alteração dos tempos para 24, 48 e 72 horas. Observamos que somente a região 1 (Figura 4) apresentou uma tendência em diminuir o crescimento celular nos tempos estudados, apresentando uma maior atividade em 72 horas com inibição de aproximadamente 34% das células analisadas.

Assim foram realizados novos ensaios com a região 1 em três diferentes concentrações e observado uma resposta dose dependente nas concentrações de 72 µg/mL, 180 µg/mL e 360 µg/mL. Somente em 72 horas que as concentrações 72 e 180 µg/mL apresentaram igual inibição. Esta região foi, portanto uma região que ocasionou danos celular dose dependente (Figura 6).



**FIGURA 6.** Efeito sobre a viabilidade celular causado pela região 1 do perfil cromatográfico do extrato do ferrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais não se diferem estatisticamente a  $p < 0,05$ .

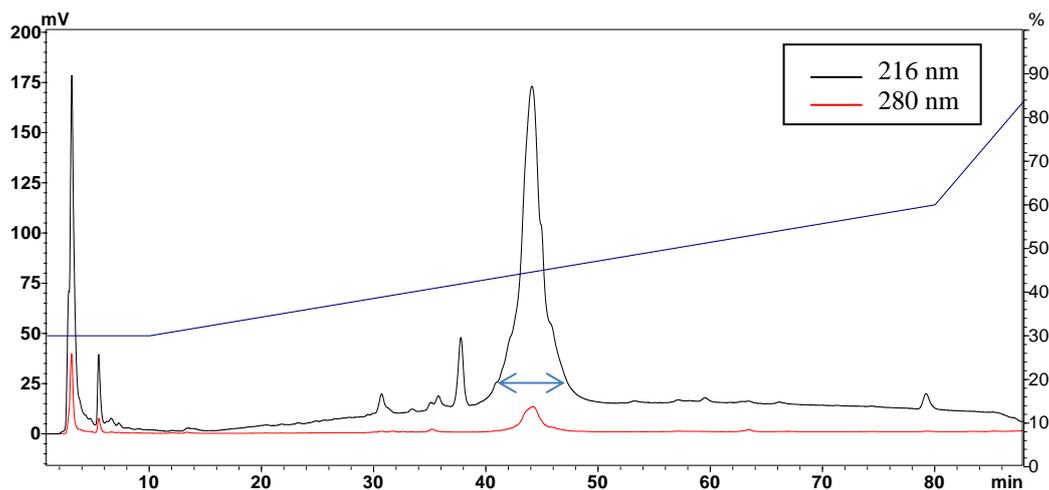
A região 5 (Figura 4) também foi testada devido a ação hemolítica ocasionada pela mesma. Em 24 horas apresentou uma maior inibição, porém não apresentou diferença significativa entre as concentrações testadas. E nos tempos de 48 e 72 horas a inibição diminuiu e não apresentou diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Figura 7).



**FIGURA 7.** Efeito sobre a viabilidade celular causado pela região 5 do perfil cromatográfico do extrato do ferrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais se diferem estatisticamente a  $p < 0,05$ .

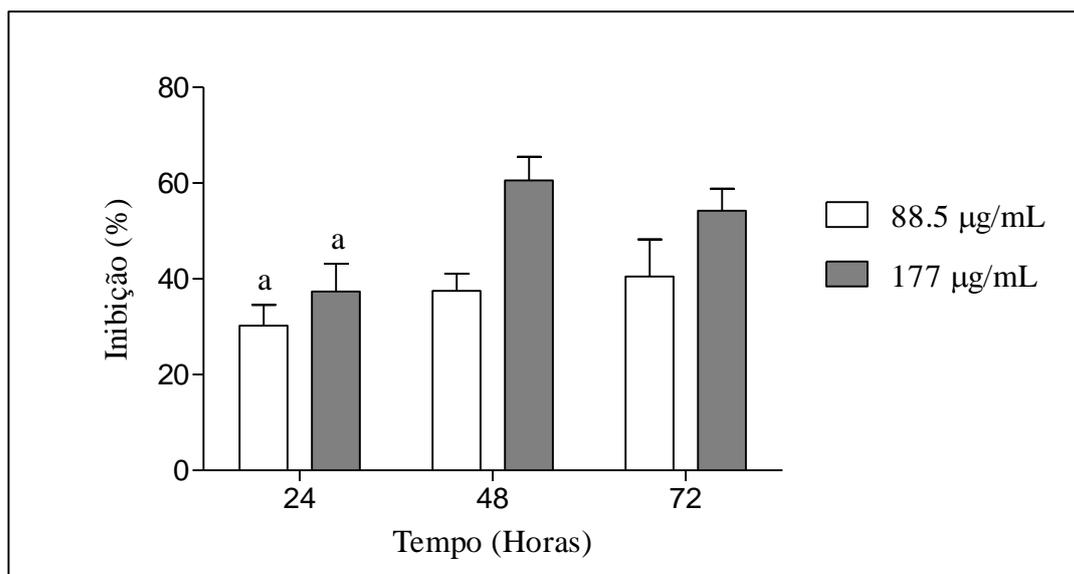
Apesar da região 1 apresentar maior dano celular, a região escolhida para recromatografia e novos testes foi a região 5 por ocasionar inviabilidade celular em 24 horas quanto indução de hemólise. Portanto, com a região 5 (Figura 4) foi realizado a recromatografia e o obtido o perfil cromatográfico indicado na figura 8.

Na recromatografia foi realizada em uma coluna analítica C18, apresentou eluição com aproximadamente 50 minutos e 42% de acetonitrila, coletado o material correspondente ao indicado na figura 8, com o material coletado foi realizado o mesmo ensaio de exclusão de azul de Trypan em células H9.



**FIGURA 8.** Perfil da recromatografia da fração 2 de *Potamotrygon falkneri*. Foi utilizada uma coluna analítica Vydac C18 218TP54, 250 mm X 5 mm), acoplada em um equipamento Shimadzu LC-20AT utilizando um detector PDA SPD-20AV, eluição das frações foi conduzida em um gradiente de 30-90% de acetonitrila acidificada com TFA 0,1% v/v, em água, em um fluxo de 1,0 mL/min. A fração eluída foi monitorada a 216 nm e 280 nm. O gradiente de acetonitrila está demonstrado pela linha azul.

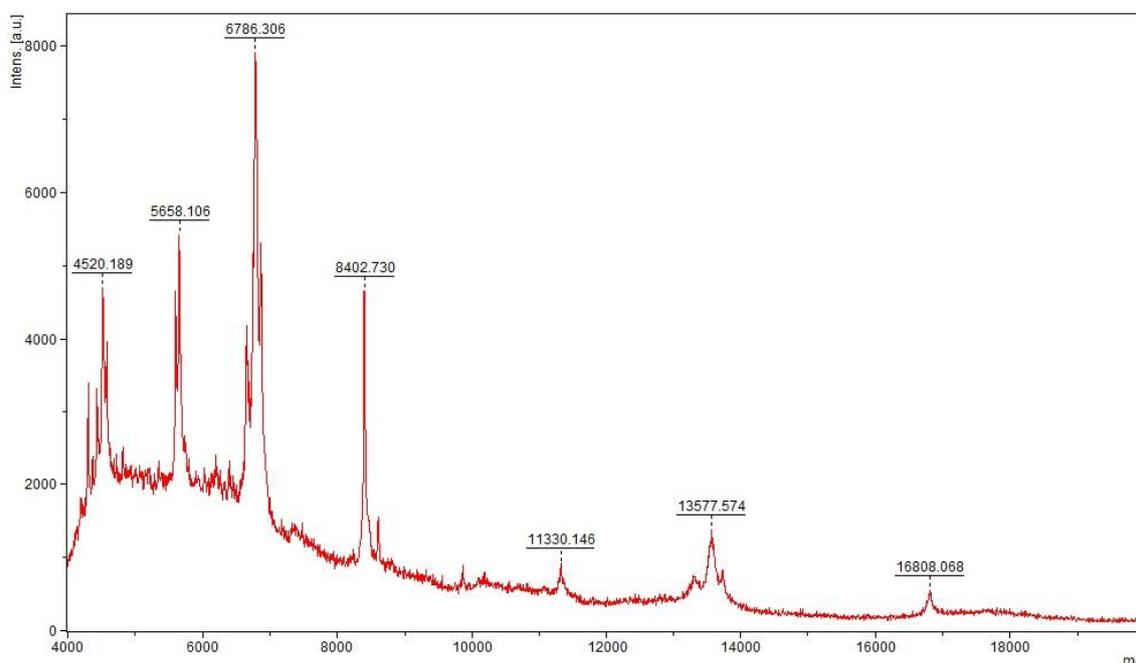
Um novo ensaio de exclusão de azul de Trypan com o material coletado na recromatografia apresentou dose resposta nas duas concentrações testadas. Sendo que 24 horas não apresentou diferença significativa entre as concentrações testadas e maior inibição ocorreu com 48 horas de ensaio. Sendo a inibição dose dependente a partir de 48 horas (Figura 9).



**FIGURA 9.** Efeito sobre a viabilidade celular causado pela fração da recromatografia da região 5. Os resultados foram submetidos à análise de variância two-way (ANOVA). Letras iguais não se diferem estatisticamente a  $p < 0,05$ .

## 5.7. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A recromatografia referente à fração com atividade hemolítica e citotóxica foi submetida à análise por espectrometria de massa em MALDI/TOF para verificar as massas dos componentes presentes, apresentando o espectro representado na figura 10. Onde podemos observar a existência de três componentes, em que dois possuem dupla carga com massa de 16.808,08 Da e 11.330,146 Da e um com tripla carga com massa de 13.577,574 Da (Figura 10).



**FIGURA 10.** Espectro de massa da fração 2 purificados por RP-HPLC em coluna analítica  $C_{18}$ . O espectro foi obtido plaqueando as amostras em ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico e analisada no modo linear positivo. Demonstrando a presença de 3 componentes e suas respectivas cargas.

## 5.8. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA $A_2$ DA REGIÃO 5

A região 5 apresentou atividade de fosfolipase  $A_2$ , sendo que esta apresentou atividade no valor de 103 U/mg de fração.

## 6. DISCUSSÃO

Os venenos são misturas complexas de diversos componentes com atividades biológicas e farmacológicas, que compõem mais de 90% do peso seco do mesmo. Compostas por uma variedade de proteínas e enzimas, como proteases, fosfolipases, esterase, L-aminoácido oxidase e também diversas proteínas sem ação enzimáticas e peptídeos (STÁBELI *et al.*, 2012). Estas enzimas citadas são de extrema importância para a composição do veneno de diversos animais como as aranhas, abelhas, cobras e escorpiões que entre as diversas funções provavelmente estão envolvidos na atividade tóxica apresentada por estas peçonhas (CARRIJO *et al.*, 2005).

Como citado, a grande parte dos trabalhos realizados com peçonhas são oriundos de animais terrestres uma vez que estes apresentam maior risco de acidentes e também pela facilidade de obtenção e extração de material para o estudo. Porém, o número de pesquisas relacionadas aos animais aquáticos aumentou nestes últimos anos, por estes também apresentarem uma vasta fonte para compostos farmacológicos ou agentes terapêuticos (CHURCH e HODGSON, 2002).

Com a dosagem proteica foi possível observar que o extrato aquoso do tecido que recobre o ferrão de arraia apresenta aproximadamente 86 µg de proteína.

No SDS-PAGE, foi observada a presença de componentes com massa molecular com variação de 97-14,4 Da. Exibiu também componentes com valores inferiores a 14,4 Da corroborando com CONCEIÇÃO *et al.*, (2006; 2009), que isolaram e caracterizaram dois peptídeos na espécie de *Potamotrygon orbignyi*, o Porflan com 2006,09 Da e o Orpotrin com 1001,49 Da. No gel de poliacrilamida também foi identificado um componente com aproximadamente 14,4 Da que pode indicar a presença da fosfolipase.

O extrato do ferrão de *Potamotrygon falkneri* foi filtrado em filtros de 3 e 10 Da e realizado o perfil cromatográfico em uma coluna analítica C18 com o filtrado, porém

nenhum componente foi identificado em ambos os filtros. Entretanto, com a ausência de filtração foi possível observar a ampla variedade de componentes existentes no extrato, apresentando dois grupos, hidrofílicos e hidrofóbicos. O perfil foi dividido em seis regiões para a realização dos testes hemolíticos e a viabilidade de exclusão de azul de Trypan, para a obtenção de uma maior concentração das amostras.

O extrato bruto do ferrão de *P. falkneri* apresentou atividade hemolítica assim como as regiões obtidas, porém em uma pesquisa realizada com a mesma espécie *P. falkneri* não apresentou a atividade hemolítica em sangue humano mesmo na maior concentração testada de 64 µg. Em arraiais de habitat marinho, como na peçonha *Dasyatis guttata* (BARBARO *et al.*, 2007), a atividade hemolítica se apresentou ausente. Uma vez que a sintomatologia de hemorragia não é citada em acidentes ocasionados por arraiais.

Em espécies ósseas de habitats marinhos como *Synanceia verrucosa* foi observada alta atividade hemolítica em eritrócitos de coelhos, porém o componente responsável por esta ação demonstrou-se termolábil (GARNIER *et al.*, 1995). Estudos relacionados com o *Synanceia horrida* apresentou potente ação em eritrócitos de roedores, porém a atividade reduziu quando usados eritrócitos ovinos e humanos (GWEE *et al.*, 1994). *Scorpaena guttata*, entretanto, apresenta atividade hemolítica sobre eritrócitos ovinos e *Notesthes robusta* mostrou-se ativa sobre eritrócitos humanos (CHURCH e HODGSON, 2002). A espécie *Scorpaena plumieri* (peixe escorpião) apresentou alta atividade hemolítica em eritrócitos de coelhos, sendo que a maior atividade foi com a peçonha recém-extraída (CARRIJO *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2013), fator que pode influenciar nos resultados obtidos nos estudos mencionados, sendo difícil estabelecer comparações entre os ensaios citados, sendo que diversos

fatores como temperatura do ambiente e do ensaio, tempo de exposição à toxina entre outros podem ser responsáveis pelas alterações relatadas (ANDRICH *et al.*, 2010).

Uma característica compartilhada nos venenos de peixes é a instabilidade, não apenas à temperatura, mas também no que diz respeito ao pH, liofilização e armazenamento (GWEE *et al.*, 1994; GARNIER *et al.*, 1995; CHURCH e HODGSON, 2002; HADDAD JR *et al.*, 2003; CARRIJO *et al.*, 2005; ANDRICH *et al.*, 2010). Podendo estes fatores ter influenciado nos resultados obtidos.

A atividade citolítica é de extrema importância e atua em ações ofensivas e defensivas nos organismos. Geralmente estas funções são resultantes da lise celular enzimática oriunda das fosfolipases A<sub>2</sub> e C, enzimas comuns presentes em diversos organismos como répteis, anfíbios e cnidários (GOMES *et al.*, 2013). Componentes com atividades citolíticas como a atividade de fosfolipase foram relatadas em arraias de ambos os habitats tanto dulcícola como marinhas (BARBARO *et al.*, 2007). No presente trabalho, foi observada tal atividade na peçonha bruta, corroborando com BARBARO *et al.* (2007). O extrato de *P. falkneri* apresentou maior atividade na ausência de cálcio, entretanto a maior parte dos grupos de fosfolipases são Ca<sup>+</sup> dependentes (STÁBELI *et al.*, 2012).

Após comprovado a atividade enzimática de fosfolipase foi realizado o teste específico para a fosfolipase A<sub>2</sub> através da hemólise indireta. Corroborando mais uma vez com BARBARO *et al.* (2007), a atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> foi constatada.

OLIVEIRA JR (2014), realizou uma busca por transcritos na peçonha de *P. falkneri* e *P. motoro*, identificou em ambas as espécies possíveis transcritos de fosfolipases, sendo a maioria identificada como fosfolipase A<sub>2</sub>.

Fosfolipases A<sub>2</sub> também foram encontradas em organismos aquáticos como no equinodermo marinho *Acanthaster planci* que apresentou duas fosfolipases,

denominadas AP-PLA2-I e II. AP-PLA2-I possui massa aproximada determinada através de gel filtração de 28 kDa, porém apenas 15 kDa quando recuperada por SDS-PAGE, sugerindo ser um dímero composto por duas subunidades idênticas. AP-PLA2-II, em contraste, revela pelos mesmos métodos, uma única fração com massa aproximada entre 12 e 15 kDa, portanto monomérica. Para ambas fosfolipases, os 62 aminoácidos N-terminais são conservados, possuem resíduos Asp, Glu e Gly em abundância e pouca quantidade de resíduos Met, His, e Trp (AZUO SHIOMI *et al.*, 1998).

Na espécie marinha *Rhopilema nomadica* (cnidário) foi identificada atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> em um componente com massa molecular de 14 – 16 kDa, sendo que a mesma foi testada quanto a sua estabilidade da qual se mostrou dependente de temperatura, obteve hidrólise máxima na temperatura de 4 °C e a diminuição de atividade foi observada com o aumento da temperatura, com 37°C foi encontrada uma diminuição significativa. Por fim, a perda total foi obtida depois de armazenada por três semanas a 4 e -36°C. Concluindo que a atividade de fosfolipase é instável quanto à temperatura (GUSMANI *et al.*, 1997). Entretanto, algumas espécies marinhas se mostraram desprovidas de atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> como: *Scorpaena plumieri*, *Synanceia verrucosa* e *Synanceia horrida* (GWEE *et al.*, 1994; GARNIER *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2013).

Transcritos de possíveis fosfolipases A<sub>2</sub> foram encontradas na peçonha *P. falkneri* que apresentaram massas moleculares teóricas de 15219.27 Da, 14331.72 Da e 15219.27 Da, considerando as modificações postransducionais (OLIVEIRA JR, 2014). Neste trabalho a recromatografia utilizando uma coluna analítica C18 da região hemolítica/citotóxica apresentou três componentes com massas de 11330,146 Da,

13577,574 Da e 16808,068 Da. Outras colunas como gel filtração e troca iônica foram testadas, porém a purificação dos componentes não foi possível.

Entretanto, uma vez que a atividade fosfolipásica se mostrou presente nesta peçonha, esta pode mediar a miotoxicidade do envenenamento causado por arraias. Além da atividade miotóxica, a rabdomiólise foi ocasionada pelo extrato do ferrão e muco dorsal de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon iwamae*, além da atividade necrosante, alguns efeitos fisiopatológicos foram relatados como a presença de doenças inflamatórias e infiltrados de macrófagos e neutrófilos com diminuição do número de eosinófilos e linfócitos (LAMEIRAS, COSTA, *et al.*, 2014).

A necrose presente no envenenamento por arraia pode ser causado devido à presença de fosfolipases e proteases que rompem a membrana plasmática devido ao aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico. O extravasamento do conteúdo celular juntamente com a ativação das proteases sinaliza a migração de macrófagos e ativa uma resposta inflamatória do sistema imune (ANAZETTI e MELO, 2007). Em contraste, OLIVEIRA JR (2014) encontrou no transcrito de *P. falkneri* a presença de caspases (2,6,7,8,9 e 10), enzimas envolvidas nos mecanismos de morte celular programado.

Observada a ação hemolítica e a presença de fosfolipase, foi realizado o teste de viabilidade celular por exclusão azul de Trypan que avalia danos na membrana celular. O azul de Trypan é um corante Diazo amplamente utilizado para o tingimento seletivo de tecidos ou células mortas. Sua ação baseia-se no fato de ser uma molécula de carga negativa que, portanto, não interage com células a não ser que suas membranas estejam danificadas. Células íntegras são muito seletivas em respeito aos compostos que atravessam suas membranas, portanto refratam a penetração do azul de Trypan. Células que rejeitam o tingimento com azul de Trypan são consideradas viáveis, portanto, células tingidas com uma distinta coloração azul prontamente observável ao

microscópio são células com membranas danificadas. Desta forma, o azul de Trypan é um corante vital que permite a discriminação entre células viáveis e células com membranas danificadas, usualmente são consideradas mortas (TRAN *et al.*, 2011).

Através do ensaio de exclusão azul de Trypan foi observado que o extrato bruto apresentou atividade com 24 horas em células H9 na concentração de 86 µg/mL, tempo observado também em *Thalassophryne nattereri* porém em concentrações inferiores (0.3, 1.0 e 3.0 µg) (LIMA *et al.*, 2003).

O mesmo ensaio em regiões do perfil cromatográfico somente uma região hidrofílica, classificada de região 1 demonstrou uma tendência a danos celulares, sendo o tempo de maior atividade ocorreu em 72 horas. Portanto, esta região foi novamente testada em três concentrações diferentes e observado uma resposta dose dependente nos tempos e concentrações analisados.

A região 5 também foi novamente testada em outras seis concentrações por esta apresentar atividade hemolítica e observado que as concentrações apresentaram maior atividade em 24 horas de ensaio e com o transcorrer do tempo estas apresentaram uma diminuição de atividade citotóxica. Com este resultado podemos sugerir, que pelo fato do tempo de 24 horas não ter inibido 100% das células testadas, as que não sofreram danos neste tempo iniciaram a divisão celular, uma vez que o ambiente de ensaio favorece o ciclo celular, com temperatura e umidade controlados.

Apesar da região 1 ter apresentado maior inibição celular a região 5 também apresentou atividade hemolítica, logo, foi realizado a recromatografia em uma coluna analítica C18, uma vez, que não foi obtido resultado satisfatório em coluna de troca iônica e gel filtração. Com o material obtido foi realizado um novo teste de exclusão de azul de Trypan em três concentrações, na qual foi observado uma resposta dose dependente nas concentrações testadas, sendo que somente no tempo de 24 horas não foi

observado uma diferença significativa entre as concentrações testadas e o tempo de 48 horas o que apresentou maior inibição celular.

Poucos trabalhos relacionados com a citotoxicidade das peçonhas de peixes são relatados, a peçonha de *Thalassophryne nattereri* já foi relatada efeitos da viabilidade celular de células monucleadas em cultura pelo ensaio de LDH, o tempo que o obteve a maior degradação celular foi em 24 horas, tempo em que todas as doses testadas (0.3, 1.0 e 3.0 µg) apresentaram o maior efeito, em 48 e 72 horas somente 1.0 e 3.0 µg doses apresentaram efeito citotóxico. Na mesma espécie citada, foi relatada a necrose induzida na pata de camundongo com a maior dose utilizada de 3.0 µg/pata e a menor dose de 0,3 µg/pata foi capaz de instaurar um edema nos tempos iniciais porém a atividade reduziu 9 horas após iniciar o ensaio. Trabalhos anteriores relataram atividade citotóxica em mioblastos, células endoteliais e plaquetas (LIMA *et al.*, 2003). Nosso trabalho mostrou que o ensaio utilizado e as células analisadas, apresentaram somente maior inibição em 24 horas na região 5 e com o extrato bruto. A região 1 e a recromatografia apresentaram maior inibição em 48 horas nas concentrações utilizadas.

Em um estudo realizado com o veneno de *Scatophagus argus*, a peçonha foi capaz de induzir o arredondamento e a lise celular em células HeLa, características comum a necrose foram apresentadas, como a distensão celular que ocorreu com 4 horas após a incubação com a peçonha (SIVAN *et al.*, 2007).

Por fim um trabalho realizado com o muco de *P. motoro* mostra que quando ocorre o acidente, tanto muco como a água que está em contato primário com o acidente são responsáveis por transferir bactérias multiresistentes com possuem o potencial de causar infecções as vítimas (DOMINGOS *et al.*, 2011).

Atualmente, os acidentes ocasionados por arraias não possuem um tratamento específico e altamente eficaz, podendo a elucidação e caracterização de componentes

citotóxicos existentes no extrato do ferrão auxiliar a formulação de possíveis fármacos para o tratamento das vítimas.

## 7. CONCLUSÃO

- O extrato bruto do ferrão de *Potamotrygon fakneri* apresentou atividade hemolítica em eritrócitos humanos, atividade de fosfolipase tanto na presença quanto na ausência de CaCl<sub>2</sub>, atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> e ocasionou a inviabilidade celular em células H9.

- A região 1 ocasionou danos em membrana com atividade dose dependente.

- Uma das frações apresentada pelo extrato, a região 5 apresentou maior atividade hemolítica, foi capaz de ocasionar dano na membrana celular, sendo esta fração composta por três componentes de alta massa (11.330,146 Da; 13.577,574 Da e 16.808,068 Da), podendo a elucidação desta fração auxiliar no tratamento dos acidentados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; GRANDJEAN, P.; TAKIZAWA, Y.; WEIHE, P. Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. **Environmental Research**. v. 77, n. 2, p. 98-103. 1998.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**. v. 1, n. 1, p. 37-58. 2007.

ANDRICH, F.; CARNIELLI, J.; CASSOLI, J.; LAUTNER, R.; SANTOS, R.; PIMENTA, A.; DE LIMA, M.; FIGUEIREDO, S. A potent vasoactive cytolysin isolated from *Scorpaena plumieri* scorpionfish venom. **Toxicon**. v. 56, n. 4, p. 487-496. 2010.

ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L. A.; LIRA, M. S.; JARED, S. G.; NETO, D. G.; JARED, C.; BARBARO, K. C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. **Toxicon**. v. 57, n. 2, p. 297-303. 2011.

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

AZUO SHIOMI, K.; KAZAMA, A.; SHIMAKURA, K.; NAGASHIMA, Y. Purification and properties of phospholipases A<sub>2</sub> from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. **Toxicon**. v. 36, n. 4, p. 589-599. 1998.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v. 39, n. 1, p. 175-189. 1999.

BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; MALTA, M. B.; SOARES, S. L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J. L.; SANTORO, M. L.; HADDAD JUNIOR, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**. v. 50, n. 5, p. 676-687. 2007.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. v. 8, n. 2, p. 93-99. 1987.

BOTTARD, A. Les poissons venimeux. 1889.

BROOKS, D. R. Origins, diversification, and historical structure of the helminth fauna inhabiting neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae). **The Journal of parasitology**. p. 588-595. 1992.

BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous vertebrates. **Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous vertebrates**. v. 2. 1971.

CARAS, R. The Venomous Fish. In: PRENTICE-HALL, I. (Ed.). **Venomous animals of the world.** . USA, 1974. p.103-116.

CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; DE LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**. v. 45, n. 7, p. 843-850. 2005.

CARVALHO, M. D.; LOVEJOY, N.; ROSA, R. Family Potamotrygonidae (river stingrays). **Check listo f the freshwater fishes of South and Central America (RE Reis, SO Kullander & CJ Ferraris Jr., eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre.** p. 22-28. 2003.

CASTEX, M.; LOZA, F. ETIOLOGY OF PARATRYGONIC DISEASE. ANATOMICAL, HISTOLOGICAL AND FUNCTIONAL STUDY OF THE AGGRESSIVE ORGAN OF THE FRESH WATER AMERICAN RAY (GEN." POTAMOTRYGON"). **Revista de la Asociación Médica Argentina.** v. 78, p. 314. 1964.

CHIPPAUX, J.-P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**. v. 29, n. 11, p. 1279-1303. 1991.

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

CHURCH, J. E.; MOLDRICH, R. X.; BEART, P. M.; HODGSON, W. C. Modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels by Scorpaenidae venoms. **Toxicon**. v. 41, n. 6, p. 679-689. 2003.

COMPAGNO, L. **Checklist of living elasmobranchs: Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes.**, The John Hopkins University Press. 1999.

COMPAGNO, L.; COOK, S. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. **Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences[J. AQUARICULT. AQUAT. SCI.]. 1995.** 1995.

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 the Brazilian Stingray *Potamotrygon gr. orbigny*. **Peptides**. v. 27, n. 12, p. 3039-3046. 2006.

CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S. *Potamotrygon cf. henlei* stingray mucus: Biochemical features of a novel antimicrobial protein. **Toxicon**. v. 60, n. 5, p. 821-829. 2012.

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. orbigny* freshwater stingray venom. **Peptides**. v. 30, n. 12, p. 2191-2199. 2009.

CROSS, T. An unusual stingray injury--the skindiver at risk. **The Medical journal of Australia**. v. 2, n. 25-26, p. 947-948. 1975.

DEHGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. **Toxicon**. v. 55, n. 6, p. 1188-1194. 2010.

DEHGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; RAJAIAN, H.; SAJEDIANFARD, J.; PARTO, P. Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom. **Toxicon**. v. 54, n. 6, p. 881-886. 2009.

DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**. v. 58, n. 2, p. 147-153. 2011.

FENNER, P. J.; WILLIAMSON, J. A.; SKINNER, R. A. Fatal and non-fatal stingray envenomation. **The Medical journal of Australia**. v. 151, n. 11-12, p. 621-625. 1988.

FIELD-CORTAZARES, J.; CALDERÓN-CAMPOS, R.; RÁBAGO-LÓPEZ, G. Intoxicación por Ciguatera. 2008.

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. R.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**. v. 439, n. 7076, p. 584-588. 2006.

FULY, A. L.; DE MIRANDA, A. L. P.; ZINGALI, R. B.; GUIMARÃES, J. A. Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochemical pharmacology**. v. 63, n. 9, p. 1589-1597. 2002.

GARLAND, W. J.; BUCKLEY, J. T. The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. **Infection and immunity**. v. 56, n. 5, p. 1249-1253. 1988.

GARNIER, P.; GOUDEY-PERRIERE, F.; BRETON, P.; DEWULF, C.; PETEK, F.; PERRIERE, C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. **Toxicon**. v. 33, n. 2, p. 143-155. 1995.

GARRONE NETO, D.; CORDEIRO, R. C.; HADDAD JR, V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, Tocantins, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 21, n. 3, p. 795-803. 2005.

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**. v. 43, n. 1, p. 82-88. 2010.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR, V.; CARDOSO, J.; FRANÇA, F.; WEN, F.; MÁLAQUE, C. Acidentes por raias. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2ª edição, São Paulo: Editora Sarvier.** p. 295-305. 2009.

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.** v. 7, n. 1, p. 205-208. 2007.

GOMES, H. L.; ANDRICH, F.; FORTES-DIAS, C. L.; PERALES, J.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; VASSALLO, D. V.; CRUZ, J. S.; FIGUEIREDO, S. G. Molecular and biochemical characterization of a cytolysin from the *Scorpaena plumieri* (scorpionfish) venom: Evidence of pore formation on erythrocyte cell membrane. **Toxicon.** v. 74, p. 92-100. 2013.

GUSMANI, L.; AVIAN, M.; GALIL, B.; PATRIARCA, P.; ROTTINI, G. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. **Toxicon.** v. 35, n. 5, p. 637-648. 1997.

GUTIÉRREZ, J.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Experimental and molecular pathology.** v. 40, n. 3, p. 367-379. 1984.

GWEE, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; YUEN, R.; KHOO, H.; LOW, K. A review of stonefish venoms and toxins. **Pharmacology & therapeutics.** v. 64, n. 3, p. 509-528. 1994.

HADDAD JR, V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 36, n. 5, p. 591-597. 2003.

HADDAD JR, V. **Animais aquáticos potencialmente perigosos no Brasil: guia médico e biológico.** Editora Roca, 2008. ISBN 8572416722.

HADDAD JR, V.; CARDOSO, J. L. C.; NETO, D. G. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases.** v. 19, p. 16-16. 2013.

HADDAD JR, V.; NETO, D. G.; 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.** v. 43, n. 3, p. 287-294. 2004.

HADDAD JR, V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L. C.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 45, n. 4, p. 221-223. 2003.

- HADDAD JR, V.; TAKEHARA, E. T.; RODRIGUES, D. S.; LASTÓRIA, J. C. Envenenamento por baiacus (peixes-bola): revisão sobre o tema. **Diagn. tratamento.** v. 9, n. 4. 2004.
- HALSTEAD, B. Venomous marine animals of Brazil. **Memórias do Instituto Butantan.** v. 33, p. 1-26. 1966.
- HALSTEAD, B. W. **Poisonous and Venomous Marine Animals of the World: Invertebrates.** US Government Printing Office, 1965.
- HALSTEAD, B. W.; BUNKER, N. C. Stingray attacks and their treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene.** v. 2, n. 1, p. 115-128. 1953.
- HARVEY, A.; SHIER, W.; MEBS, D. Handbook of Toxicology. **Handbook of Toxicology.** 1990.
- KINI, R. Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism.** p. 1-28. 1997.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A 2. **Toxicon.** v. 27, n. 6, p. 613-635. 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.
- LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F. D.; MORONI, F. T.; ARAÚJO, J. D. R.; CARANHAS, S. M. E.; MARQUES, C. M. A.; DOS-SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes–Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. **Toxicon.** v. 77, p. 105-113. 2014.
- LAMEIRAS, J. L. V.; DA COSTA, O. T. F.; DOS SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (Chondrichthyes–Potamotrygonidae): BIOLOGIA, VENENO E ACIDENTES. 2014.
- LESSA, R.; VOOREN, C.; ARAÚJO, M.; KOTAS, J.; ALMEIDA, P.; RINCÓN, G.; SANTANA, F.; GADIG, O.; SAMPAIO, C. Brazilian national plan for conservation and management of elasmobranch fishes stocks. **Recife: SBEEL.** 2005.
- LIMA, C.; BIANCA CLISSA, P. C.; AMÉLIA PIRAN-SOARES, A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon.** v. 42, n. 5, p. 499-507. 2003.
- LIMA, L. A. F. D.; FERREIRA, M. L. Estudo clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim); Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. bras. dermatol.** v. 75, n. 4, p. 435-443. 2000.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**. v. 42, n. 8, p. 885-901. 2003.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. A.; FARSKY, S. H. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**. v. 40, n. 8, p. 1141-1147. 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; NÚÑEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **International journal of experimental pathology**. v. 82, n. 1, p. 55-64. 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol chem**. v. 193, n. 1, p. 265-275. 1951.

MAGALHAES, 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. orbigny*. **Toxicon**. v. 47, n. 5, p. 575-583. 2006.

MAGALHÃES, M. R. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. **Toxicon**. v. 51, n. 6, p. 1060-1067. 2008.

MARINETTI, G. The action of phospholipase A on lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**. v. 98, n. 3, p. 554-565. 1965.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ictismo. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. SAÚDE/ASCOM/PRE/FUNASA, A. D. C. E. E. E. Brasília. 81-85 p. 2001.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. **International immunopharmacology**. v. 11, n. 9, p. 1368-1377. 2011.

MOREIRA, V. **Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A<sub>2</sub>, isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus durissus terrificus*, e dos respectivos venenos, sobre a expressão de ciclooxigenases e produção de prostaglandinas**. Universidade de São Paulo

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of Biochemistry**. v. 131, n. 3, p. 285-292. 2002.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008. ISBN 071677108X.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 047175644X.

NETO, S.; DE LIMA, P.; AQUINO, E. C. M. D.; SILVA, J. A. D.; AMORIM, M. L. P.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. E. D.; HADDAD JR, V. Envenenamento fatal por baiacu (Tetrodontidae): relato de um caso em criança. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 92-94. 2010.

NUNES, J.; ALMEIDA, Z.; PIORSKI, N. Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza**. v. 38, p. 49-54. 2005.

OCAMPO, R. R.; HALSTEAD, B. W.; MODGLIN, F. R. The microscopic anatomy of the caudal appendage of the spotted eagleray, *Aetobatus narinari* (Euphrasen), with special reference to the venom apparatus. **The Anatomical Record**. v. 115, n. 1, p. 87-99. 1953.

OLIVEIRA JR, N. G. Análises transcritômicas comparativas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*. 2014.

PORTA, A. **Ricerche anatomiche sull'apparecchio velenifero di alcuni pesci**. Fischer, 1905.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L.; SUSINI, S. M.; DE FREITAS, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. v. 35, n. 2, p. 305-309. 1997.

RODRIGUES, R. J. Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*). **Transactions of the New York Academy of Sciences**. v. 34, n. 8 Series II, p. 677-686. 1972.

RODRÍGUEZ, H. G. R.; SÁNCHEZ, E. C.; MÉNDEZ, J. D. Stingray poisoning, a careless aspect in México. **Adv Environ Biol**. v. 2, n. 2, p. 54-62. 2008.

RUSSEL, F.; FAIRCHILD, M. D.; MICHAELSON, J. Some properties of the venom of the stingray. **Medical arts and sciences**. v. 12, n. 2, p. 78-86. 1957.

RUSSELL, F. E.; VAN HARREVELD, A. Cardiovascular effects of the venom of the round stingray, *Urobatis halleri*. **Archives internationales de physiologie et de biochimie**. v. 62, n. 3, p. 322. 1954.

SADHASIVAM, G.; MUTHUVEL, A.; PACHAIYAPPAN, A.; THANGAVEL, B. Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. **International journal of biological macromolecules**. v. 54, p. 84-89. 2013.

SCHARF, M. J. Cutaneous injuries and envenomations from fish, sharks and rays. **Dermatologic Therapy**. v. 15, n. 1, p. 47-57. 2002.

SILVA, G. C. D.; SABINO, J.; ALHO, C. J. R.; NUNES, V. L. B.; HADDAD JUNIOR, V. Injuries and envenoming by aquatic animals in fishermen of Coxim and Corumbá municipalities, State of Mato Grosso do Sul, Brazil: identification of the

causative agents, clinical aspects and first aid measures. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 5, p. 486-490. 2010.

SIVAN, G.; VENKETESVARAN, K.; RADHAKRISHNAN, C. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. **Toxicon**. v. 50, n. 4, p. 563-571. 2007.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**. v. 1488, n. 1, p. 1-19. 2000.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A 2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The international journal of biochemistry & cell biology**. v. 33, n. 9, p. 877-888. 2001.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, G. S.; MOURA, A. A.; CALDEIRA, C. A.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A. Purification of phospholipases A2 from American snake venoms. **Chromatography—the Most Versatile Method of Chemical Analysis**. p. 1-34. 2012.

THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Periodic shedding and replacement of venomous caudal spines, with special reference to South American freshwater stingrays, *Potamotrygon spp.* **Environmental biology of fishes**. v. 23, n. 4, p. 299-314. 1988.

TRAN, S.-L.; PUHAR, A.; NGO-CAMUS, M.; RAMARAO, N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PloS one**. v. 6, n. 9, p. e22876. 2011.

VENNILA, R.; KUMAR, K. R.; KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAM, T. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingrays. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 1, n. 2, p. S239-S243. 2011.

WATANABE, L.; SOARES, A. M.; WARD, R. J.; FONTES, M. R.; ARNI, R. K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**. v. 87, n. 2, p. 161-167. 2005.

WEISS, B. F.; WOLFENDEN, H. D. Survivor of a stingray injury to the heart. **Medical journal of Australia**. v. 175, n. 1, p. 33-34. 2001.

YANG, Y. R.; JANG, H.-J.; RYU, S. H.; SUH, P.-G. Phospholipases in Health and Disease. In: (Ed.). **Phospholipases in Health and Disease**: Springer, 2014. p.3-38. ISBN 1493904639.