

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA**



RELATÓRIO FINAL:

“Perfis dos constituintes proteicos e enzimáticos dos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae)”.

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

Manaus

2013



RELATÓRIO FINAL:

“Perfis dos constituintes proteicos e enzimáticos dos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae)”.

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Relatório final apresentado ao Comitê Científico, do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) vinculado ao Departamento de Apoio à Pesquisa, da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus

2013

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO.....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
MATERIAIS E MÉTODOS	12
Levantamento bibliográfico	12
Obtenção e preparo dos extratos (veneno)	12
Perfis proteicos dos extratos do ferrão e do dorso	12
Atividade da fosfolipase A ₂	13
Atividades caseinolítica e gelatinolítica	14
RESULTADOS.....	15
Levantamento bibliográfico	15
Perfis proteicos dos extratos do ferrão e do dorso	15
Atividade da Fosfolipase A ₂	15
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

RESUMO

Introdução: *Plesiotrygon iwamae* é uma espécie de arraia de água doce, da bacia Amazônica, pertencente à família Potamotrygonidae, popularmente conhecida como “arraia chicote”, devido a sua longa cauda com ferrões em posição mediana. No levantamento bibliográfico sobre a composição e ação, do veneno dessa espécie, não foram encontradas referências. **Objetivo:** O presente estudo tem por objetivo a caracterização de constituintes proteicos e enzimáticos de raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* bem como a verificação da presença de atividades fosfolipásica, caseinolítica e gelatinolítica. **Métodos:** os constituintes dos raspados do dorso e do ferrão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), ao passo que as demais atividades foram analisadas a partir de géis contendo os substratos proteicos específicos de cada enzima (zimografia). **Resultados:** a maioria das proteínas dos raspados do dorso e do ferrão possuem massas moleculares entre 20,82 e 22,85 kDa. Os raspados do ferrão apresentaram 36,4% de atividade fosfolipásica enquanto os raspados do dorso apresentaram 9,1%. Houve presença de atividade caseinolítica tanto em raspados do dorso quanto do ferrão, com presença de uma banda de massa intermediária exclusiva do ferrão. A atividade gelatinolítica mostrou-se presente nos dois extratos, porém, mais intensa nos extratos do dorso. **Conclusão:** a maioria das proteínas constituintes dos extratos do dorso e ferrão possui baixa massa molecular e não houve diferença nos perfis dessas proteínas. A atividade fosfolipásica mostrou-se mais intensa nos extratos do ferrão ao passo que a atividade gelatinolítica mostrou-se mais intensa nos extratos do dorso.

Palavras-chaves: *Plesiotrygon iwamae*; arraia, água doce, Amazônica, Potamotrygonidae.

INTRODUÇÃO

Elasmobrânquios é uma subclasse de peixes cartilaginosos, com mais de mil espécies descritas que habitam ambientes marinhos (95%) e dulciaquícolas (5%), na qual estão incluídos os tubarões e as arraias. As arraias da família Potamotrygonidae, encontradas na América do Sul, vivem exclusivamente em água doce e são consideradas os elasmobrânquios mais adaptados para viver nesse ambiente (THORSON et al., 1983; LOVEJOY, 1996).

As arraias possuem um ou mais ferrões denteados, retroserrados bilateralmente, recobertos por uma bainha intertegumentar e sulcos presentes em suas bordas, que abrigam glândulas produtoras de veneno. O ferrão normalmente é revestido por uma camada de muco e veneno (MCGOLDRICK; MARX, 1991; MAGALHÃES et al., 2006).

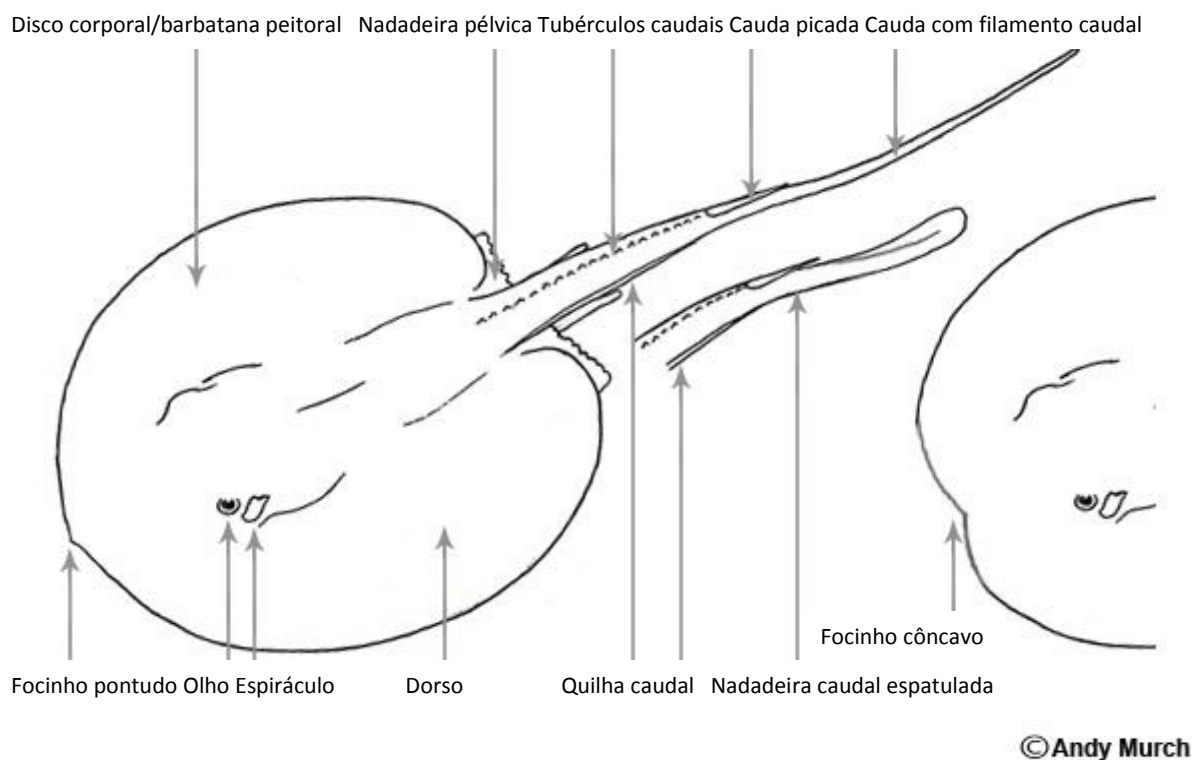


Figura 1: imagem esquemática modificada, com identificação morfológica das arraias de água doce (família Potamotrygonidae).

FONTE: Disponível em: <http://www.elasmodiver.com/River_Stingrays_Potamotrygonidae.htm> Acesso em: 26/01/2013).

Apesar de não serem agressivas, as arraias causam acidentes em seres humanos com frequência suficiente para serem considerados um problema de saúde pública nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil (NETO; HADDAD, 2009).

As arraias normalmente encontram-se debaixo de uma camada de areia em águas rasas (HALSTEAD, 1970), e o acidente ocorre quando há perturbação das barbatanas peitorais (popularmente conhecidas como asas - Figura 1) das arraias, após um banhista pisar no dorso do animal (MAGALHÃES et al., 2006). De maneira reflexa, as arraias direcionam seus ferrões para a região estimulada, causando uma ferida lacerada ou puntiforme, dependendo do mecanismo do trauma. No momento da penetração do ferrão na pele da vítima, as bainhas intertegumentares se rompem e o veneno é liberado para a ferida, causando dor intensa, edema e sangramento devido ao trauma ocasionado pela introdução do ferrão (FENNER et al., 1989; MAGALHÃES et al., 2006). Em feridas mais graves, a pele pode adquirir aparência enegrecida, cianótica ou eritematosa, com tendência ao desenvolvimento de hemorragia (FENNER et al., 1989). Além desse dano direto causado pelo acidente, o envenenamento com arraias pode induzir, em suas vítimas, uma ferida necrótica com tendência à infecção secundária, principalmente em regiões quentes e úmidas como as da América do Sul (BRISSET et al., 2005).

Os envenenamentos por arraias também podem ocasionar sintomas sistêmicos, tais como: náuseas, anasarca, diaforese, convulsões, paralisia límbica, hipotensão, síncope, taquicardia, bradicardia, vômitos, desconforto respiratório, cólicas, tremores, dores axilares ou inguinais, fasciculações, cefaleia, diarreia, fraqueza e nervosismo (FENNER et al., 1989; MCGOLDRICK; MARX, 1991; COOK; MATTEUCCI, 2006; MAGALHÃES et al., 2006).

Apesar da dor, danos locais e demais manifestações sistêmicas, os acidentes com arraias raramente são letais para seres humanos (MAGALHÃES et al., 2006).

No Amazonas para a família Potamotrygonidae foram descritos quatro gêneros: *Paratrygon* sp., *Potamotrygon* sp., *Plesiotrygon* sp. e *Heliotrygon* sp. (VALENTIM *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007, CARVALHO; LOVEJOY, 2011; CARVALHO; RAGNO, 2011). Para o gênero *Plesiotrygon* sp. já foram relatadas as espécies: *Plesiotrygon iwamae* (Figura 2) e, mais recentemente a *P. nana* (CARVALHO; RAGNO, 2011).

O presente trabalho teve por objetivos a caracterização os perfis dos constituintes proteicos e enzimáticos dos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*, pois não existem relatos científicos sobre acidentes causados por arraias desse gênero como também sobre os constituintes proteicos de seus venenos. Importante ressaltar que no levantamento realizado para o período de Janeiro de 1987 a Julho de 2013, nos seguintes bancos de dados: *Scopus*, *SciVerse*, *Medline* e *Pubmed*, não foram encontradas referências bibliográficas.



Figura 2: arraia *Plesiotrygon iwamae*

FONTE: imagem gentilmente cedida por Juliana LuizaVarjão Lameiras.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar os perfis dos constituintes proteicos e enzimáticos dos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*.

Objetivos específicos

- Obtenção das massas moleculares estimadas das proteínas presentes nos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*;
- Verificar a presença de Fosfolipase A₂ nos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*;
- Verificar a presença de enzimas com atividades sobre caseína e gelatina nos raspados do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Magalhães e colaboradores (2006) demonstraram que os venenos das arraias *Potamotrygon* cf. *scorbina* e *Potamotrygon* gr. *orbignyi*, encontradas nos rios Paraná e Tocantins (estado de Tocantins) induziram moderadas ações edematogênica e necrosante, intensa ação nociceptiva e fraca ação proteolítica. Porém, esses venenos não induziram a atividade hemorrágica. A ação edematogênica dos venenos foi dose-dependente, atingindo o efeito máximo com a dose de 25µg para ambos e persistência do edema por até dez horas após suas aplicações. Os venenos de *Potamotrygon* sp. induziram atividade edematogênica menos intensa e mais rápida do que os venenos de outros peixes, conhecidos por sua forte e persistente ação edematogênica. A atividade necrosante dos venenos de *Potamotrygon* cf. *scorbina* ou de *Potamotrygon* gr. *orbignyi* só foi induzida nas doses de 25, 50 e 100µg, sendo potencializada quando os mucos, dos dorsos das arraias, foram adicionados aos extratos dos venenos.

Esses autores demonstraram também a termolabilidade dos venenos, com redução da atividade edematogênica induzida por *Potamotrygon* cf. *scorbina* ou por *Potamotrygon* gr. *orbignyi* que foi de 15 e 9% à temperatura ambiente, de 44 e 42% à 37°C e de 63 e 61% à 56°C, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2006).

Nesse mesmo artigo, ainda, os autores demonstraram que os venenos induziram aumento no número de leucócitos em rolamento de 56% para *Potamotrygon* cf. *scorbina* e 75% para *Potamotrygon* gr. *orbignyi*, porém, não modificaram a velocidade de rolamento e a aderência desses leucócitos (MAGALHÃES et al., 2006). Os achados de microscopia intravital por transiluminação indicaram ação dos venenos das arraias *Potamotrygon* cf. *scorbina* e *Potamotrygon* gr. *orbignyi* sobre a microcirculação, em músculos de camundongos, pois após as injeções ocorreram liberações locais de mediadores vasoativos,

citocinas inflamatórias e quimioatraentes, além de induzirem um *up-regulation* nas expressões de moléculas de adesão (MAGALHÃES et al., 2006).

A análise dos constituintes proteicos dos venenos totais mostrou uma banda ampla com peso molecular de aproximadamente 15 kDa sob condições não redutoras, em gel de SDS-PAGE em ambos os venenos de *Potamotrygon cf. scorbina* e *Potamotrygon gr. orbignyi* porém, o veneno de *Potamotrygon gr. orbignyi* apresentou bandas exclusivas de 66,2kDa e de 25kDa (MAGALHÃES et al., 2006).

No sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) pela filtração cromatográfica em Superdex 12-HR com pH de 7.2 foram obtidos cinco picos nos venenos de *Potamotrygon cf. scorbina* e *Potamotrygon gr. orbignyi* (MAGALHÃES et al., 2006).

Magalhães e colaboradores (2008) demonstraram que a enzima hialuronidase, presente no veneno da arraia *Potamotrygon motoro*, migrava como banda única no SDS-PAGE, com massa molecular de aproximadamente 79 kDa, existindo como um monômero, com pH ótimo na faixa de 4.2 e temperatura ótima de 37°C em um pH de 4.2, havendo declínio significativo da atividade acima de 40°C. A enzima se manteve estável por aproximadamente 30 minutos quando incubada entre 20 e 30°C, porém perdeu 70% de sua atividade quando incubada a 40°C. Íons como Ni^+ , Fe^{++} e Cu^{++} em concentrações baixas como 10mM foram capazes de reduzir em 25% a atividade enzimática da hialuronidase. β -mercaptoetanol teve uma pequena influência na atividade enzimática ao passo que heparina reduziu a atividade da enzima em 20%. Os autores observaram alta afinidade da enzima pelo ácido hialurônico ($K_m = 4.91 \mu\text{g/ml}$), valor muito baixo em comparação com a enzima de outras espécies como *Palamneus gravimanus* (47.61 mg/ml) (MOREY et al., 2006), *Tityus serrulatus* (69.7 mg/ml) (PESSINI et al., 2001), *Streptococcus agalactiae* (81.9 mg/ml) (OZEGOWSKI et al., 1994) e *Synanceja horrida* (709 mg/ml) (POH et al., 1992).

Conceição e colaboradores (2012) isolaram uma proteína antimicrobiana, chamada PcfHb, do muco da arraia *Potamotrygon cf. henlei*. A proteína PcfHb, com estrutura semelhante às cadeias β da hemoglobina, apresentou grande ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos. Doses mínimas inibitórias de 4 μ M de PcfHb (diluídas com água Milli-Q estéril até o volume de 100 μ L) foram capazes de inibir o crescimento de *Micrococcus luteus* e *Candida tropicalis*, ao passo que uma pequena atividade antimicrobiana foi observada com doses de 12 μ M de PcfHb contra *Escherichia coli*. Além da atividade antimicrobiana, a proteína PcfHb apresentou uma fraca atividade pró-inflamatória: a aplicação tópica de 4 μ M de PcfHb em camundongos machos suíços evidenciaram maior recrutamento de células inflamatórias, definido como aumento do rolamento de leucócitos, com pico de ação de cinco minutos que diminuiu progressivamente até desaparecimento do efeito em 30 minutos, sem evidência de alterações no número de células de adesão. A proteína PcfHb não apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, mesmo em altas doses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Levantamento bibliográfico – para o levantamento bibliográfico, foram utilizadas as palavras chaves: *stingray*; *venom*; *freshwater*; *Plesiotrigon*; *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon*, nos bancos de dados como *SciVerse*, *Scopus*, *Medline* e *Pubmed*, no período de Janeiro de 1987 a Janeiro de 2013.

Obtenção e preparo dos extratos (veneno) – Espécimes de *Plesiotrygon iwamae* foram coletados no Lago do Janauacá, situado próximo a Manaus (aproximadamente 60 km a sudoeste da cidade), na margem direita do Rio Solimões. O ferrão e o dorso dos animais foram raspados, com auxílio de bisturi, juntamente com o muco. O material coletado foi armazenado em nitrogênio líquido durante o transporte até Manaus, para o Laboratório de Imunologia, localizado na Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. As amostras foram misturadas ao tampão fosfato-salina pH 7.4 (PBS) e centrifugadas a 6.000 rpm, durante 15 minutos, temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore 0,22 µm, e, em seguida, estocado em freezer - 20°C até o uso.

Perfis proteicos dos extratos do ferrão e do dorso – Os perfis proteicos dos raspados dos dorsos e dos ferrões de espécimes de *Plesiotrygon iwamae* foram obtidos pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme protocolo usado em LAEMMLI (1970). Foram aplicados 30 µl de cada amostra no gel de poliacrilamida na concentração de 15%, sob condições redutoras e não-redutoras. Antes da eletroforese, as amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com os respectivos tampões de amostra. As proteínas: Miosina (200kD), β-galactosidase (116,3kD), Albumina (66,2kD), Ovalbumina (45kD), Anidrase carbônica (31kD), Inibidor soja tripsina (21,5kD), Lisozima (14,4kD) e Aprotinina (6,5kD) (BioRad Prestained Marker,

Standards Broad Range, USA) foram usadas como marcadores de peso molecular. Os géis foram corados com Comassie brilhante Blue (Bio-Rad).

Atividade da fosfolipase A₂ – a metodologia usada para avaliar a atividade da enzima fosfolipase A₂, presente nos venenos, foi adaptada de Borges e colaboradores (2000) e Gutiérrez e Lomonte (1997). Para isso, foram coletados de voluntários cinco mililitros de sangue humano na presença de EDTA, que foi em seguida centrifugado por cinco minutos a 4000 rpm. O sobrenadante (plasma) foi retirado e o *pellet* foi lavado com PBS. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido por três vezes e o *pellet* (eritrócitos) foi estocado em geladeira. Para a montagem do gel, foram utilizados: CaCl₂ 0,01M; gema de ovo diluída na proporção de 1:3 em solução salina; solução salina (NaCl 0,9%) em pH 7.2; agarose 1%; e azida sódica 0,005%. Foram dissolvidos 2,25g de agarose em 225 ml de solução salina 0,9% até a obtenção de uma solução transparente, porém sem chegar à fervura. A solução foi resfriada entre 70-75°C e foram adicionados 2,25 mL de CaCl₂, agitando-se lentamente a solução. A solução foi novamente resfriada entre 55-60°C e foram adicionados 45 µL de azida sódica 0,005%, juntamente com 2,7 mL de solução de gema de ovo, agitando-se lentamente a solução. Entre 45-50°C, adicionou-se 2,7 mL de eritrócitos e a solução foi agitada lentamente. Após a homogenização, à cada placa de Petri foram adicionados 27 mL dessa solução com cuidado para não formar bolhas. Esperou-se que a solução adquirisse consistência de gel e, então, foram feitos os cinco furos de três milímetros sobre o gel para aplicação das amostras, sendo que no furo central foram aplicados 15 µL de solução salina 0,9% (controle negativo) nas três primeiras placas e 30 µL de solução salina 0,9% nas placas de números quatro a nove. Nas duas primeiras placas (controles positivos), aplicou-se 15 µL de veneno de *Bothrops atrox* em cada poço, nas concentrações de 2,5 µg, 5 µg, 10 µg e 15µg. Na placa de número três (controle positivo), foram aplicados 15 µL de veneno de *Bothrops atrox* nas concentrações de 0,62 µg e 1,25 µg em dois poços cada. Os raspados de muco do

dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*, foram lavados com solução salina 0.9%, na proporção de 1:1, e centrifugados a 14.000 rpm por dez minutos, sendo o sobrenadante (veneno) retirado e aplicado nas placas. Nas placas de números quatro a nove foram aplicados 30 µL de veneno do dorso da arraia *Plesiotrygon iwamae* em dois poços, e 15 µL de veneno do dorso da arraia *Plesiotrygon iwamae* nos dois poços restantes, sendo que na placa de número seis, foi aplicado o veneno do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. As placas foram então armazenadas em uma caixa com algodão umedecido, que em seguida foi estocada em estufa à 37°C por 24 horas. Após 24 horas, o diâmetro dos furos foi medido e as placas foram novamente estocadas em estufa à 37°C por mais 24 horas. Após esse período, o diâmetro dos furos foi novamente medido. A formação de halo foi considerada como atividade positiva para fosfolipase A₂, sendo que formação de halo maior que dez milímetros foi considerada atividade fosfolipásica significativa.

Atividades caseinolítica e gelatinolítica – caseína ou gelatina foram usados como substrato de acordo com o método adaptado de Heussen e Dowdle (1980). Dois miligramas por mililitros de caseína, ou 2 mg/ml de gelatina (tipo B da pele bovina) foram incorporados como substrato em gel de corrida a 15% com gel de pente a 5% sem substrato. Amostras do veneno de *Plesiotrygon iwamae* (10 µg) foram diluídas em tampão redutor ou não redutor e submetidas a corridas (15 mA/gel, a 4°C). Após eletroforese, para a restauração das cargas elétricas das proteínas, o SDS foi removido por dupla lavagem de 20 min cada com Triton X-100 a 2,5%. Após lavagens, os géis foram incubados em 20 mM Tris, 0.4 mM de cloreto de cálcio em pH 7.4, a 37°C, por 16 horas e corados com Comassie blue a 0.125%. As áreas claras no gel indicaram atividade enzimática correspondente ao substrato. Massas moleculares conhecidas (BioRad, Hercules, CA, USA) foram usadas como marcadores.

RESULTADOS

Levantamento bibliográfico: para o período de Janeiro de 1987 a Julho de 2013 não foram encontradas referências quanto à composição proteica de raspados do dorso ou ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. A revisão bibliográfica foi baseada em características gerais da família *Potamotrygonidae* e características mais específicas do gênero *Potamotrygon* sp. para fins de comparação dos resultados e de argumentos para a discussão.

Perfis proteicos dos extratos do ferrão e do dorso: a análise do SDS-PAGE demonstrou que a maioria das bandas de proteínas estava dentro da curva do gráfico elaborado com os valores dos padrões das massas moleculares. As bandas com maior concentração de proteínas apresentavam massas moleculares de aproximadamente 22,85 e 20,82 kDa, sugerindo predomínio de proteínas de pequena massa molecular. Não houve diferença entre os constituintes proteicos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*, porém, houve diferença entre constituintes do dorso de diferentes indivíduos: sugerindo variação intrapopulacional: bandas de massa molecular de 190, 78 kDa foram observadas tanto em condições redutoras quanto não redutoras no dorso do animal quatro, porém, não foram observadas no dorso do animal um (Figura 3).

Atividade da Fosfolipase A2: o grupo controle positivo (placas de número um a três com veneno de *B. atrox*) apresentou atividade fosfolipásica significativa, com formação de halo em todas as concentrações de veneno nas duas primeiras placas, com diâmetro médio de: 16,75 mm na concentração de 2,5 µg; 17,5 mm na concentração de 5 µg; 19 mm na concentração de 10 µg; e 21,5 mm na concentração de 15 µg. Na placa de número três, apesar de terem sido utilizadas concentrações mínimas do veneno de *B. atrox*, houve formação de halo com diâmetro médio de 12,75 mm na concentração de 0,62 µg, e 14 mm na concentração de 1,25 µg, evidenciando atividade fosfolipásica significativa (halo > 10 mm).

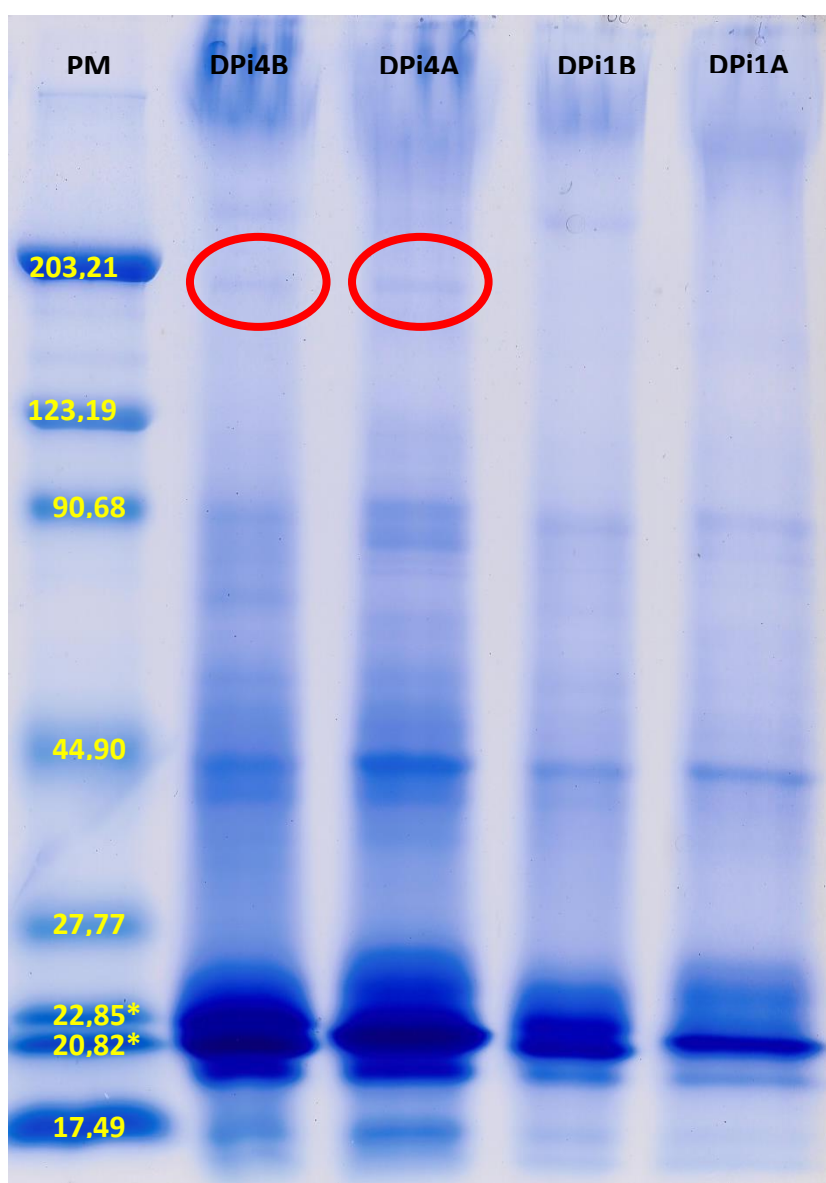


Figura 3: SDS-PAGE dos venenos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. * bandas com maior concentração de proteínas. Os círculos vermelhos representam as bandas de 190,78 kDa que variaram entre os animais quatro e um. (PM: padrão molecular; DPi: dorso *Plesiotrygon iwamae*; FPi: ferrão *Plesiotrygon iwamae*; A: sem redução; B= com redução).

O maior diâmetro de halo obtido foi de 22 mm na concentração de 15 µg de veneno de *Bothrops atrox* e o menor diâmetro foi de 12,75 mm na concentração de 0,62 µg de veneno de *B. atrox*. Os diâmetros dos halos e suas respectivas concentrações encontram-se descritos na tabela 1. O grupo de *Plesiotrygon iwamae* (placas de números quatro a nove) apresentou

formação de halo em duas placas: com 9,1% de atividade fosfolipásica no extrato do dorso (placa cinco em um poço com 30 μ L - Figura 4); e de 36,4% de atividade fosfolipásica no extrato do ferrão (placa seis nos dois poços de 30 μ L - Figura 5), em relação à atividade máxima do grupo controle positivo (halo de 22 mm = 100% de atividade). Nos poços onde foi aplicada a solução salina não houve a formação de halos (controle negativo).

Tabela 1 – Atividade fosfolipásica: controle positivo com veneno da jararaca *Bothrops atrox*.

Concentração do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (μ g)	Diâmetro médio dos halos (mm)		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
0,62	-	-	12,75
1,25	-	-	14,25
2,5	18,0	15,5	-
5,0	18,5	16,5	-
10,0	19,0	19,0	-
15,0	22,0*	21,0	-

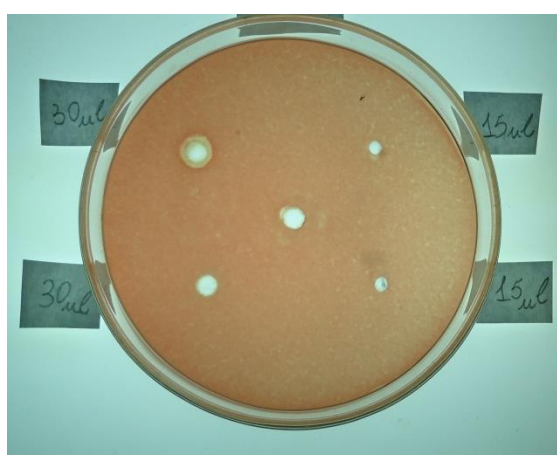


Figura 4: placa 5 - atividade fosfolipásica do veneno do dorso na arraia *Plesiotrygon iwamae*.

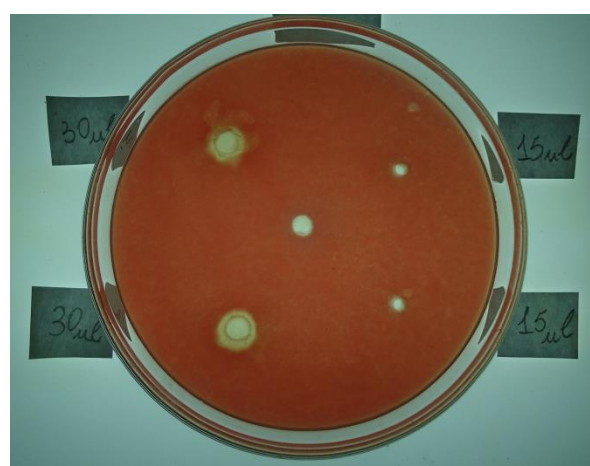


Figura 5: placa 6 - atividade fosfolipásica do veneno do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*.

Atividades caseinolítica e gelatinolítica: a atividade caseinolítica foi presente nos extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Figura 6). O veneno de *B. atrox* foi usado como controle positivo. Houve predominância de atividade caseinolítica em bandas de baixa e média massa molecular. Os extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* apresentaram diferenças quanto à composição de enzimas, tendo em vista a ausência de atividade caseinolítica em proteínas com massa molecular intermediária, no extrato do dorso do animal quatro e presença de atividade caseinolítica em proteínas com massa molecular semelhante as do veneno do ferrão. As massas moleculares não puderam ser determinadas por impossibilidade de comparação dos venenos com o padrão molecular utilizado.

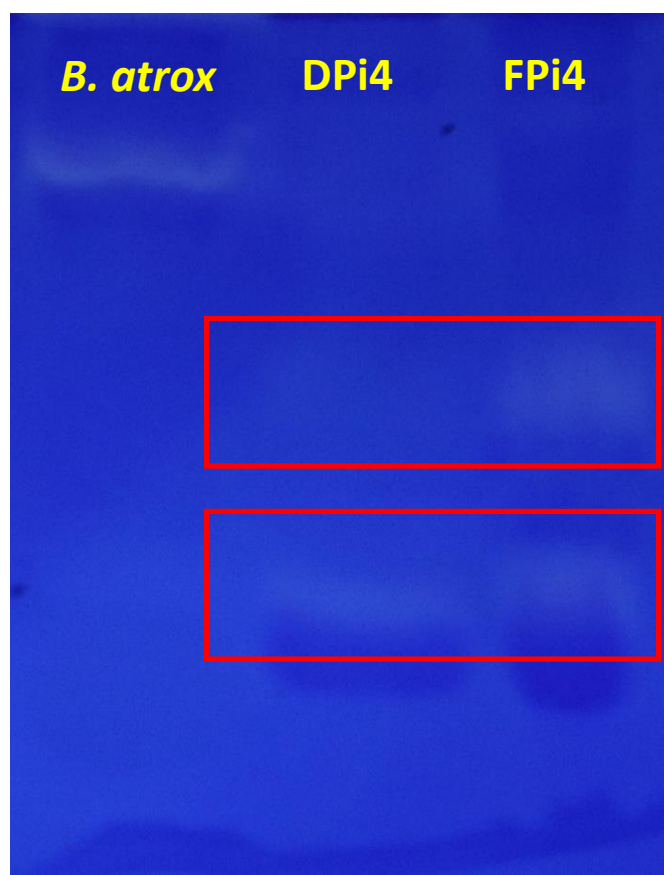


Figura 6: SDS-PAGE acrescido de 2mg de caseína contendo venenos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. (*B. atrox*: veneno da jararaca do Norte *Bothrops atrox*; DPi: dorso *Plesiotrygon iwamae*; FPI: ferrão *Plesiotrygon iwamae*).

A atividade gelatinolítica mostrou-se presente nos extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Figura 7). Houve predominância de atividade gelatinolítica em bandas com baixa e média massa molecular. Os extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* apresentaram perfis enzimáticos sobre a gelatina semelhantes, sendo a intensidade menor no veneno do ferrão e mais intensa no veneno do dorso do animal quatro.



Figura 7: SDS-PAGE acrescido de 2mg de gelatina contendo venenos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. (DPi: dorso *Plesiotrygon iwamae*; FPi: ferrão *Plesiotrygon iwamae*).

DISCUSSÃO

As arraias da família Potamotrygonidae são endêmicas em alguns rios do Brasil, como o rio Paraná e o rio Tocantins (MAGALHÃES et al., 2006), e apesar de não serem agressivas, são consideradas um problema de saúde pública nessas regiões por conta da frequência dos acidentes (NETO; HADDAD, 2009).

Diversas substâncias presentes nos venenos de arraias já foram isoladas: 5'-nucleotidase, serotonina e fosfodiesterases (FENNER et al., 1989), fosfolipase, fosfatase ácida, hialuronidase e enzimas com atividades caseinolítica, gelatinolítica e elastinolítica (MAGALHÃES, 2001), substâncias cardiotoxícas (FLEURY, 1950) e neurotóxicas (VELLARD, 1931), peptídeos bioativos, por exemplo: orpotrina (CONCEIÇÃO et al., 2006) e porflan (CONCEIÇÃO et al., 2009). Porém, ainda não há estudos mostrando os constituintes proteicos ou enzimáticos do veneno de *Plesiotrygon iwamae*.

O presente estudo demonstra a predominância de proteínas de baixa massa molecular nos extratos tanto do dorso quanto do ferrão de *Plesiotrygon iwamae*, com massas moleculares estimadas de 20,82 kDa e 22,85 kDa, dados semelhantes aos de Magalhães e colaboradores (2006), os quais também demonstraram predominância de proteínas de baixa massa molecular (15 kDa) sob condições não redutoras, em gel de SDS-PAGE em ambos os venenos de *Potamotrygon* cf. *scorbina* e *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. Além disso, foi observada semelhança entre os constituintes proteicos e enzimáticos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. Apesar da semelhança entre os constituintes proteicos do dorso e do ferrão de um mesmo indivíduo, foi encontrada variação intrapopulacional apenas nos constituintes proteicos dos extratos do dorso, sendo os extratos do ferrão semelhante entre os indivíduos. Não foram encontrados artigos que façam menção quanto à diferença entre os extratos do ferrão e dorso de arraias.

A fosfolipase A₂ é uma enzima fundamental na síntese de eicosanoides, substâncias que mediam o processo de inflamação. A fosfolipase A₂ atua sobre o ácido araquidônico, precursor dos eicosanoides, o qual dá origem às prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, substâncias altamente pró-inflamatórias (RANG et al., 2008). As fosfolipase A₂ presentes nos venenos de animais induzem atividade miotóxica. No presente estudo, a atividade fosfolipásica mostrou-se presente tanto em extratos do dorso quanto do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*, com maior intensidade nos extratos do ferrão (36,4%), sugerindo uma maior capacidade de geração de resposta inflamatória e dano muscular pelo envenenamento com o ferrão em comparação com o envenenamento pelo do dorso. Magalhães (2001) conseguiu isolar enzimas com atividade fosfolipásica da arraia *Potamotrygon motoro* e mostrou que a atividade fosfolipásica também se faz presente no veneno de outras espécies da família Potamotrygonidae.

Enzimas com atividades caseinolítica e gelatinolítica, anteriormente isoladas do veneno da arraia *Potamotrygon motoro* por Magalhães (2001), mostraram-se presentes nos extratos tanto do dorso quanto do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. Apesar da impossibilidade de determinação das massas moleculares, podemos inferir a predominância de atividades caseinolítica e gelatinolítica em proteínas de massas moleculares médias a baixas.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a maioria das proteínas, constituintes dos extratos de dorso e de ferrão, apresenta baixa massa molecular (entre 22,85 e 20,82 kDa) e que não houve diferença entre os constituintes do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. Houve, no entanto, variação intrapopulacional em relação aos constituintes do extrato do dorso. Quanto às atividades enzimáticas: (1) houve presença de atividade de fosfolipase A2 nos extratos do dorso e do ferrão (mais acentuada no veneno do ferrão – 36,4%) da arraia *Plesiotrygon iwamae*; (2) houve presença de atividade caseinolítica tanto no extrato do dorso quanto no do ferrão, porém com a presença de uma banda de massa molecular intermediária, no veneno do ferrão, que não esteve presente no extrato do dorso; (3) houve presença de atividade gelatinolítica, similar entre os extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*.

REFERÊNCIAS

- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on action of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 127, p. 21-30, 2000.
- BRISSE, I. B.; SCHAPER, A.; POMMIER, P.; HARO, L. Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe. *Toxicon*, v. 47, p. 32 – 34, 2005.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2776, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M. R.; RAGNO, M. P. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis avulsos de zoologia*, v. 51, n. 7, p. 101-138, 2011.
- CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides*, v. 30, p. 2191-2199, 2009.
- CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; SILVA JR, P. I.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. *Potamotrygon* cf. *henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein. *Toxicon*, v. 60, p. 821-829, 2012.
- COOK, M. D.; MATTEUCCI, M. J.; LALL, R.; LY, B. T. Stingray envenomation. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 30, n. 3, p. 345–347, 2006
- FENNER, P. J.; WILLIAMSON, J. A.; SKINNER, R. A. Fatal and non-fatal stingray envenomation. *Medical Journal of Australia*, v. 151, p. 621-625, 1989.
- FLEURY, R. L'appareil venimeux des sélaginiens trygoniformes. *Mem. Soc. Zool. France*, v. 30, p. 1–37, 1950.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. In: *Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism*. Chichester, 1997, p. 321-352.
- HALSTEAD, B.W. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. Gov. Print Office, v. 3, p. 29–69, 1970.
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* v. 102, p. 196–202, 1980

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.

LOVEJOY, N.R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zool. J. of the lin. Soc.* v. 117, p. 207–257, 1996.

MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A. A.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LOPES-FERREIRA, M.; Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scorbina* and *Potamotrygon* gr. *Orbignyi*. *Toxicon*, v. 47, p. 575-583, 2006.

MAGALHÃES, M. R. Estudos bioquímicos do veneno de raias *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Dasyatidae, Potamotrygonidae) – Purificação e caracterização de uma hialuronidase. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001.

MAGALHÃES, M. R.; SILVA JR, N. J.; ULHOA, C. J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon*, v. 51, p. 1060–1067, 2008.

MCGOLDRICK, J.; MARX, J. Marine envenomations; part 1: vertebrates. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 9, p. 497-502, 1991.

MOREY, S. S.; KIRAN, K. M.; GADAG, J. R. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon*, v. 47, p. 188–195, 2006.

NETO, G.; HADDAD J. V. Acidentes por raias. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2ª edição, São Paulo: Editora Sarvier, 2009, p. 295-305.

OZEGOWSKI, J. H.; GÜNTHER, E.; REICHARDT, W. Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*. *Zentralbl. Bakteriologie*, v. 280, p. 497–506, 1994.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C. VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, v. 39, p. 1495–1504, 2001.

POH, C. H.; YUEN, R.; CHUNG, M. C.; KHOO, H. E. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 101, p. 159–163, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: *Rang & Dale – Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 6ª Edição, 2008, p. 215.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three

subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999.

THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Env. Biol. Fish.* v. 9, p. 3–24, 1983.

VALENTIM, F. C. S.; FALCÃO, J. N.; PORTO, J. I. R.; FELDBERG, E. Chromosomes of three stingrays (Rajiformes Potamotrygonidae) from the Rio Negro basin, Amazon, Brazil. *Genetica*, v. 128, p. 33-39, 2006.

VELLARD, J. Venin des rais (*Taeniura*) du Rio Paraguaya (Brésil). *Comp. Rend. Acad. Sci.*, v. 192, p. 1279-1281, 1931.