

# ESTUDO DA TOXICIDADE DAS PEÇONHAS DA ARRAIA *Potamotrygon leopoldi* EM ZEBRAFISH

Geonildo Rodrigo Disner<sup>1\*</sup>; Louise Lene Gomes Lima<sup>1</sup>; Yan Torres<sup>2</sup>; Patrícia Charvet<sup>2</sup>; Carla Lima<sup>1</sup>; Monica Lopes-Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Imunoregulação do Laboratório de Toxinologia Aplicada-LETA (CeTICS/FAPESP), Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. \*disner.rodrigo@gmail.com; <sup>2</sup>Programa de pós-graduação em Sistemática, uso e conservação da Biodiversidade., Universidade Federal do Ceará, Brasil

Peixes peçonhentos representam um problema de saúde pública devido aos acidentes com banhistas e pescadores, destacando-se as arraias de água doce. Tais acidentes resultam em dor local, edema, necrose e laceração tecidual. Na bacia do Rio Xingu, ocorrências com arraias são frequentes, apesar de subnotificadas e sem tratamento adequado, e se dão especialmente com a espécie *Potamotrygon leopoldi*. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade da peçonha presente no ferrão e espinhos da espécie *P. leopoldi* através do teste de toxicidade em embriões de zebrafish. As amostras coletadas a partir de 19 fêmeas e 12 machos no Rio Xingu, Pará, foram processadas no Laboratório de Toxinologia Aplicada-Instituto Butantan. Após a raspagem epitelial do ferrão e maceração dos espinhos, utilizamos o método Bradford para quantificar proteínas, eletroforese para identificar o perfil proteico e teste de toxicidade aguda para determinar os efeitos das peçonhas (6,25, 25 e 50 µg). Os resultados destacaram variação na quantidade de proteínas do ferrão entre fêmeas e machos, 1,91 e 2,93 mg/mL, respectivamente; e dos espinhos, 7,71 e 12,27 mg/mL (fêmeas e machos). O perfil eletroforético não divergiu expressivamente, porém, demonstrou-se complexo com cerca de 8–12 bandas distribuídas entre 6–198 kDa. Com relação a toxicidade, verificamos efeito dose-dependente evidenciado pela mortalidade e teratogenicidade elevada nas maiores doses, com destaque ao espinho das fêmeas em 25 µg. Já em 50 µg, ambas as amostras de ferrão causaram maior letalidade, enquanto as amostras de espinho de ambos os gêneros apresentaram principalmente efeitos subletais e teratogênicos, notadamente bexiga natatória não inflada e atraso no desenvolvimento. Concluímos que a quantidade de proteínas dos espinhos se sobressai aos ferrões e a toxicidade sugere que a peçonha dos ferrões seja maior que dos espinhos, exceto em 25 µg, onde o espinho das fêmeas causou maior letalidade.

**Palavras-chave:** Arraia; Toxicidade; Zebrafish.

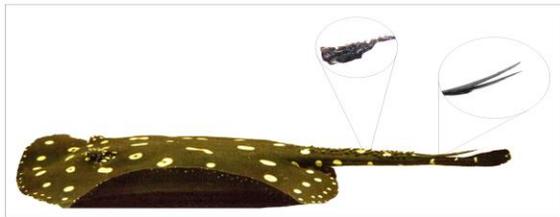
**Introdução.** O Brasil é conhecido por sua rica biodiversidade, incluindo aproximadamente 4.860 espécies de peixes (Froese & Pauly, 2023). Dentre esses, existem alguns que possuem a capacidade de produzir peçonha, constituindo o grupo de peixes peçonhentos. Tais peixes possuem sistemas que envolvem a produção e a liberação de substâncias tóxicas através de um aparato de veneno, composto por ferrões e/ou espinhos, que podem causar danos consideráveis às vítimas. Grande parte desses acidentes ocorre com arraias de água doce, acometendo principalmente os membros inferiores, devido ao fato de serem animais bentônicos (permanecem no fundo de rios e lagos de águas rasas) que, ao serem tocadas ou pisoteadas, ativam seu mecanismo de defesa em ricochete com a cauda (Haddad Jr., 2008). As arraias podem conter de um a três ferrões de bordas serrilhadas na extremidade da cauda recobertos por células secretoras

de veneno; além disso, podem apresentar espinhos ao longo da parte superior da cauda que também compõe o aparato de defesa (Charvet-Almeida *et al.*, 2002).

A espécie *Potamotrygon leopoldi* (Figura 1) pertence à ordem Myliobatiformes e à família Potamotrygonidae, sendo conhecida como a única família com representantes de água doce (Compagno & Cook, 1995). Devido à escassez de estudos, há uma considerável demanda em avançar na compreensão dos aspectos toxicológicos relacionados a esta espécie de arraia. Para tal, podem ser empregados modelos animais experimentais que fornecem indicações dos efeitos que tais toxinas ocasionam nos alvos. Nesse contexto, o peixe *Danio rerio*, conhecido como zebrafish, pode ser um aliado nas pesquisas por representar um modelo alternativo em consonância com a filosofia dos 3 Rs da experimentação animal, isso é, redução, refinamento e substituição (*Replacement, Reduction e Refinement*).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade aguda da peçonha, oriunda dos espinhos e do ferrão, de arraias *P. leopoldi* adultas sobre parâmetros de desenvolvimento embrio-larval de zebrafish (*FET Test*, OECD 236).

**Materiais e métodos.** Exemplares de ferrões e espinhos de *P. leopoldi* adultos foram coletados pela Dra. Patrícia Charvet na bacia do rio Xingu no Estado do Pará, Brasil (Figura 1), com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico N° 14693-1).



**Figura 1.** Arraia *Potamotrygon leopoldi*. Destaque aos espinhos e ferrões da cauda (créditos Daniela Torres e Plataforma Zebrafish).

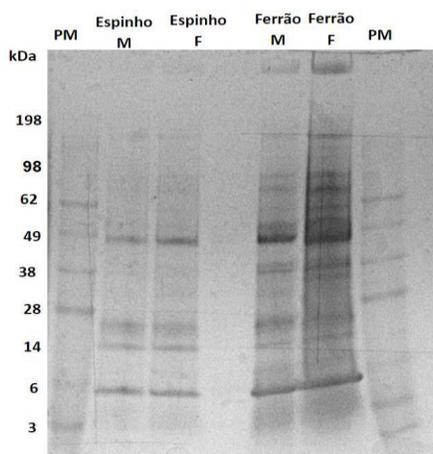
No Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan a extração da peçonha foi realizada pela raspagem epitelial do ferrão e maceração dos espinhos em PBS seguidos de centrifugação para separação das proteínas no sobrenadante (Schaeffer *et al.*, 1971), resultando em um *pool* da peçonha de 19 fêmeas e 12 machos, separados por gênero e entre amostras de ferrão e espinhos. A concentração específica de proteínas foi determinada pelo método de Bradford e o perfil proteico foi visualizado através da eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 8–16% corado com Azul de Coomassie Brilhante.

No teste de toxicidade aguda em embriões de zebrafish (*Fish Embryo Toxicity - FET*) foram utilizados embriões nas primeiras horas pós fertilização (hpf) que, de acordo com o protocolo padronizado, foram distribuídos em placas de 24 poços, em grupos de cinco embriões por poço, com 2 mL de meio E2 onde foram adicionadas as substâncias teste, em quadruplicata, sem prejuízo considerável a composição do meio. Neste estudo, os embriões foram expostos a 6,25, 25 e 50 µg da peçonha extraída tanto dos ferrões quanto dos espinhos e monitorados durante 96 horas, onde os parâmetros analisados foram a mortalidade, efeitos subletais (ausência de pigmentação, bexiga natatória não inflada, edema no saco vitelínico, edema no pericárdio) e efeitos teratogênicos (atraso de desenvolvimento, escoliose e cauda curva) (Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto Butantan n° 5502030823).

**Resultados e discussão.** Os dados obtidos em campo demonstram que o peso e tamanho das fêmeas são consideravelmente maiores em relação aos machos (Tabela 1). No entanto, a quantidade de proteínas totais presentes no *pool* das amostras demonstrou que os machos apresentaram uma maior quantidade de proteínas tanto nas amostras do ferrão (fêmeas 1.91 e machos 2.93 mg/mL) quanto na de espinhos (fêmeas 7.71 e machos 12.27 mg/mL). Em ambos os sexos, os espinhos têm mais proteínas que as amostras do ferrão. Em relação ao perfil eletroforético das proteínas, todas as amostras possuem perfil semelhante, onde identificamos aproximadamente de 8 a 12 bandas proteicas, distribuídas de 6 a 198 kDa (Figura 2).

**Tabela 1.** Dados morfométricos dos exemplares da arraia *Potamotrygon leopoldi* coletados no Rio Xingu.

	Comprimento total (mm)	Largura do disco (mm)	Peso (g)
<b>Fêmeas</b>	766,79 ± 118,6	488,79 ± 78,69	6977,89 ± 3563,68
<b>Machos</b>	596,33 ± 50,85	367,67 ± 29,32	2566,25 ± 725,82



**Figura 2.** Perfil eletroforético das proteínas totais (SDS-page). Amostras isoladas de espinhos e ferrão de arraias macho (M) e fêmea (F). 50 µg de proteína/poço. O peso molecular (PM) é apresentado em ambas as extremidades do gel em kilodalton (kDa).

O teste de toxicidade apontou que a concentração de 6,25 µg causou baixa mortalidade em todos os períodos analisados. Com relação aos efeitos subletais apenas foi detectada bexiga natatória não inflada, predominantemente na amostra de ferrões fêmeas, já o efeito teratogênico predominante foi atraso no desenvolvimento. De todas as amostras testadas nessa concentração, a que menos causou

efeito foi a dos espinhos dos machos.

Já a concentração 25 µg induziu maior mortalidade a partir de 72 horas nas amostras espinhos fêmeas e ferrões machos, notadamente a primeira. Além disso, a amostra dos espinhos dos machos induziu um expressivo atraso no desenvolvimento, seguido pela amostra de ferrões das fêmeas. Embora a amostra de ferrões de fêmeas tenha causado baixa mortalidade, esta induziu importantes efeitos subletais e teratogênicos (Tabela 2).

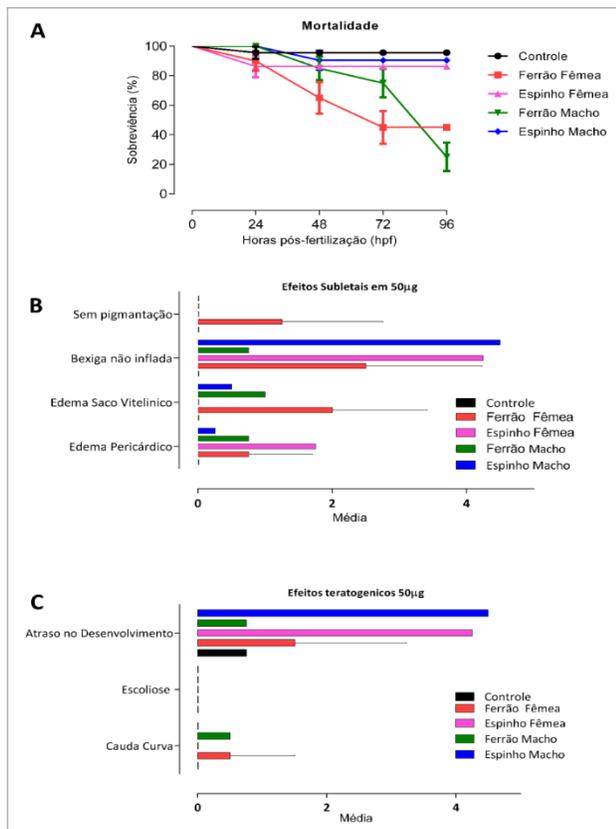
**Tabela 2.** Efeitos tóxicos médios das diferentes peçonhas na concentração de 25 µg analisados em 96 horas pós-fertilização pelo teste de toxicidade *FET test* em zebrafish.

	Sobrevivência	Efeitos subletais			Efeitos teratogênicos	
		Bexiga natatória não inflada	Edema saco vitelínico	Edema pericárdio	Atraso no desenvolvimento	Escoliose
<b>Fêmea Ferrão</b>	70%	3,25 ± 0,43	2 ± 0,71	3 ± 0,7	2,25 ± 1,3	0,25 ± 0,43
<b>Fêmea Espinho</b>	15%	0	0,5 ± 0,87	0,5 ± 0,87	0	0
<b>Macho Ferrão</b>	50%	2,75 ± 1,64	0	1,75 ± 1,1	0,5 ± 0,5	0
<b>Macho Espinho</b>	90,48%	3,25 ± 0,83	0	0	3,25 ± 0,83	0

Ao testar a maior concentração da peçonha (50 µg) os índices de mortalidade foram maiores nos embriões expostos à peçonha dos ferrões de machos e das fêmeas (Figura 3A). Esta

concentração provocou uma maior intensidade de efeitos subletais em todas as amostras testadas, principalmente bexiga natatória não inflada para as amostras dos espinhos de ambos os sexos. A amostra dos ferrões das fêmeas causou todos os efeitos subletais (ausência de pigmentação, bexiga não inflada, edema no saco vitelínico e edema no pericárdio) (Figura 3B). Além disso, o principal efeito teratogênico observado foi atraso no desenvolvimento, sendo mais intenso para as amostras dos espinhos, tanto das fêmeas quanto dos machos. Este atraso foi expressivo nas primeiras 24 hpf, onde os embriões, especialmente os expostos à peçonha dos ferrões, se desenvolveram mais morosamente quando comparados ao controle negativo.

A importância de se analisar um conjunto amplo de efeitos subletais em embriões de zebrafish se dá pelo fato de que efeitos morfológicos subletais precedem a mortalidade (Braunbeck *et al.*, 2015). Ainda, é importante considerar que efeitos subletais que potencialmente possam comprometer o desenvolvimento e o desempenho fisiológico dos peixes tem, conseqüentemente, um potencial impacto na sua sobrevivência a curto-médio prazo e, assim, devem ser levados em consideração no estudo.



**Figura 3.** Efeitos tóxicos em embriões de zebrafish expostos a 50 µg da peçonha do ferrão ou dos espinhos da arraia *Potamotrygon leopoldi*.

**Conclusão.** Observamos que a toxicidade foi dose-dependente para os dois tipos de amostras (espinhos e ferrões), sendo que ambas foram tóxicas causando mortalidade, efeitos subletais e teratogênicos, com maior intensidade dos efeitos para as amostras dos ferrões em relação aos espinhos. A amostra dos ferrões das fêmeas, embora não tenha causado alta mortalidade, provocou notáveis efeitos teratogênicos e subletais na dose de 25 µg. De forma similar, nesta dose a amostra dos espinhos dos machos não alterou a sobrevivência, porém resultou em bexiga natatória não inflada e atraso no desenvolvimento. Nos tratamentos com 50 µg da peçonha, as amostras de ferrões, tanto dos machos quanto das fêmeas, foram as mais tóxicas em relação à sobrevivência. Porém, as amostras de espinhos, apesar de não causarem

significativa mortalidade, resultaram em efeitos subletais e teratogênicos consideráveis.

**Agradecimentos.** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP notadamente através do Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular-CeTICS (#2013/07467-1; 2019/27677-7) e à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

## Referências

- Braunbeck T; Kais B; Lammer E; Otte J; Schneider K; Stengel D; Strecker R. The fish embryo test(FET): origin, applications, and future. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(21): 16247-61, 2015. doi: 10.1007/s11356-014-3814-7.
- Charvet-Almeida P; Araújo MLG; Rosa RS; Rincón G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News*, 14: 47-51, 2002.
- COMPAGNO LJV; COOK SF. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: *Biology and Conservation of Freshwater Elasmobranchs*. Martin A; MacKinlay D (eds.). Symposium Proceedings. Vancouver: American Fisheries Society, 1995.
- Froese R; Pauly D. Editors. 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (10/2023). Disponível em: <https://www.fishbase.se/search.php>. Acesso em 16/12/2023.
- HADDAD JR, Vidal. Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2008.
- Schaeffer RC Jr; Carlson RW; Russell FE. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon.* 9(1):69-78, 1971. doi: 10.1016/0041-0101(71)90045-6.