

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA**

Karina Isabel Castellanos Romero

**Análises ecológicas e moleculares comparativas de arraias do gênero
Potamotrygon e prospecção de moléculas bioativas do ferrão**

Juiz de Fora
2019

Karina Isabel Castellanos Romero

**Análises ecológicas e moleculares comparativas de arraias do gênero
Potamotrygon e prospecção de moléculas bioativas do ferrão**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco
Co-orientador: Dr. Jorge Arboleda Valencia

Juiz de Fora
2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Castellanos Romero, Karina Isabel .

Análises ecológicas e moleculares comparativas de arraiais do gênero *Potamotrygon* e prospecção de moléculas bioativas do ferrão / Karina Isabel Castellanos Romero. -- 2019.

129 f.

Orientador: Octavio Luiz Franco

Coorientador: Jorge Arboleda Valencia

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Arraia. 2. Ecologia. 3. Ferrão. 4. Transcriptoma. 5. Bioprospecção. I. Franco, Octavio Luiz , orient. II. Valencia, Jorge Arboleda , coorient. III. Título.

**Análises ecológicas e moleculares comparativas de arraias do gênero
Potamotrygon e prospecção de moléculas bioativas do ferrão**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biotecnologia.

Aprovada em: 09/08/2019.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Octavio Luiz Franco – Orientador
Universidade Católica de Brasília



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Marta Fonseca Martins
Universidade Federal de Juiz de Fora -EMBRAPA - Gado de leite



Dr. Harry Morales Duque
Universidade Católica de Brasília



Dr. Daniel Nogoceke Sifuentes
EMBRAPA – Recurso Genéticos e Biotecnologia

*A Deus, que nunca me abandona.
Aos meus pais, motivação e inspiração da minha
vida.
Aos meus irmãos sobrinhos e toda a família, pelo
que representam e especialmente ao Alejandro.*

Karina

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus que me guia e ilumina em cada dia da minha vida e aos meus pais, que viveram confiantes em mim e foram meu apoio incondicional.

Gratidão é pouco para os que merecem, agradeço ao meu orientador Octavio Luiz Franco e co-orientador Jorge Arboleda Valencia, pelo voto de confiança depositado e suas contribuições. A os professores das bancas de qualificação e defesa pelos aportes.

Aos meus docentes da UFJF, em especial aos professores Marcelo Santos, Lyderson Viccini e Cláudio Galuppo. E a todos os meus colegas que contribuíram na minha vida acadêmica.

Agradeço também aos funcionários e instituições brasileiras que providenciaram o necessário para o meu processo; desde a Embaixada, CAPES, à minha querida UFJF e o programa de pós-graduação, à outras universidades que me forneceram a infraestrutura: UCB, UCDB.

Às instituições da Colômbia que me apoiaram, em especial *Universidad del Atlántico* e o *Centro de Bioinformática de Biología Computacional de Colombia-BIOS*; onde encontrei a pessoas que prestaram toda ajuda, fundamentalmente Luis Rivera.

E não posso esquecer aos meus amigos da Colômbia e do Brasil pelo apoio, especialmente, Roger, Claudia, Yamileth, Lily, Patricia e a sua família, Osmel, Fabian, Harry, Nelson Junior, Bell e Osmar.

RESUMO

O gênero *Potamotrygon*, pertencente à família Potamotrygonidae, uma família de arraias de água doce, da ordem Myliobatiformes (arraiias). Este gênero possui o maior número de espécies que apresentam grande variação específica e individual. Dentro das espécies do gênero, destaca-se a espécie *Potamotrygon magdalенаe*, por ser uma espécie quase inexplorada, endêmica da bacia do rio Magdalena. O objetivo do presente estudo foi comparar duas espécies de arraias brasileiras (*P. amandae* e *P. falkneri*), com um transcriptoma já disponível, com as espécies de *P. magdalенаe*. Em cada local em que os indivíduos foram coletados, foram analisadas as propriedades físico-químicas da água. Foram realizadas análises bioinformáticas, incluindo máquina de aprendizagem, como estratégia para identificar genes responsáveis por moléculas de interesse biotecnológico (peptídeos antimicrobianos), produzidos por essas arraias. Além disso, com os extratos brutos do epitélio do ferrão coletados das arraias, foi realizado um teste de atividade *in vitro* para determinar seu potencial antimicrobiano contra microorganismos que causam infecções hospitalares. Com a análise físico-química da água, foi possível estabelecer uma relação entre o pulso de inundação e a condutividade no sistema aquático, inferindo que eles podem estar determinando condições para a presença das espécies; as populações são estabelecidas de acordo com a capacidade de tolerar alguns fatores ambientais e isso depende das informações armazenadas nos genes através do processo evolutivo (potencial do ecossistema) e do suprimento de alimentos e *habitat* que esse ambiente fornece. Além da análise do ecossistema, foram selecionados genes para moléculas de bioprospecção de interesse biotecnológico, que são produzidas por essas arraias, previstas pela abordagem transcriptômica. O estudo do transcriptoma de arraia em si é um desafio devido à falta de informações sobre esses organismos publicados na literatura e as espécies de água doce da família Potamotrygonidae, que são inexploradas e as particularidades de cada espécie, refletidas em transcrições únicas das espécies colombianas. Esses resultados representam uma excelente oportunidade para avaliar não apenas o recurso genético; isso agregou conhecimento de gênero e funções, mas também o potencial antimicrobiano desses venenos da análise do transcriptoma, visando o uso de ferramentas bioinformáticas. Além disso, uma primeira etapa de bioprospecção foi realizada por ensaio, que mostrou porcentagens significativas de inibição (até 100%) com valores significativos de

concentração inibitória mínima (CIM) para *Candida albicans* (0,08706 µg.mL⁻¹), *Pseudomonas aeruginosa* (0,1807 µg. mL⁻¹), *Klebsiella pneumoniae* (0,001 µg.mL⁻¹); como o primeiro passo na prospecção desse potencial de arraia.

PALAVRAS-CHAVE: Arraia. Ecologia. Ferrão. Transcriptoma. Bioprospecção.

ABSTRACT

The Potamotrygon genus, belonging to the family Potamotrygonidae, a family with freshwater stingrays, of the order *Myliobatiformes* (stingrays). This genus has the largest number of species that present great specific and individual variation. Within the species of the genus, the species *Potamotrygon magdalenae* stands out, being an almost unexplored species, endemic of the basin of the Magdalena River. The study object of the present study was to compare two species of Brazilian stingrays (*P. amandae* and *P. falkneri*), with a transcriptome already available, with the *P. magdalenae* species. In each site when the individuals were collected, the physical-chemical properties of the water were analyzed. Bioinformatics analyzes, including a learning machine, were carried out as a strategy to identify genes responsible for molecules of biotechnological interest (antimicrobial peptides), produced by these stingrays. In addition, with the crude extracts from the sting epithelium collected from the stingrays, an in vitro activity test was performed to determine their antimicrobial potential against microorganisms that cause hospital infections. With the physicochemical analysis of the water it was possible to establish a relationship between the flood pulse and the conductivity in the aquatic system, inferring that they may be determining conditions for the presence of the species; Populations establish according to the ability to tolerate some environmental factors and this is dependent on the information stored in the genes through the evolutionary process (ecosystem potential) and the supply of food and habitat that this environment provides. In addition to the ecosystem analysis, genes were selected for bioprospecting molecules of biotechnological interest, which are produced by these stingrays, predicted by the transcriptomic approach. The study of the stingray transcriptome itself is a challenge due to the lack of information about these organisms published in the literature and the freshwater species of the Potamotrygonidae family, which are unexplored and the particularities of each species, reflected in unique transcripts of the Colombian species. These results represent an excellent opportunity to evaluate not only the genetic resource; This added knowledge of gender and functions, but also the antimicrobial potential of these poisons from transcriptome analysis, aimed at using bioinformatic tools. In addition, a first bioprospecting step was performed by assay, that showed significant inhibition percentages (up to 100%) with significant minimum inhibitory concentration (MIC) values for *Candida albicans* (0.08706 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *Pseudomonas*

aeruginosa (0.1807 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), *Klebsiella pneumoniae* (0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); as the first step in prospecting for this potential of stingrays.

Keywords: Stingray. Ecology. Venom. Transcriptome. Bioprospecting.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização do Embalse del Guájaro e nele, os pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no pantanal da Bacia baixa do Rio Magdalena-Litoral Norte da Colômbia41
- Figura 2 - Localização do Embalse del Guájaro e nele, os pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no pantanal da Bacia baixa do Rio Magdalena-Litoral Norte da Colômbia.43
- Figura 3 - Algumas medidas utilizadas pela merística das arraias.....44
- Figura 4 - Descrição da espécie *Potamotrygon magdalena* (Duméril, 1865). Ilustração retirada do “Guía ilustrada para la identificación de especies de tiburones, rayas y quimeras de Colombia”.50
- Figura 5 - Atributos merísticos (Largura do disco Ld (azul), Comprimento do disco Cd (vermelho) e peso P (verde)) dos espécimes de arraias coletadas (Rk, 1, 2, R1-R35) no Embalse del Guájaro na Colômbia.....51
- Figura 6 - Estrutura da população de arrais por faixa etária (I: neonato; II: juvenil; III: adulto imaturo; IV: adulto maduro) das fêmeas coletadas na população de *P. magdalena* no Embalse del Guájaro.52
- Figura 7 - Estrutura da população de arraias por faixa etária (I: neonato; II: juvenil; III: adulto imaturo; IV: adulto maduro) dos machos coletados (1, R24-Rk) na população de *P. magdalena* no Embalse del Guájaro.....52
- Figura 8 - Distribuição porcentual na população coletada, da faixa etária das fêmeas (A) e os machos (B); neonatos no estado I (azul) juvenis no estágio II (vermelho), adulto imaturo no estágio III (verde) e adulto maturo no estado IV (roxo).....53
- Figura 9 - Valores da profundidade (cm) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.....54
- Figura 10 - Valores da transparência da água (cm) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.55
- Figura 11 - Valores do pH durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro. .56
- Figura 12 - Valores do OD (mg/L) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.....56
- Figura 13 - Valores da temperatura (°C) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.....57
- Figura 14 - Valores da condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse del Guájaro57
- Figura 15 - Avaliação dos resultados da busca dos genes ortólogos entre as três espécies do gênero *Potamotrygon* comparadas; resultados comparativos

das ferramentas utilizadas para *P. magdalенаe* (A), Resultados comparativos entre as linhas, de acordo com a ferramenta BUSCO (B); os resultados comparativos entre espécies com ferramentas adicionais (C).
.....62

- Figura 16 - Número total de transcrições, exclusivas de cada espécie, e comuns entre as três espécies de arraiais.....64
- Figura 17 - Classificação KEGG das transcrições exclusivas para cada espécie, separadas em seis categorias: Metabolismo, Processamento de Informações Genéticas, Processamento de Informações Ambientais, Processos Celulares, Sistemas Organizáveis e Doenças Humanas.....70
- Figura 18 - Avaliação da inibição de *Candida albicans* vs extratos brutos (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.....80
- Figura 19 - Avaliação de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* vs extratos brutos (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.....81
- Figura 20 - Avaliação da inibição de *Escherichia coli* vs extratos brutos (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.....82
- Figura 21 - Avaliação da inibição de *Klebsiella pneumoniae* vs extratos brutos (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.....83
- Figura 22 - Avaliação da inibição de *Staphylococcus aureus* vs extratos brutos. (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Geoposição dos pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) dos espécimes no Embalse del Guájaro (Litoral Norte da Colômbia). Coordenadas planas, geradas sob o sistema WGS_1984_UTM_Zona_8N.....	43
Tabela 2 - Métodos para análises físico-químicos da água.	45
Tabela 3 - Análise de correlação (Pearson; $\alpha=0,05$) entre a abundância de arraiais e as condições ambientais.	58
Tabela 4 - Resumo estatístico do sequenciamento e da montagem do transcriptoma de novo de três espécies de amostras de cDNA do gênero <i>Potamotrygon</i>	60
Tabela 5 - Resultados da Classificação KEGG das transcrições de três espécies do gênero <i>Potamotrygon</i> , separadas em seis categorias: Metabolismo, Processamento de Informação Genética, Processamento de Informação Ambiental, Processo Celular, Sistemas Organizáveis e Doenças Humanas	66
Tabela 6 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em <i>P. magdalenae</i> e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.	72
Tabela 7 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em <i>P. amandae</i> e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.	74
Tabela 8 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em <i>P. falkneri</i> e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.	76
Tabela 9 - MIC dos extratos sobre as cepas testadas.	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	UMA VISÃO GERAL SOBRE AS ARRAIAS.....	17
2.2	Aspectos biológicos e importância ecológica das arraias.....	18
2.2.1	Distribuição	18
2.2.1.1	Nível trófico	19
2.2.1.2	Taxas de crescimento e reprodução	21
2.3	TRANSCRIPTOMA DE ESTRUTURAS PRODUTORAS DE VENENOS DE PEIXES E OUTROS ANIMAIS COM PEÇONHA	24
2.3.1	Transcriptoma da peçonha de Artrópodes	24
2.3.1.1	Transcriptômica da peçonha de insetos	25
2.3.1.2	Transcriptoma da peçonha de Miriápodes	25
2.3.1.3	Transcriptômica da peçonha de aranhas e escorpiões	26
2.3.2	Transcriptoma da peçonha de moluscos	29
2.3.3	Transcriptoma da peçonha de répteis	32
2.3.3.1	Transcriptoma do peçonha de serpente	32
2.3.4	Transcriptoma das estruturas de veneno de peixes	36
2.3.4.1	Transcriptômica das estruturas de veneno de arraias.....	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVO	40
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO:	40
5	MATERIAL E METODOS	41
5.1	Desenho experimental e análise estatística	41
5.1.1	Fase I: Coleta de amostras	42
5.1.2	Fase II: Análise Transcriptômica	45
5.1.2.1	Preparo da amostra e extração de RNA.....	45
5.1.2.2	Construção da biblioteca e sequenciamento de nova geração (RNA-Seq)...	45
5.1.2.3	Pré-processamento de dados e montagem da transcriptoma	46
5.1.2.4	Análise de completude do transcriptômica de <i>Potamotrygon</i>	46
5.1.2.5	Redundância e geração da análise unigenes de <i>Potamotrygon</i>	46
5.1.2.6	Anotação de transcriptoma funcional de <i>Potamotrygon</i>	47

5.1.2.7	Análise <i>in silico</i> de peptídeos antimicrobianos no <i>dataset</i> do transcriptoma de <i>Potamotrygon</i>	47
5.1.3	Fase III: Análise Funcional.....	48
5.1.3.1	Extração da peçonha, obtenção do extrato bruto (EB).....	48
5.1.3.2	Quantificação proteica das amostras	48
5.1.3.3	Testes de termoestabilidade	48
5.1.3.4	Bioensaios contra Bactérias e fungos	49
5.1.3.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	49
6	RESULTADOS.....	50
6.1	COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BIOLÓGICA COLETADA.....	50
6.2	CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO SISTEMA AQUÁTICO	53
6.3	NOVO TRANSCRIPTOMA OBTIDO DO EPITELIO DE FERRÃO DA ARRAIA-DE ÁGUA DOCE: <i>Potamotrygon magdalenae</i>	59
6.3.1	Montagem e Sequenciamento de novo do transcriptoma da glândula de veneno de <i>P. magdalenae</i>.....	59
6.3.2	Anotação do transcriptoma da <i>Potamotrygon magdalenae</i>	61
6.4	ANOTAÇÃO FUNCIONAL DE <i>Potamotrygon magdalenae</i> E ANÁLISE COMPARATIVA COM AS DEMAIS ESPÉCIES DO GÊNERO	63
6.5	BIOENSAIOS COM OS EXTRATOS BRUTOS (EB) DO EPITELIO DE FERRÃO	79
6.5.1	Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos brutos	84
7	DISCUSSÃO	86
7.1	CONDIÇÕES AMBIENTAIS	86
7.2	ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA.....	87
7.3	ANÁLISES FUNCIONAIS.....	92
8	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDECE A - Artigo publicado durante o doutorado.....	104
	APÊNDICE B - Artigos submetido pelo autor como resultado da tese	118
	ANEXO A - Valores das variáveis físico-químicas.....	119
	ANEXO B - Description of the specie <i>Potamotrygon magdalenae</i>.....	121
	ANEXO C - Teste de ANOVA.....	122

ANEXO D - Dados brutos do transcriptoma

.....**128**

1 INTRODUÇÃO

As arraias, pertencentes à família Potamotrygonidae, apresentam espécies marinhas ou fluviais, que têm sido encontradas em todo litoral brasileiro e colombiano, sendo que as de água doce podem ser encontradas com maior frequência em rios das regiões norte da Colômbia e norte e centro-oeste do Brasil (MORO; CHARVET; ROSA, 2012). A família de arraias-de-água-doce Potamotrygonidae consiste em um grupo monofilético (ODDONE; VELASCO; CHARVET, 2012) pertencente à ordem Myliobatiformes (araias-com-ferrão), composto de 18 a 20 espécies validadas (CARVALHO; LOVEJOY, 2011). Esta ordem tem sido dividida em três gêneros (Paratrygon, Plesiopygon e Potamotrygon). O gênero Potamotrygon, como atualmente tem sido reconhecido, pode ser representado por 16 ou 18 espécies (LOBODA; CARVALHO, 2013). No entanto, algumas espécies com ampla distribuição geográfica podem ser subdivididas em novas espécies como observado nos casos da *Potamotrygon motoro* e *P. orbignyi* (SILVA, CARVALHO, 2011a)

O trabalho de taxonomia da família ainda é complexo, porque novas espécies descobertas estão aguardando a descrição formal ou as descritas mudam a denominação na hierarquia taxonômica (GARCIA et al., 2015). Algumas características causam dificuldade na identificação de algumas espécies, incluindo a presença de grande variação intraespecífica de coloração, sobreposição de coloração, e caracteres merísticos e morfométricos muito variáveis entre espécies (CRUZ, 2013; MEJÍA-FALLA et al., 2011). A ecologia e os aspectos próprios das espécies do gênero são claramente observadas, tais como as que habitam no fundo de rios ou mares (bentopelágicos) e possuem um longo apêndice caudal semelhante a um chicote, sendo essa última a característica principal, onde estão localizados de um a quatro ferrões ósseos serrilhados, recobertos por um epitélio glandular cujas células produzem peçonha (SHIBUYA; ZUANON; TANAKA, 2012; PASIAN, 2009; ARAÚJO, 2003), fonte de moléculas para bioprospecção.

A maior parte dos estudos disponíveis sobre bioprospecção, a partir de peixes de-água-doce têm como foco o veneno, incluindo as arraias, e abordam os aspectos relativos ao envenenamento causado por esses animais. Porém ainda se sabe muito pouco sobre os demais constituintes das peçonhas, especialmente os peptídeos e suas possíveis ações farmacológicas. Desse modo, estudos com essas peçonhas podem evidenciar uma importante fonte de novos agentes terapêuticos; embora,

poucas moléculas foram isoladas a partir destes animais, como a hialuronidase purificada da peçonha de *P. amandae* (antes *P. motoro*) (MAGALHÃES; SILVA JÚNIOR; ULHOA, 2008). As hialuronidasas são enzimas que quebram ácido hialurônico, um dos principais componentes da matriz extracelular dos vertebrados. Essas enzimas facilitam a absorção e difusão da peçonha nos tecidos das vítimas, aumentando o envenenamento sistêmico. Além disso, a atividade proteolítica também foi demonstrada em peçonhas de *Potamotrygon* cf. *scobina* e *P. orbignyi* (MAGALHÃES. et al., 2006).

O primeiro estudo de pesquisa sobre as propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha das arraias foi realizado por Russell e Van Harreveld (1953) (revisado por MAGALHÃES et al., 2008), onde foram demonstrados os efeitos cardiovasculares da peçonha de *Urobatris helleri*. Russell (1954) (BARBARO et al., 2007), onde foi observada a presença de polipeptídios de alto peso molecular, serotonina e fosfodiesterases, em venenos de arraias marinhas. Posteriormente, Rodrigues (1972) (MAGALHÃES, et al., 2006) isolou um princípio ativo da peçonha de *Potamotrygon motoro*, com atividade colinérgica sobre íleo de cobaia e atividade anti-hipertensiva em ratos. Em seguida foram identificados outros compostos nas peçonhas de *Potamotrygon falkneri* e *P. motoro* como, fosfolipases, fosfatases ácidas, hialuronidasas, caseinolíticos, gelatinolíticos e elastinolíticos (PEDROSO et al., 2007). Em outros trabalhos foi isolado um peptídeo de massa molecular 1001.52 Da que apresentou atividade vasoconstritora da peçonha de *P. orbignyi* (CONCEIÇÃO et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011; KUMAR et al., 2011).

Em uma nova era pós-antibiótica, viabilizou a possibilidade de explorar variadas fontes de compostos, para a produção de diversos fármacos, a partir de compostos sintéticos, naturais ou semelhantes aos naturais, capazes de combater infecções comunitárias e hospitalares, mas que atualmente podem matar devido à resistência antimicrobiana (AMR) dos agentes causadores (WHO, 2015). Conhecendo-se os antecedentes toxicológicos das arraias, é interessante avaliar o seu potencial biotecnológico; tomando em consideração, que as complicações relacionadas com infecções, são causadas pela atenção negligenciada e não porque o veneno mesmo contenha microrganismos. Além disso, uma abordagem transcriptômica do epitélio do ferrão das arraias dulciaquícolas da espécie *Potamotrygon magdalenae* (DUMÉRIL, 1985), pode fornecer uma informação mais resolutiva do teor do veneno, como

resposta ao ambiente e permitir aa comparativas com as espécies do mesmo gênero no Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As arraias-de-água-doce pertencem à ordem Myliobatiformes (araias com ferrão), à família Potamotrygonidae (GARMAN, 1877), representada por 3 gêneros *Paratrygon*, *Potamotrygon*, *Plesiotrygon*; cuja característica em comum consiste na inabilidade destas viverem no ambiente marinho, devido à redução da glândula retal e às baixas concentrações de ureia no sangue (ALMEIDA, 2003).

2.1 UMA VISÃO GERAL SOBRE AS ARRAIAS

Com aproximadamente 25 espécies validadas e outras 10 no processo de descrição, a classificação dessa família pode ser muito difícil dada a uma variação intraespecífica e individual. A característica morfológica relevante do grupo é a presença de um processo pré-pélvico longo, que se estende anteriormente até quase atingir a cintura peitoral, constituindo uma sinapomorfia deste grupo, devido que os gêneros *Paratrygon*, e *Plesiotrygon* são monotípicos; enquanto que *Potamotrygon*, apresenta um número maior de espécies, podendo variar segundo os autores entre 16 e 18 (ALMEIDA, 2003).

Na taxonomia convencional, seguem-se usando as variações de coloração junto com outras características como comprimento labial, padrões da espinha dorsal, a cauda e dentição, para a identificação destas espécies. Avaliar essas características requer um grande esforço devido o número de espécimes, de amostragem em uma população, que pode estar amplamente distribuída (SILVA, CARVALHO, 2011b) a alguns autores têm feito esses esforços para revisar muitas vezes a taxonomia dessas espécies (CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2002; DEYNAT, 2006; FILHO, 2006; LOBODA; CARVALHO, 2013).

As arraias como todos os peixes cartilaginosos (classe Chondrichthyes: tubarões, arraias, patins, quimeras) são exemplos notáveis da evolução bem-sucedida, com registros fósseis estendendo-se desde pelo menos o Devoniano inferior, há mais de 400 milhões de anos. Dada a sua extraordinária história evolutiva e origem filogenética basal em relação a outros vertebrados mandibulados, condictes, essa classe foi proposta como modelo comparativo importante para compreender a evolução de genoma de vertebrados em geral, além dos vários aspectos específicos

dos mecanismos evolutivos, do desenvolvimento de vertebrados, da fisiologia e outras funções (BADUEL et al., 2014)

Uma das aplicações dos estudos genômicos das arraias tem foco nas relações evolutivas de gnatostomados (vertebrados), que compõem a classe Chondrichthyes (peixes cartilagosos), peixes ósseos e outros grupos (PINHAL *et al.*, 2011). Embora as análises filogenéticas baseadas em fósseis, morfologia e sequências moleculares têm gerado diferentes modelos de relacionamentos que necessitam ser esclarecidos em detalhe, o que têm sido debatidas por quase um século (DOSAY-AKBULUT, 2006), como, a proporção relativamente menor de repetições de microssatélites trinucleotídeos, dentro do quadro de leitura aberta ORFs (do inglês, *Open Reading frame*), pode prever uma hipótese desse mecanismo genético com maior exploração (ZHU et al., 2006). Desta forma o transcriptoma das arraias pode ser um recurso valioso que adiciona ao campo atualmente nascente da genômica de peixes cartilagosos e fornece uma referência para a caracterização de conjuntos de dados genômicos de outros elasmobrânquios, que possivelmente emergirá com frequência. Este recurso também pode fornecer informação em maior escala dos genes de um peixe envolvidos na produção de veneno, que exibe uma coleção de notáveis propriedades físico-químicas, fisiológicas e comportamentais. Ademais, pode ser de particular interesse a observação da proporção de processos metabólicos envolvidos e anotados a partir das transcrições, que podem ser semelhantes aos daqueles encontrados em humanos. Isto tem sido consistente com os estudos de Venkatesh *et al.*, (2001) que encontraram elementos genômicos não-codificantes e a posição relativa dos genes, mais similares entre arraias e humanos do que frente aos outros vertebrados (VENKATESH; ERDMANN; BRENNER, 2001).

2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DAS ARRAIAS

As arraias, como os elasmobrânquios em geral, podem ser susceptíveis por exibir padrões muito diferentes de conectividade de população, em comparação com os peixes teleósteos mais estudados. As arraias, possuem uma série de características distintas de história de vida, tais como taxas de crescimento lento (em geral), longevidade, reprodução atrasada e baixa saída reprodutiva. Além disso, como predominantemente carregadores das crias (na zona ventral das fêmeas), a dispersão das arraias não é dependente da liberação de ovos pelágicos e larvas, assim, sua

dispersão é principalmente dependente do potencial de movimentação dos adultos (LE PORT; LAVERY, 2012).

2.2.1 Distribuição

As arraias constituem um interessante grupo para examinar a importância relativa de potenciais fatores de isolamento (ou seja, distância, preferência de habitat e fidelidade do sítio) sobre a dispersão, concorde ao seu estilo de vida costeiro ou dulciaquícola, principalmente bentônicos, pelo que seu potencial de dispersão deverá ser limitado em comparação com outros peixes mais móveis. Tendo em conta a atual distribuição disjunta de muitas espécies de arraia (FREDERICO et al., 2012), este fato pode levantar muitas questões sobre como surgiram estas distribuições.

Apenas em uns poucos estudos de marcação, observaram os movimentos e habilidades de dispersão em arraias dulciaquícolas em nichos predominantemente condutivos. O padrão geral observado nestas espécies parece ser que, os padrões de movimento possam ser estacionais, envolvendo movimentos de escala local, durante meses quentes (presumivelmente no fundo, para acasalamento ou criação). No caso das que habitam longe do neotrópico, com mesoescala (30 km) e migrações de escala maiores (100 km), entre o inverno e verão em algumas espécies, tais movimentos dirigem a divergência de população de arraias em grande parte. Um estudo sugere que as arraias não podem ser estruturadas sobre escalas de centenas, mesmo quando a marcação sugere muitos movimentos menores na sua distribuição populacional (LE PORT; LAVERY, 2012).

2.2.1.1 Nível trófico

Aschliman e colaboradores (2012), realizaram estudos que envolvem a dieta dos Myliobatoide muitas vezes podem ser restritos às espécies individuais com comparações interespecíficas, centradas principalmente nos resultados obtidos a partir técnicas de análise partilhadas, ou seja, as comparações de Índice de Valores de Importância Relativa (IVRI). Como consequência, não se limita à compreensão de como as dietas de espécies que se relacionam umas com as outras e para as dietas de outros predadores. Nos estudos anteriores fizeram estimativas do comprimento total (CT) que foram positivas, mostrando, ainda moderada, a correlação com o máximo comprimento total. Estudos atuais não amostram uma correlação significativa

entre o tamanho do corpo para Myliobatoide (comprimento do disco). Este resultado foi atribuído em grande parte à variação morfológica exibidos em cada uma das respectivas subordens. Por exemplo, a largura do disco pode ser aproximadamente igual ao comprimento do disco nas famílias Myliobatoide, Dasyatidae e Urolophidae, enquanto largura disco no Gymnuridae e Mobulidae tem sido muitas vezes mais do que o dobro do comprimento do disco (ASCHLIMAN et al., 2012).

Da mesma forma, medidas de comprimento no total variam consideravelmente entre os gêneros de ambas subordens devido a grandes variações no comprimento da cauda relativa. Como consequência, a largura do disco e comprimento total, aparentemente não são necessariamente bons indicadores do tamanho do corpo dos batóideos. Este problema pode ser agravado pelo fato de que comprimento disco e, possivelmente, o melhor indicador do tamanho do corpo nas mantas, onde a massa do corpo, pode ser relacionada com os análises alimentares; especialmente para muitas espécimes (JACOBSEN; BENNETT, 2013)

O aumento do nível de informação sobre dietas das arraias tem visto uma mudança de amplas generalizações que as caracterizam como predadores para mais espécies das quantificadas nas avaliações alimentares. Os autores têm apresentado dietas padronizadas a fim de determinar o nível trófico para cada espécie e como estão relacionados a outros predadores de ordem superior. Uma análise holística de como elasmobrânquios influência nos ecossistemas regionais, amostra a ausência de síntese de informação considerável sobre a dieta disponível para arraias e há pouca informação sobre as suas relações tróficas (ALMEIDA *et al.*, 2010). A informação das espécies que habitam águas da plataforma continental a profundidades de 100 m em ambos ambientes tropicais é conhecida. Caracterizado pela presença de espécimes com habilidade para algumas das técnicas mais originais, captura de presas (JACOBSEN; BENNETT, 2013).

As espécies da bacia do rio Paraná, pertencentes ao gênero *Potamotrygon* (*P. falkneri* e *P. amandae*), amostram uma diversidade da dieta, dependente da faixa etária, de aproximadamente 14 itens, que incluem as classes Mollusca, Crustacea, Insecta e peixes, com predomínio em diversidade e abundancia dos insetos aquáticos (macroinvertebrados). Algumas espécies tais como *P. motoro*, consome principalmente organismos da ordem Ephemeroptera, enquanto *P. falkneri* consome em grande maioria animais das ordens Mollusca, Hemiptera e Trichoptera. *P. motoro*, mostrou consumo especializado de Ephemeroptera (Baetidae), enquanto *P. falkneri*

é mais generalizado. Além disso, existe uma correlação entre os itens alimentares e aspectos como o micro-habitats (que define a função do substrato) e o tipo de vegetação marginal (SILVA; UIEDA, 2007).

Um estudo específico *P. magdalena* (Bacia do Rio Magdalena-Colômbia) demonstrou que a espécie é consumidora primária, insetívora-detritívora de hábitos bentônicos (MALDONADO; RICHARD; USMA, 2008), porém posteriormente tem sido observado que a maior parte da matéria orgânica achada nestes espécimes pode ser por ingesta acidental (SAULINO; TRIVINHO-STRIXINO, 2014), ao sugar para capturar suas presas, como registraram em *P. orbigny* e *P. iwame*, (MORO; CHARVET; ROSA, 2012). Em consequência, analisando a dieta da espécie em função do micro-habitat ocupado (CASTELLANOS ROMERO et al., 2017), se sugere que *P. magdalena*, tem uma dieta especializada ao consumir mais insetos das famílias *Polymitarcyidae*, *Ceratopogonidae* e larvas destes, sem encontrar diferença temporal nem espacial dos recursos, a diferença *P. falkneri*, uma espécie proposta como generalista (Ephemeroptera: *Polymitarcyidae* e as suas larvas, seguidos pela Diptera: *Ceratopogonidae*, *Chironomidae* e as suas larvas, Odonata: *Aeshnidae* e ovos em geral), moluscos (opérculos e vísceras de gasterópodos) e detritos (partículas de sedimento e matéria orgânica no identificada) (SILVA; UIEDA, 2007).

A frequência de *Polymitarcyidae* nos conteúdos estomacais pode ser explicada pelas condições propícias para desenvolver-se, como águas mornas e com fundos arenoso ou argiloso; são um grupo bentônico abundante usado como indicador de águas limpas a mesotróficas. Pela sua parte, *Ceratopogonidae* consiste em uma família comum nas águas lânticas, charcos e lagos com material orgânico, cuja presença e abundância se traduz como indicador de águas mesoeutróficas; a sua aparição junto com a família *Aeshnidae*, como presa das arraias se explica, porquê estão associados às raízes de macrófitas, muito abundantes na Bacia média e baixa do Rio Magdalena (CASTELLANOS ROMERO et al., 2017; (RAMOS-SOCHA; GRIJALBA-BENDECK, 2011)

2.2.1.2 Taxas de crescimento e reprodução

O conhecimento de características de idade e crescimento permite a construção de modelos populacionais com base na idade e, juntamente com a consideração de outros aspectos da história de vida e taxas de remoção por pescas,

pode eventualmente levar a uma avaliação do estado da população de uma determinada espécie. Enquanto espécies-alvo têm sido muitas vezes intensamente estudadas, espécies de captura acessória são muitas vezes ignoradas. Estas espécies comercialmente sem importância, como as arraiais também são afetadas pelas pescas e informações sobre a sua história de vida é necessária como entrada para formular decisões de gestão da pesca. A arraia-dulciaquícola, que habita em fundos moles em zonas rasas e nas profundidades de 2 a 10 m é a espécie de elasmobrânquios mais abundantes nas capturas acessórias da pesca artesanal e redes de arrasto na América do Sul, e não tem qualquer valor comercial. Esta espécie, que se alimenta principalmente de insetos, tem mostrado uma forte sobreposição entre os sexos, dieta e classes de tamanho (MEJÍA-FALLA et al., 2014)

Esta espécie de vivíparo aplacentário pode atingir um máximo tamanho de 50 cm de largura disco (LD), seu tamanho mediano na maturidade é 11,5-11,8 centímetros LD em machos e 11,8-12,3 cm LD em fêmeas, em tamanho nascimento é 7,5-8,2 cm LD e 11,5-4,7 cm de comprimento total (macho e fêmea respectivamente), a sua gestação dura cerca de 3-4 meses, e o ciclo reprodutivo é quadrimestral e não estacional. Pela estação reproduzem-se espécies que geralmente têm datas de nascimento relativamente bem definidas e, portanto, a idade dos indivíduos pode-se determinar com precisão razoável. Em contraste, as espécies de reprodução estacional podem ter vários picos reprodutivos ou se reproduzir durante o ano todo, conseqüentemente, a idade em que a primeira banda de crescimento é formada em uma vértebra é desconhecida. Portanto, a determinação da idade com base em bandas vertebrais de crescimento nestas espécies requer que os dados sejam ajustados, especificamente pela média do tempo entre os nascimentos e à formação da primeira banda de crescimento (MORO; CHARVET; ROSA, 2012).

A maioria dos estudos utiliza comprimento total, ainda outros padrões da métrica podem ser mais relevantes para algumas espécies. Embora a curva de crescimento von Bertalanffy tem sido mais extensivamente utilizada para descrever o crescimento em peixes, o uso de mais do que uma função de crescimento para caracterizar adequadamente o crescimento de uma dada espécie foi recomendado e utilizado em diferentes espécies de elasmobrânquios. No entanto, poucos estudos de elasmobrânquios têm utilizado multi-modelo de inferência, como o proposto por Katsanevakis (2006), para determinar um modelo de média de um conjunto de

parâmetros de modelos que incorporam incerteza que concorram na seleção de modelos (MEJÍA-FALLA et al., 2011).

2.3 TRANSCRIPTOMA DE ESTRUTURAS PRODUTORAS DE VENENOS DE PEIXES E OUTROS ANIMAIS COM PEÇONHA

A toxilogia relacionada com a genômica, foi ganhando força com as pesquisas de proteínas convergentes nos venenos animais, tal e como explicam os artigos com foco na evolução e recrutamento das proteínas de vários animais venenosos (centopeias, cefalópodes, caracoles, peixes, insetos, escorpiões, aranhas, répteis, lagartixas, serpentes, anêmonas de mar, entre outros); cuja concomitância inclui proteínas colipase, procineticina, CAP (do inglês: *catabolite activator protein*), quitinas, cistatina, defensinas, hialuronidases, lectina, lipocalina, peptídeo natriurético, peptidase S1, fosfolipase A2, esfingomielinase D entre outros (FRY et al., 2009).

Os mesmos tipos de proteínas Da peçonha também têm sido estudados nas secreções das glândulas de espécies hematófagas de invertebrados (como por exemplo, pulgas, sanguessugas, insetos sugadores, mosquitos e carrapatos) e vertebrados (morcegos hematófagos); o que tem permitido alguns autores, pelo grande número de similaridades entre as composições proteicas dos venenos convencionais e as secreções hematófagas, discutirem sobre a definição desse compostos (FRY et al., 2009). Simultaneamente a isto, o sequenciamento massivo de DNA complementar (cDNA do inglês *complementary DNA*), tem permitido aprofundar no transcriptoma, obtendo a reconstrução de transcritos a partir de tais dados que frequentemente baseiam-se em um genoma de referência, e por tanto não são adequados para amostras com um genoma de referência parcial ou inexistente (GRABHERR et al., 2011), conhecido como o sequenciamento '*de novo*'.

2.3.1 Transcriptoma da peçonha de Artrópodes

O grupo dos artrópodes compreendem mais de 800 mil espécies, superando todos os demais filos. Um grupo de invertebrados que podem se adaptar em diferentes ambiente. Alguns representantes incluindo insetos, miriápodes, aranhas e escorpiões são capazes de produzir peçonha como forma de proteção (LIU et al., 2012; BOUZID et al., 2013; HE et al., 2013).

2.3.1.1 Transcriptômica da peçonha de insetos

As formigas são insetos de um grupo zoológico muito diverso, com pouca informação disponível sobre a composição do seu veneno. Entre essas informações está a caracterização da expressão da espécie de formiga *Tetramorium bicarinatum*, 400 clones selecionados aleatoriamente da biblioteca de cDNA foram sequenciados e foi gerado um total de 364 etiquetas de sequência expressas de alta qualidade (ESTs). Com base nos resultados das pesquisas em banco de dados, usando a ferramenta BLAST, estas sequências foram agrupadas e reunidas em 83 *contigs* (22 sequências múltiplas) e 61 *singletons*. Aproximadamente 74% (267) dos *contigs* comparados, com *hits* BLASTx mostraram uma diversidade interessante, juntamente com uma abundância incomum de transcritos celulares relacionados à regulação da expressão gênica (29% da biblioteca total), refletindo a especialização da peçonha. Cerca de dezoito por cento das ESTs foram classificadas como compostos de veneno da ordem Hymenoptera, a maior parte representada por alérgenos (62% dos compostos de veneno total). Além disso, um elevado número de sequências (26%) não tinha semelhança com quaisquer sequências conhecidas. O estudo forneceu a primeira visão do cenário de informação gênica da glândula de veneno de *T. bicarinatum* que pode contribuir para adquirir conhecimento mais abrangente sobre a origem e diversidade funcional de proteínas de veneno entre as formigas e mais amplamente entre os insetos Hymenoptera (BOUZID et al., 2013).

2.3.1.2 Transcriptoma da peçonha de Miriápodes

As centopeias possuem em seu primeiro par de membros, glândulas de veneno rico em compostos com propriedades bioquímicas e farmacológicas diferentes. No entanto, a informação sobre as composições e funções de seus venenos é limitada. Um estudo, do veneno da *Scolopendra subspinipes dehaani*, do transcriptoma e proteoma, juntamente com ensaios da função biológica, resultou na obtenção de cerca de 1.500 clones independentes, (clonando 1122 sequências de cDNA de comprimento total), que codificam 543 proteínas diferentes, a partir de uma biblioteca de cDNA construída utilizando um par de glândulas de veneno de uma única espécie de centopeia (LIU et al., 2012).

Além das neurotoxinas, 40 proteínas/peptídeos foram purificadas e caracterizadas a partir de veneno bruto de *S. subspinipes dehaani*. O sequenciamento de aminoácidos N-terminal e os resultados de espectro de massa de 29 destas 40 proteínas ou peptídeos combinaram bem com os seus correspondentes cDNAs. As proteínas/peptídeos purificados apresentaram atividades farmacológicas diferentes, incluindo: atividade de agregação plaquetária, anticoagulante, fosfolipase A2, inibidora de tripsina, e dos canais de intercambio iônico. A maioria das sequências não mostrou semelhança significativa com outras sequências de proteínas depositadas na base de dados pública conhecida (LIU et al., 2012).

2.3.1.3 Transcriptômica da peçonha de aranhas e escorpiões

As aranhas consistem na maior população de organismos venenosos, existentes há mais de 300 milhões de anos. Como caçadoras ativas, elas paralisam e matam presas por injetar venenos destinados à caça (digestão) ou defesa. Os venenos de aranha são misturas complexas consistindo em uma variedade de toxinas com funções distintas. Várias toxinas têm sido utilizadas como sondas moleculares, em particular em estudos sobre canais iônicos e distúrbios neurológicos. Nos últimos anos, um número crescente de toxinas de aranha tem sido considerado como potenciais medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas, no entanto, a compreensão das aranhas e seus venenos ainda é limitada, o que pode ser parcialmente atribuído à falta de dados sobre genoma e transcriptoma de aranhas (HE et al., 2013).

A peçonha de aranha pode ser um grande “repertório” farmacológico composto de diferentes tipos de toxinas peptídicas bioativas; tal como é descrito no estudo feito por Jiang e colaboradores (2013); onde construíram uma biblioteca de cDNA de um par de glândulas venenosas de uma única aranha que caça peixes, *Dolomedes mizhoanus*. Um total de 356 etiquetas de sequência expressas de alta qualidade (ESTs) foram obtidas a partir da biblioteca de cDNA da glândula de veneno e analisadas (JIANG et al., 2013).

Estes transcritos foram ainda classificados em 45 *clusters* (19 *contigs* e 26 *singletons*); a maioria dos quais, codificando para toxina rica em cisteína. As ESTs que codificam 53 novos precursores de dessas toxinas, foram abundantes as transcrições nas glândulas de veneno da aranha *D. mizhoanus*, representando 76%

das EST totais, cujos precursores foram agrupados em seis famílias com base na identidade de sequência e na análise filogenética. São o maior conjunto de dados para esse único espécime de aranha. Os resultados podem contribuir para a descoberta de potenciais novas drogas e uma melhor compreensão da relação evolutiva da toxina de aranha (JIANG et al., 2013).

A aranha *Latrodectus tredecimguttatus*, conhecida popularmente como viúva-negra (porque mata ao macho depois da copula). No estudo de He e colaboradores (2013), onde sequenciaram DNA para construir um transcriptoma de glândula de veneno dessa aranha, resultou na identificação de 9.666 peptídeos e 480 proteínas de confirmadas; entre 34.334 sequências 'de novo' e 1.024 sequências de cDNA, na montagem, tradução, filtragem, quantificação e anotação. Análises funcionais extensas destas proteínas indicaram que os mRNAs envolvidos no transporte de ARN e *spliceosome*, tradução de proteínas, processamento e transporte foram altamente enriquecidos na glândula de veneno, o que é consistente com a função específica das glândulas de veneno, e em consequência da produção de toxinas. Além disso, identificaram-se 146 proteínas semelhantes às toxinas, formando 12 famílias, incluindo 6 novas famílias desta aranha em que a família α -LTX-Lt1a2 é primeiro identificada como uma subfamília da família α -LTX-Lt1a. As toxinas foram classificadas de acordo com suas bioatividade, em cinco categorias que funcionaram de forma coordenada. Pouca quantidade de informações relativas aos canais iônicos foi expressa em células de glândula de veneno, sugerindo um possível mecanismo de proteção contra o ataque de suas próprias toxinas. Forneceu-se um perfil de transcriptoma de glândula e estende nosso entendimento sobre toxinas de aranhas e o mecanismo de regulação para a produção dessas toxinas em quantidade de expressão de proteína (HE et al., 2013).

Em mais de 400 milhões de anos de história evolutiva, os escorpiões (Arthropoda, Chelicerata, Arachnida) desenvolveram um sistema de produção de peçonha eficiente como uma inovação importante. Sugere-se que as glândulas secretoras de peçonha evoluíram desde a primeira aparição de escorpiões no período Siluriano, usadas principalmente em atividades sofisticadas para capturar presas e defender-se contra predadores (MA et al., 2011).

O sistema (estrutura e mecanismo) produtor de veneno pode ter sido um determinante importante na sobrevivência bem-sucedida dos escorpiões, sem sofrer mudanças evidentes na aparência desde o período Siluriano. Interessantemente, a

evolução convergente se aliou a outras linhagens anormais com o sistema produtor de venenos, como caracóis, ouriços, serpentes e ornitorrinco; diferente de todos os outros animais peçonhentos, mesmo de seus parentes mais próximos da classe Arachnida, incluindo aranhas e carrapatos, os escorpiões têm a glândula de veneno, exclusivamente situado no telson (MA et al., 2011).

O primeiro transcriptoma do escorpião da Buthidae foi realizado da glândula de veneno do escorpião mexicano *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). Este estudo analisou 160 (ESTs) de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno (SCHWARTZ, et al., 2007). Outro trabalho desenvolvido para o desvelamento de componentes das espécies de outras espécies de escorpiões como as discrepâncias de *Tityus* através da análise de genes de uma biblioteca de Cdna, foi realizado por Ma e colaboradores (2011), com espécies de Buthidae, (*Lychas mucronatus* e *Isometrus maculatus*) e uma espécie de Euscorpiidae (*Scorpiops margerisonae*). Houve uma grande diversidade nas sequências de aminoácidos traduzidas desses transcritos para peptídeos e proteínas do veneno (MA et al., 2011).

Outro estudo da peçonha de escorpiões, descreve uma análise transcriptômica do escorpião mexicano *Centruroides noxius*, realizada com uma plataforma de pirosequenciamento, onde foram realizadas três repetições independentes, incluindo cada uma de três bibliotecas de cDNA diferentes construídas a partir de RNA extraído de todo o corpo do escorpião após a remoção do telson e da glândula de veneno, antes e depois da extração do veneno. Mais de 3.000.000 de *reads* foram obtidas e montadas em quase 19.000 isogrupos. Dentro das sequências específicas do telson, 72 isogrupos (0,4% de transcritos únicos totais) foram encontrados como sendo semelhantes a toxinas previamente relatadas em outras espécies de escorpiões, aranhas e anêmonas de mar. O *pipeline* de anotações também revelou a presença de elementos importantes da pequena máquina de processamento de RNA não codificante, bem como candidatos de microRNA. Uma análise filogenômica de genes essenciais concatenados evidenciou taxas de evolução diferencial nesta espécie, particularmente em proteínas ribossômicas e componentes de proteossoma. Além disso, a comparação estatística da abundância de transcritos antes e após a extração do veneno mostrou que 3% e 2% dos iso-grupos reunidos apresentaram maiores níveis de expressão na glândula ativa e recarregável, respectivamente. Essas análises dos transcritos, permitiram a descoberta de novos alvos farmacológicos e

biotecnológicos e descobriram várias respostas regulatórias e metabólicas na produção de veneno do escorpião (DELAYE et al., 2012).

Centruroides tecomanus, um escorpião endêmico mexicano do estado da Colima, que causa mortes humanas, foi estudo em um trabalho que descreve uma análise de proteoma obtida a partir de veneno de ordenha e, uma análise de transcriptoma a partir de uma biblioteca de cDNA, construída a partir de dois pares de glândulas de veneno deste escorpião, encontrou-se uma seleção aleatória de 162 clones, e foram identificadas 130 sequências de boa qualidade agrupadas em 28 *contigs* contendo, cada uma, duas ou mais *tags* de sequência expressas (EST) e 49 singletos com apenas um EST. A análise de sequências de aminoácidos deduzida de 53% das EST totais mostrou que 81% (24 sequências) são semelhantes aos peptídeos tóxicos conhecidos que afetam a atividade do canal de Na⁺, e 19% (7 sequências únicas) são semelhantes às toxinas específicas que agem sobre o canal de K⁺. Os 19%, 4%, 4%, 15% e 5% correspondem respectivamente a proteínas envolvidas em processos celulares, peptídeos antimicrobianos, componentes de veneno, proteínas sem função definida e sequências sem similaridade em bases de dados. Entre os genes clonados estão aqueles semelhantes às metaloproteinases (ROMERO-GUTIE; VALDEZ-VELA, 2013)

2.3.2 Transcriptoma da peçonha de moluscos

Segundo Pi e colaboradores (2006), os caramujos-do-cone estão atraindo a atenção científica crescente devido a sua diversidade sem precedente dos peptídeos canal-alvejados inestimáveis. Como possivelmente o maior e mais bem-sucedido gênero evolutivo de invertebrados, *Conus* também pode se tornar o sistema modelo para estudar a evolução das famílias multigênicas e da biodiversidade (PI et al., 2006). No trabalho, os autores analisaram um conjunto de 897 ESTs derivadas de um canal de veneno de *Conus litteratus* para iluminar o mecanismo de diversidade e evolução das conotoxinas. Quase metade destas EST representam as sequências codificadoras de conotoxinas, que foram agrupadas em 42 sequências de cDNA de conotoxina (sete superfamílias), não conhecidas até a data do estudo; sendo as conotoxinas de superfamília T o componente dominante. O perfil de expressão genética da conotoxina revelou que os transcritos são expressos em níveis diferentes, a divergência de sequências dentro de uma superfamília aumenta a partir do N para

o C-terminal da janela de leitura aberta e mesmo múltiplos peptídeos maduros diferentes em uma conotoxina da superfamília de genes. Além de identificar uma nova superfamília de conotoxinas com três resíduos de cisteína. (PI et al., 2006)

Os membros do gênero predatório, gastrópodes marinhos *Conus*, exibem uma variedade de dietas e, a capacidade de capturar presas está ligada a um veneno composto de neurotoxinas peptídicas, denominadas conotoxinas. No trabalho de Remigio e Duda (2008), foram identificados os transcritos da conotoxina de *Conus leopardus*, uma espécie de *Conus*, que se alimenta exclusivamente de hemicordados e comparou-se o transcriptoma de canal de veneno com o de outras quatro espécies de *Conus*, para determinar se uma mudança para uma dieta especializada está associada a mudanças na composição do veneno de esta espécie. Identificaram sete sequências de conotoxinas distintas de *C. leopardus* que parecem representar transcritos de sete loci distintos. Os níveis de expressão e a diversidade de conotoxinas expressas por *C. leopardos*, são consideravelmente menores do que as de outras *Conus*. Além disso, os produtos génicos de dois transcritos exibiram estruturas secundárias únicas que não foram previamente observadas a partir de outros *Conus*. Estes resultados sugerem que a transição para uma dieta especializada está associada com a redução no número de componentes expressos em venenos de *Conus* e que diversos venenos de *Conus* são mantidos em espécies com uma dieta diversificada (REMIGIO; DUDA, 2008)

Até o trabalho de Terrat e colaboradores (2012), a maioria dos estudos anteriores de *Conus*, focalizaram um número limitado de sequências, mas elas não deram acesso a um panorama completo de um canal de veneno inteiro; adicionalmente, os transcritos raros geralmente não foram identificados devido ao efeito de amostragem. O trabalho de Terrat e colaboradores (2012), apresentam os dados e a análise de um número maior de sequências obtidas a partir de um alto índice de uso de veneno de *Conus consor*; um caracol de cone piscívoro do Indo-Pacífico. Foi obtido um total de 213.561 (ESTs) com um comprimento de leitura médio de 218 pares de bases (pb). Estas *reads* foram reunidas em 65.536 sequências de ADN (*contigs*) contíguas e depois em 5.039 aglomerados (TERRAT et al., 2012).

Os dados revelaram 11 superfamílias de conopeptídeos representando um total de 53 novo-isoformas preditas (sequências de comprimento total ou quase comprimento total). Considerável diversidade de isoformas e grandes diferenças no nível de transcrição poderia ser observado entre as superfamílias de conopeptídeos.

As superfamílias A, O e M são as mais diversas; as isoformas da família A representam mais de 70% do coquetel de conopeptídeos (considerando todos os ESTs antes da etapa de agrupamento). Além das superfamílias e famílias tradicionais, podem ser detectadas transcrições menores, incluindo peptídeos livres de cisteína e ricos em cisteína, algumas delas apresentando novas classes de conopeptídeos (TERRAT et al., 2012).

Finalmente, vários conjuntos de transcritos correspondentes a proteínas recrutadas com frequência na função do veneno puderam ser identificados pela primeira vez no veneno do caracol-de-cone. O referido trabalho fornece um dos primeiros projetos de EST em grande escala para um canal de veneno de caracol de cone usando sequenciamento de nova geração, permitindo uma visão detalhada dos transcritos de veneno. Isto leva a uma definição expandida da atividade transcriptômica do canal de veneno do caramujo, que vai para além dos conopeptídeos ricos em cisteína. Por exemplo, este estudo permitiu a detecção de proteínas envolvidas na maturação e dobramento pós-translacional comum, e para revelar compostos classicamente envolvidos na hemólise e penetração mecânica do veneno na circulação da presa. Uma comparação posterior com dados de proteômica e genômica, conduzirão a um melhor entendimento da diversidade dos conopeptídeos e dos mecanismos subjacentes envolvidos na evolução dos mesmos (TERRAT et al., 2012)

O caracol-de-concha-de-peixe, *Conus geographus*, pode ser considerado o caracol mais mortal da Terra e na ausência de intervenção médica, 70% dos casos de picadas humanas são fatais (HU et al., 2012). Embora seu veneno seja conhecido por ser constituído um coquetel de pequenos peptídeos direcionados a diferentes canais iônicos e receptores, a maioria de seus constituintes, seus locais de fabricação, abundâncias relativas e como funcionam coletivamente em envenenamento permanece desconhecido. Utilizando sequenciamento de transcriptoma para elucidar sistematicamente o conteúdo do ducto de veneno de *C. geographus*, Hu e colaboradores (2012), dividiram em quatro segmentos o ducto para investigar os conteúdos de mRNA de cada segmento (HU et al., 2012).

Três tipos diferentes de canais de cálcio (cada um alvejado por peptídeos da peçonha) e pelo menos dois receptores nicotínicos diferentes parecem ser alvo da peçonha. Além disso, o componente de veneno mais altamente expresso não é paralisante, mas provoca desorientação sensorial e é expresso em um segmento

diferente do veneno que se acredita causar ruptura sensorial. Também identificaram várias novas toxinas de interesse para a pesquisa farmacêutica e neurocientífica. Em consequência, *Conus geographus*, tem perfis de expressão de veneno também sugerem uma camada sofisticada de padrões de expressão do conteúdo da peçonha dentro do canal, com componentes desorientadores e paralisantes expressos em diferentes regiões. Assim, a análise transcriptoma da espécie forneceu um quadro fisiológico para a compreensão da estratégia de envenenamento molecular deste caracol mortal (HU et al., 2012).

2.3.3 Transcriptoma da peçonha de répteis

Os répteis constituem um grupo de animais que possuem temperatura corporal constantes. Répteis incluindo as serpentes, possuem glândulas produtora de peçonha que podem causar mortes em humanos. A incidência de picada de serpente é um problema de saúde pública, especialmente em populações rurais de muitos países. As serpentes peçonhentas possuem um dos mais sofisticados “sistemas de armas integradas” no mundo natural. O grupo mais complexo de serpentes (superfamília Colubroidea), corresponde a mais de 80% das 2.900 espécies de serpentes descritas atualmente, e contém todas as espécies peconhentas conhecidas (ZELANIS et al., 2012).

2.3.3.1 Transcriptoma do peçonha de serpente

As glândulas da peçonha das serpentes evoluíram uma vez só, há 60-80 milhões de anos, com um extenso "ajuste evolutivo" posterior. A evidência provém da morfologia comparada, a embriologia, assim como da homologia das glândulas secretoras de veneno de diferentes famílias colúides; a distribuição destas glândulas em todo o espectro das famílias "colúbridas", as análises filogenéticas das sequências de toxinas, os colmilhos maxilares e a glândula do veneno, são uma sinapomorfia colubroide (FRY, 2005).

No estudo desenvolvido por Fry (2005), foi realizada uma análise filogenética da toxina e das proteínas relacionadas, para reconstruir a história evolutiva do proteoma da peçonha de serpente. Este autor demonstrou que as toxinas das serpentes teriam surgido de eventos de associação de genes das famílias de

proteínas: acetilcolinesterase, ADAM (desintegrina/metaloproteinase), Complemento C3, crotalina, defensina, cistatina, endotelina, fator V, fator X, kallicreína, inibidor da proteinase, L-amino oxidase, lectina, peptídeo natriurético, fator de crescimento nervoso, fosfolipase A2, ryanodina, fator de crescimento endotelial vascular e proteína ácida de soro/secretor leucoproteinase. Encontrou-se que os eventos de associação de genes codificadores de toxinas ocorreram pelo menos 24 vezes na evolução da peçonha e, duas destas derivações das proteínas (associada a CRISP e toxinas da callicreína), parecem ter sido na realidade o resultado das modificações das proteínas salivares existentes no lugar dos eventos de recrutamento de genes (FRY, 2005).

Todos os tipos de toxina de serpente ainda possuem a bioatividade das proteínas ancestrais, em pelo menos algumas das isoformas da toxina. Embora, este estudo demonstrou que os tipos de toxinas, onde a proteína ancestral era extensamente dobrada pelas cisteínas, foram os que floresceram como novas famílias de múltiplos genes de toxinas, funcionalmente diversas (FRY, 2005).

Bothrops jararaca, por exemplo, é responsável por muitos acidentes ofídicos no Brasil e estudos anteriores demonstraram que a atividade farmacológica exibida pela sua peçonha exibe mudanças ontogenéticas significativas e no estudo do proteoma da peçonha apresenta uma variação considerável na transição de recém-nascidos a adultos, que é associado com mudanças na dieta de presa ectotérmica no início da vida até a presa endotérmica na idade adulta (ZELANIS et al., 2012). Além disso, o antiveneno, que é produzido pela imunização com veneno de animais adultos, é menos eficaz para neutralizar o veneno de recém-nascidos. Por outro lado, as transcrições das glândulas de veneno das serpentes recém-nascidas são pouco conhecidas, porque todos os estudos transcriptômicos foram realizados utilizando micro RNA (mRNA) de espécimes adultas (ZELANIS et al., 2012).

Em consequência, as bibliotecas de cDNA da glândula da *B. jararaca* obtidas, permitiram avaliar em forma diferencial a variabilidade demonstrada para o transcriptoma do veneno, e as atividades farmacológicas correlacionadas com as diferenças na estrutura dos peptídeos e proteínas de toxinas. A análise revelou que a variabilidade no transcriptoma da peçonha de *B. jararaca* é quantitativa, como foi evidenciado pelo elevado teor de metaloproteinases nas glândulas de veneno do recém-nascido. Além disso, a variabilidade é também caracterizada pela diversidade estrutural dos precursores de metaloproteinases encontradas em recém-nascidos e adultos. No transcriptoma do animal adulto, no entanto, o teor de precursores de

metaloproteinases diminuí consideravelmente o número de transcritos de serino-proteases, lectinas de tipo C e bradicinina. A comparação do teor da codificação das toxinas (por EST) em glândulas de veneno de machos e fêmeas apresentou algumas diferenças quantitativas entre os sexos. Além disso, demonstraram uma mudança substancial nas transcrições de toxinas no desenvolvimento de serpentes e uma classe forte de relação entre metalo-proteinase P-III/P-I que estão correlacionados com a evolução da complexidade do proteoma da peçonha e as atividades farmacológicas (ZELANIS et al., 2012).

Os venenos de serpente geralmente mostram variação das sequências quantitativamente dentro e entre espécies. Mudanças que ocorram dentro das espécies, especialmente nas cascavéis de Mojave (*Crotalus scutulatus*), América do Sul (*C. durissus*) e Ilha da Madeira (*C. horridus*), resulta em algumas populações com venenos nefrotóxicos extremamente potentes sem os efeitos hemorrágico típico da picada da cascavel e para maior compreensão foi sequenciado o transcriptoma da glândula de veneno da *C. horridus* (norte da Flórida) e foi comparado com o transcriptoma da *C. adamanteus*, uma espécie com um veneno de cascavel mais típico (ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013).

Em conexão com a transcrição da peçonha de *C. adamanteus*, era composta principalmente de metaloproteinases de peçonha de serpente do tipo C, lectinas, a serina proteinase do peçonha da serpente e miotoxina-A, enquanto a toxina de *C. horridus*, cuja transcrição foi muito mais simples em composição, era composta basicamente de proteinases quase inteiramente representadas pela serina-proteinase, fosfolipase e peptídeos natriuréticos e potenciadores de bradicinina tipo C. Em *Crotalus horridus* ficou evidenciado a falta de expressão significativa de metaloproteinases, lectinas hemorrágica tipo C; famílias de toxinas envolvidas na expressão diferencial, pela perda de clados de toxinas dentro das espécies, além das pronunciadas diferenças dos genes parálogos altamente expressos dessas toxinas em outras espécies. Os padrões de expressão de genes não-toxina foram conservados entre espécies, apesar das grandes diferenças na expressão da toxina (ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013).

Nestes resultados que representam a primeira comparação completa, com base em sequências entre espécies de peçonhas de serpentes, revelam em detalhes a rápida evolução das peçonhas em grupos diferentes. Verificou-se que há diferença nas propriedades de peçonha, como resultado de alterações significativas nos níveis

de expressão de genes de toxina, diferenciação e perda de expressão da família de genes, em que as alterações parálogas dentro das famílias de genes que foram expressos em níveis elevados e maiores taxas de substituição relativas a toxina e não toxinas. Estas alterações maciças nos genes do peçonha, enfatiza a instabilidade evolutiva e flexibilidade desta função ecológica crítica (ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013).

Na montagem e análise de novo do transcriptoma da glândula de peçonha da serpente coral oriental (*Micrurus fulvius*), foram identificados 1.950 transcritos de não-toxina e 116 transcritos de toxina. Estas transcrições responderam por 57,1% do total de *reads*, com toxinas representando 45,8% do total de *reads*. As fosfolipases A2 e as toxinas com três ramificações foram mais abundantes na análise da expressão, representando 86,0% da peçonha. Um total de 15 famílias de toxinas foram identificadas, revelando a complexidade da peçonha anteriormente desconhecida das serpentes de coral do Novo Mundo. As toxinas exibiram altos níveis de heterozigosidade em relação às não-toxinas, e a sobredominância pode favorecer a duplicação de genes levando à fixação de alelos vantajosos (MARGRES et al., 2013).

A expressão de transcritos da fosfolipase A2 foi uniformemente distribuída ao longo da classe enquanto a expressão de toxina de três ramificações foi pouco frequente, e as análises filogenéticas indicam que a divergência de toxina pode ter ocorrido após a especiação. A seleção positiva foi detectada em três das quatro classes de toxinas mais diversas, sugerindo que a diversificação da peçonha é guiada pela seleção direcional recorrente. Em suma, a duplicação de genes de toxina pode ser conduzida por vantagem heterozigótica, uma vez que a frequência de loci de toxina polimórfica foi significativamente mais elevada do que a de não toxinas. A diversificação entre as toxinas pareceu acompanhar a especiação refletindo a adaptação específica da espécie, e essa divergência pode estar diretamente relacionada aos turnos da dieta e é sugestiva de uma corrida harmônica coevolucionária (MARGRES et al., 2013).

As abordagens de alto rendimento baseadas em pirosequenciamento, foram recentemente aplicadas ao estudo de peçonhas de serpentes para dar as caracterizações mais completas dos genes expressos em glândulas de peçonha ativo e que fornecem uma caracterização muito distante dos genes expressos durante a produção de peçonha (ROKYTA et al., 2012).

A montagem 'de novo' e a análise do transcriptoma da glândula de peçonha de uma serpente de cascavel diamante oriental (*Crotalus adamanteus*) com base em 95.643,958 pares de *reads* (Illumina), resultaram em 123 sequências únicas de codificação de toxinas identificadas, que se agrupam em 78 grupos com menos de 1% de divergência de nucleotídeos em 2.879 sequências únicas de codificação de não toxinas. As sequências de toxina representaram 35,4% do total de *reads* e as sequências de não-toxina para um adicional de 27,5%. A toxina mais expressa foi uma pequena miotoxina relacionada à crotamina, que respondeu por 5,9% do total dos *reads*. As metaloproteinases de peçonha de serpente representaram a maior porcentagem de leitura de mapeamento para uma classe de toxinas (24,4%), seguido de lectinas de tipo C (22,2%) e serina proteinases (20,0%). As mais diversas classes de toxinas foram as lectinas de tipo C (21 aglomerados), as metaloproteinases de peçonha de serpente (16 aglomerados) e as serino-proteinases (14 aglomerados). Os transcritos de não-toxina de alta abundância foram predominantemente aqueles envolvidos no dobramento e na tradução da proteína, consistente com a função secretora do tecido (ROKYTA et al., 2012).

2.3.4 Transcriptoma das estruturas de veneno de peixes

Alguns peixes peçonhentos são capazes de produzir moléculas com alto potencial biotecnológico incluindo peçonhas de arraias. As arraias de água doce, muito comuns nos rios e pantanais no Brasil e na Colômbia, onde quase todos os estudos; representam um item de importância epidemiológica, pelos aspectos clínicos dos pacientes lesados pelos ferrões (dor intensa é o sintoma mais evidente, além da necrose cutânea, observada em alta porcentagem das vítimas) (TARTAR *et al.*, 2013).

2.3.4.1 Transcriptômica das estruturas de veneno de arraias

As arraias de água doce (Potamotrygonidae) têm uma distribuição restrita aos sistemas de água doce da América do Sul; podendo-se encontrar nas bacias principais e sub-bacias do Orinoco, Maracaibo, Magdalena, Atrato, Essequibo, Oyapok, Maroni, Corantijn, Amazonas, Rio Negro, Guapore, Tapajo, Parnaíba, Cuiabá, Paraná, Paraguai, Uruguai, Rio De La Plata (GARCIA et al., 2015). Colômbia, possui 11 espécies relatadas para a família, distribuídas nas bacias do Orinoco,

Amazonas, Magdalena do Caribe e Maracaibo, onde este grupo compartilha as características biológicas de outros elasmobrânquios (fecundação interna, baixa fecundidade e crescimento lento) e seu ciclo reprodutivo depende das mudanças das variáveis ambientais no ciclo anual no seu habitat (GARCIA et al., 2015).

As mudanças podem ser causadas por baixas ou altas nos fluxos hídricos, aumento da poluição e destruição do habitat. Pouco se sabia sobre a história de vida de Potamotrygonidae e essa falta de informação adequada sobre a maioria das espécies desta família torna difícil avaliar seu papel no ecossistema e sua gestão. Tudo isto torna este grupo mais vulnerável do que os seus congêneres marinhos, especialmente pelas atividades antrópicas, incluindo a sobre-exploração comercial (GARCIA et al., 2015).

Em uma análise por SDS-PAGE, o extrato de veneno de arraia pintada (*Potamotrygon falkneri*) feito por HADDAD-JR e colaboradores (2004), apresentou uma banda principal de aproximadamente 12 kDa. Vários outros componentes distribuídos entre 15 e 130 kDa, foram detectados no extrato de veneno. Muitos componentes com massa molecular acima de 80 e 100 kDa têm atividades gelatinolíticas e caseinolíticas, respectivamente. A atividade da hialuronidase foi detectada apenas num componente em torno de 84 kDa no extrato de veneno de *P. falkneri*. Esses resultados demonstraram que a presença dessas enzimas poderia explicar parcialmente os quadros clínicos locais apresentados por pacientes feridos pela arraia de água doce (HADDAD JR, et al., 2004).

Garcia e colaboradores (2015) com o objetivo de investigar as relações sistemáticas entre gêneros e espécies pertencentes a família Potamotrygonidae por meio de análises de três regiões de genes mitocondriais, encontraram três marcadores moleculares mitocondriais COI, Cytb e ATP6 foram amplificados e sequenciados. A monofilia dos quatro gêneros em Potamotrygonidae foi confirmada e as relações filogenéticas entre os membros do gênero *Potamotrygon* foram parcialmente resolvidas por meio dos resultados obtidos com o marcador molecular Cytb, que parece oferecer um bom ponto de partida para diferenciar gêneros e espécies, fornecendo uma ferramenta que poderia ser usada para *barcoding*. As análises separaram ao gênero *Paratrygon*, e as espécies de *Potamotrygon magdalenae* e *P. motoro*, efetivamente (GARCIA et al., 2015).

Junto com os estudos de venômica, os perfis transcriptômicos têm sido utilizados para elucidar componentes de veneno animal, uma vez que são capazes de

fornecer informações moleculares sobre a biologia do animal e poderia ter aplicações biomédicas. Por esta razão, Gomes de Oliveira e colaboradores (2016) fizeram o primeiro transcriptoma de arraias do gênero *Potamotrygon*; elucidando o perfil transcriptômico das glândulas de veneno de duas diferentes espécies de arraias-de-água doce endêmicas da bacia Paraná-Paraguai no Brasil, *Potamotrygon amandae* e *Potamotrygon falkneri*. Usando RNA-Seq, identificaram transcritos específicos de espécies e proteínas sobrepostas na glândula de veneno de ambas as espécies. Dentre as transcrições relacionadas ao envenenamento, observou-se alta abundância de hialuronidases em ambas as espécies. Além disso, construíram modelos de homologia tridimensional baseados em vários transcritos de veneno identificados (JÚNIOR et al., 2016)

O estudo do transcriptoma das arraias pode ser desafiador, pela pouca informação sobre este organismo publicada na literatura, sendo as espécies de água doce da família Potamotrygonidae, pouco exploradas. Aqui, foram comparadas duas espécies de arraias, de acordo com seus prontuários transcriptômicos, mostrando enormes semelhanças entre eles. A única análise transcriptômica dos peixes cartilaginosos descritos até o ano 2015 foi executada com arraia-azul-manchado marinha, *Neotrygon kuhlii*. Após, no trabalho de Gomes e colaboradores (2016), o número total de sequências *contig* obtidas para *P. amandae* e *P. falkneri* foi elevado quando comparado ao transcriptoma de *N. kuhlii* previamente montado, o que resultou em apenas 4.584 *contigs*. Além disso, os dados da sequência fornecem muitas transcrições para o gênero *Potamotrygon*, quando comparados aos dados publicamente disponíveis da base de dados Genbank, onde apenas 255 sequências de nucleotídeos estão listadas para este gênero, principalmente de mitocôndrias. Além disso, na análise transcriptômica de *N. kuhlii*, não foram identificados fosfolipase, metaloproteinase ou hialuronidase. No estudo transcriptômico das arraias-de-água doce, o número de transcrições relacionadas às toxinas de veneno é muito mais significativo do que em *N. kuhlii*, o que pode ser devido a uma baixa cobertura de sequenciamento no estudo transcriptômico de *N. kuhlii*, ou talvez porque as espécies de arraia-de-água doce são mais ricas em veneno, toxinas, do que arraias marinhas (JÚNIOR et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Sabendo que a América do Sul possui uma vasta rede hidrográfica e uma extensa linha costeira com grande biodiversidade, especial atenção deve ser dada aos estudos com foco nos animais provenientes desses ambientes; o que pode ser relevante, para acrescentar às informações das espécies existentes, e no caso particular das arraias, a definição de características ecológicas diferenciais do gênero (morfometria e merística), e os aspectos ecológicos (organismos usados como fonte de alimento, condições ambientais favoráveis para elas viverem) (PASIAN *et al.*, 2009). Além disso, o potencial das arraias como fonte interessante de moléculas com potencial biotecnológico; bem como a caracterização transcriptômica podem melhorar os conhecimentos existentes sobre arraias, tanto no Brasil quanto na Colômbia, e permitir correlacionar esses fatores com a presença das espécies nos locais (ENZOR; WILBORN; BENNETT, 2011).

Em consequência, possibilita-se o conhecimento do mecanismo do ferrão desses animais que produzem um grande número de metabólitos, cujas combinações resultam em uma ampla variedade de moléculas complexas, como peptídeos e proteínas, com propriedades químicas e farmacológicas características, o que as fazem diferentes das apresentadas pelas peçonhas de animais terrestres.

Embora, os trabalhos com venenos de animais aquáticos ainda são escassos e pouco consistentes, principalmente considerando as arraias. Essa escassez de dados pode ser principalmente devido ao risco de captura do animal e dificuldade de obtenção do veneno e a sua escassa quantidade (THORSON; LANGHAMMER; OETINGER, 1988). O estudo do transcriptoma de arraias é relativamente novo, principalmente no caso das dulciaquicola, que de acordo com a literatura, é quase inexistente (JÚNIOR *et al.*, 2016).

4 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar a ecologia e aspectos moleculares de arraias dulciaquícolas do gênero *Potamotrygon*, comparando um novo transcriptoma do epitélio do ferrão da espécie colombiana *Potamotrygon magdalenae* (DUMÉRIL, 1985), com os transcriptomas obtidos das espécies brasileiras *Potamotrygon amandae* e *Potamotrygon falkneri*.

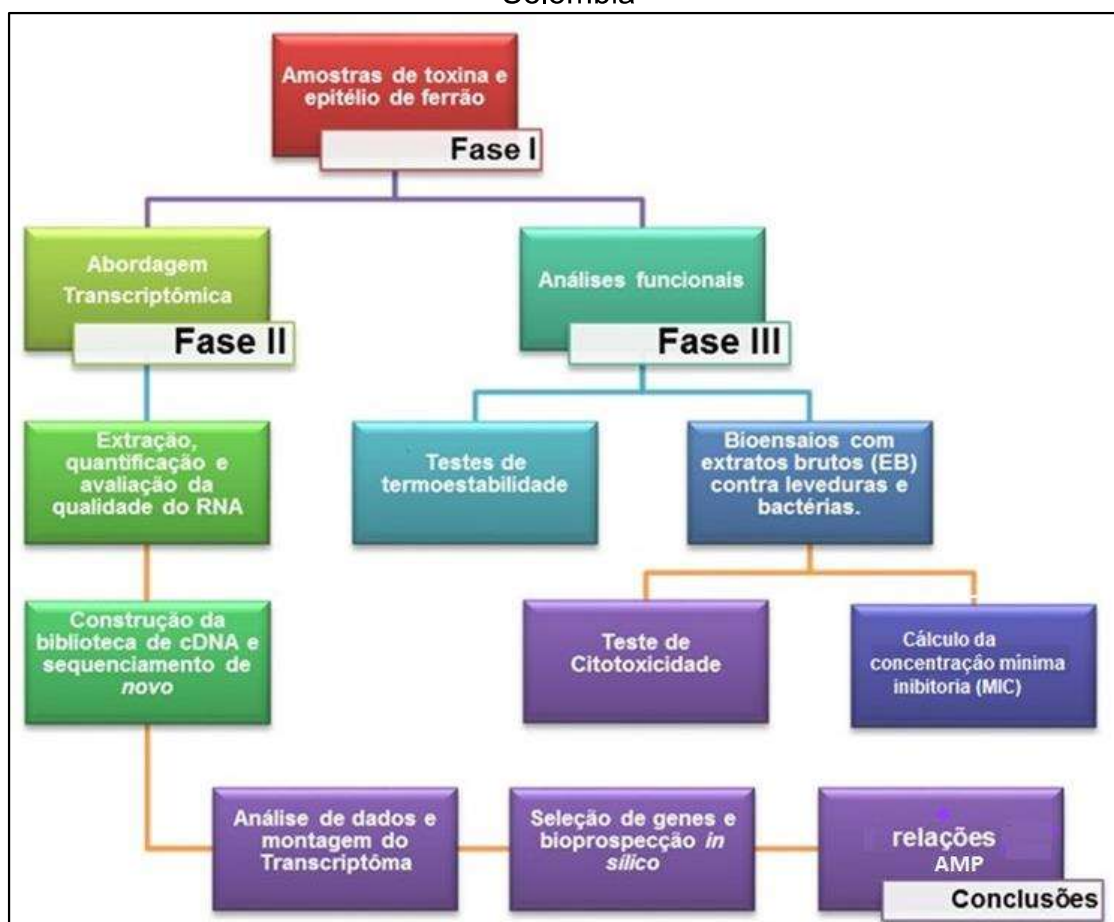
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO:

- a) analisar as relações entre condições ecológicas, pulso de inundação (seca e cheia de pântanos) e algumas características dos espécimes encontrados;
- b) caracterizar o transcriptoma do epitélio de ferrão da arraia dulciaquícola *Potamotrygon magdalenae* (DUMÉRIL, 1985) e comparar o transcriptoma funcional da espécie *P. magdalenae* com os transcriptomas existentes das arraias do mesmo gênero no Brasil: *P. amandae* e *P. falkneri*;
- c) realizar a seleção dos transcritos associados a moléculas de interesse biotecnológico (Peptídeos antimicrobianos), para comparar entre as espécies;
- d) avaliar o potencial antimicrobiano da peçonha (extratos brutos) obtidos das arraias do *Potamotrygon magdalenae*, contra bactérias e fungos causantes de infecções hospitalares, como aproximação inicial à bioprospecção.

5 MATERIAL E METODOS

O projeto foi desenvolvido de acordo com o fluxograma apresentado na figura 1.

Figura 1 - Localização do Embalse del Guájaro e nele, os pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no pantanal da Bacia baixa do Rio Magdalena-Litoral Norte da Colômbia



Fonte: próprio autor

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos dados ecológicos e merísticos das arraias são apresentados como a média \pm DP (desvio padrão) por tratamento e são representativos de dois ou mais experimentos independentes. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo desenho fatorial; levando em conta as fontes de variação: espaço e tempo (nos casos necessários) e como fatores relevantes, o sexo e a faixa etária dos espécimes. As variáveis morfométricas foram a largura do disco, comprimento do disco e peso total (Figura 3).

Para os dados ambientais foram feitas 3 repetições para cada uma das variáveis físico-químicas e testes de normalidade e homocedasticidade foram desenvolvidos a fim de selecionar o tipo de análises de variância (ANOVA), dois critérios para as comparativas e para os pontos únicos, seguido do pós-teste (Tukey) e após fizeram-se correlações, revisado por (CRAWLEY, 2012), para as variáveis físico-químicas e a abundância de arraias coletadas usando o software *Statgraphics Plus10*, para complementar as informações apresentadas pela abordagem de transcriptômica, relativas às diferenças entre as espécies do gênero pela localização geográfica.

Se as diferenças apresentadas nos resultados dos bioensaios foram significativos, aplicaram-se as análises estatísticas de ANOVA (prévio teste de normalidade e homogeneidade de variância) e pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$; $p < 0,0001$) com ajuda do software *Graphpad Prism 5*. Os níveis de significância estabeleceram-se em $P < 0,05$. Além disso, foi feito o cálculo das concentrações mínimas inibitórias (MIC) do veneno, baseados na equação de Gompertz, usando o *GraphPadPrism 5*; com valores de 6 diluições e quatro repetições para cada experimento realizado.

5.1.1 Fase I: Coleta de amostras

Os espécimes foram coletados efetivamente nos sistemas aquáticos do litoral norte da Colômbia (Figura 1), especificamente no “*Embalse del Guájaro*” (descrito no Anexo 4); onde foram obtidos um total de 92 espécimes vivos, usados para obter dados merísticos e, dos quais foram usados 38 para obter epitélio de ferrão; o que não causa sofrimento para o animal e depois foram devolvidos vivos para a água (Figura 2). Na área rural de Formosa (GO) (3 espécimes) no Brasil. Em ambos casos as coletas foram em áreas pouco profundas (até 6 metros), usando tarrafa. Outros locais de seleção no Pantanal (MS), não permitiram as coletas, evidenciando a dificuldade para encontrar os espécimes.

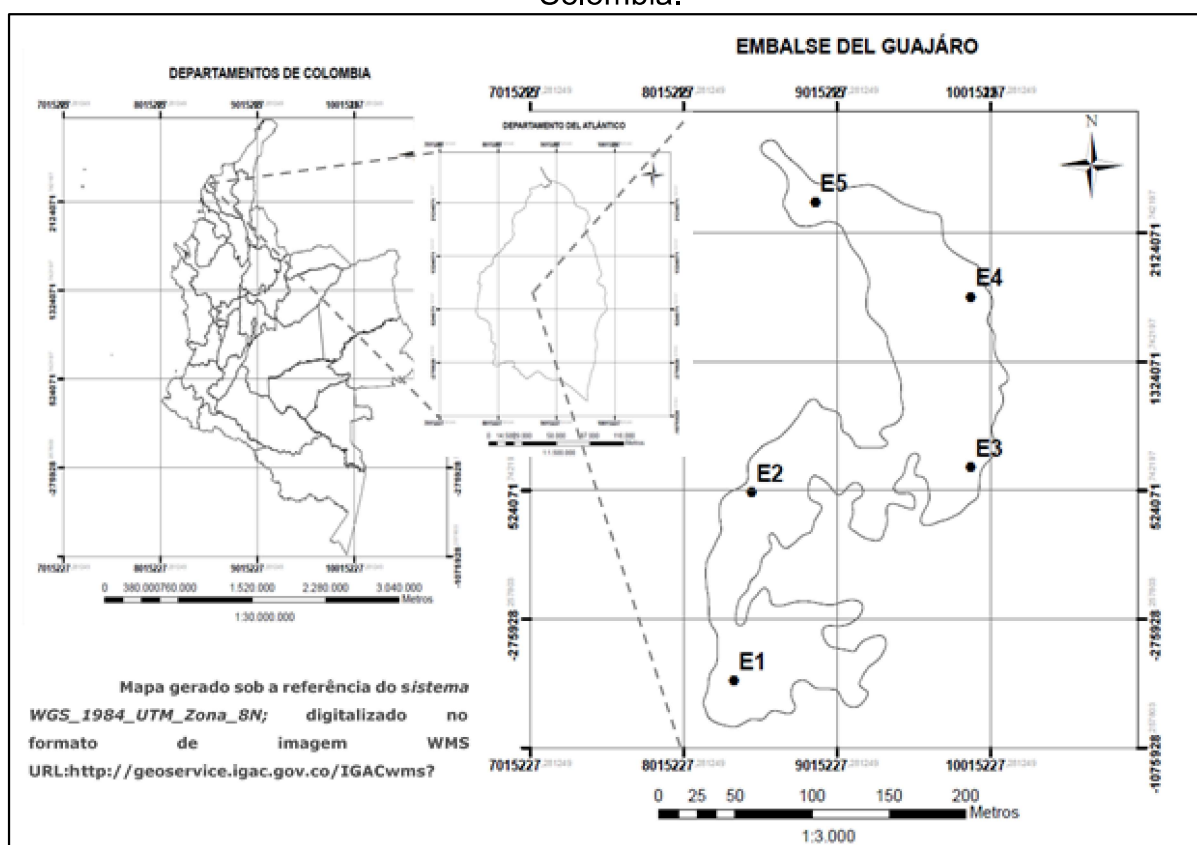
Os ferrões dos espécimes foram separados e assim, amostras das secreções e parte do epitélio foram conservadas em solução salina tamponada (tampão fosfato pH 7,0). As amostras do epitélio para análises do transcriptoma, foram conservadas em RNA Later® (GOMES, 2014).

Tabela 1 - Geoposição dos pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) dos espécimes no Embalse del Guájaro (Litoral Norte da Colômbia). Coordenadas planas, geradas sob o sistema WGS_1984_UTM_Zona_8N.

Pontos de coleta	Longitude	Latitude
E1	35.755	-360.283
E2	46.338	-241.220
E3	189.875	-226.007
E4	189.878	-122.157
E5	88.672	-62.626

Fonte: [URL:http://geoservice.igac.gov.co/IGACwms](http://geoservice.igac.gov.co/IGACwms)

Figura 2 - Localização do Embalse del Guájaro e nele, os pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no pantanal da Bacia baixa do Rio Magdalena-Litoral Norte da Colômbia.



Fonte: próprio autor

Todas as amostras foram mantidas no gelo seco até o traslado ao freezer à - 80°C no laboratório. Após coletar o material, foram obtidos os dados biométricos: Largura do disco (LD), comprimento do disco (CD) e peso total (PT) (Figura 3), registrados e feita a identificação da faixa etária e sexo dos espécimes (RAMOS-SOCHA; GRIJALBA-BENDECK, 2011), que logo foram devolvidos à água sem ferrão, o que não impede as funções normais do animal, e que restituem coo qualquer estrutura de queratina.

Figura 3 - Algumas medidas utilizadas pela merística das arraias.



Fonte: próprio autor

Adicionalmente, foram realizadas as aferições *in situ* (por triplicata) das variáveis ambientais dos sítios de coleta de acordo com os protocolos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012) (Tabela 2).

Tabela 2 - Métodos para análises físico-químicos da água.

VARIÁVEL	CONVENÇÃO	MÉTODO
Físicoquímicos		
Profundidade (cm)	Prof	SM Batimétrico 2130 B
Transparência (cm)	Tran	SM Batimétrico 2130 B
pH (Unidades. de pH)	pH	SM Eletrométrico 4500 H+B
Temperatura (°C)	T	SM Eletrométrico 2550B
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	OD	SM Modificação Ácida 4500-O C
Condutividade (Us.cm ⁻¹)	Cdv	SM Eletrométrico 2510 B
Hidrobiológicos		
Macroinvertebrados associados ao bêntos	B	SM 10500 A, B, C, D

Fonte: APHA, 2012.

SM: Protocolo do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

5.1.2 Fase II: Análise Transcriptômica

A análise de transcriptoma foi realizada a partir do RNA total extraído dos ferrões coletados de arraias de água doce.

5.1.2.1 Preparo da amostra e extração de RNA

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo de Trizol Reagente (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante para garantir a integridade do RNA. Após a extração, a concentração do RNA foi determinada por fluorometria utilizando o Qubit™, RNA Assay Kit (<http://products.invitrogen.com>) (GRABMÜLLER; MADEA; COURTS, 2015) e a qualidade do RNA foi verificada utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. O RNA total eluído foi precipitado utilizando cinco volumes de etanol 100% (v/v) e mantido à -80°C até o procedimento de construção da biblioteca de RNA.

5.1.2.2 Construção da biblioteca e sequenciamento de nova geração (RNA-Seq)

As amostras foram submetidas para a construção da biblioteca de GENEWIZ, Inc. A biblioteca de RNA foi preparada usando o kit de síntese de cDNA do PCR inteligente (BD Clontech), seguindo o protocolo do fabricante. Para evitar sobre-representação das transcrições mais abundantes, a biblioteca de cDNA foi padronizada usando o método de nuclease duplex específicos de caranguejo Kamchatka (ajustador do cDNA kit normalização, Evrogen). Após normalizar a

quantidade necessária, um lê emparelhado-final foi realizada em um poço (lane), de uma placa de sequenciamento de plataforma Illumina HiSeq 2500 (GOMES DE OLIVEIRA et al., 2016).

5.1.2.3 Pré-processamento de dados e montagem da transcriptoma

Com referência dos transcriptomas de *P. amandae* e *P. falkneri*, procedeu-se montar a transcriptoma de *P. magdalenae* sob condições semelhantes. Inicialmente, os dados brutos de sequenciamento Illumina, foram pré-processados usando o Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) como ferramenta para eliminar os adaptadores de sequência usando um arquivo Fasta que contém todos os adaptadores de Illumina conhecidos, e verificando as sequências das extremidades de todas as sequências de baixa qualidade também serão removidas. O assembly de transcriptoma será executado usando a metodologia através o assembler Trindade (GRABHERR et al., 2011), usando alta qualidade emparelhado-extremidade e single sequências como saída de Trimmomatic.

5.1.2.4 Análise de completude do transcriptômica de *Potamotrygon*

A fim de avaliar em termos de genes define, a integralidade do transcriptoma montado, a ferramenta BUSCO (SIMÃO et al., 2015), fornece medidas quantitativas baseadas nas expectativas evolutivas de conteúdo do gene ortólogos de cópia única a partir de genes selecionados do banco de dados (ZDOBNOV et al., 2017)

5.1.2.5 Redundância e geração da análise unigenes de *Potamotrygon*

A ferramenta de bioinformática chamada CD-sucesso (LI; GODZIK, 2006), permitiu ao cluster eliminar redundância sobre as transcrições, gerando ao final um membro representante do cluster que nesta abordagem é considerar o conjunto potencial de unigenes.

5.1.2.6 Anotação de transcriptoma funcional de *Potamotrygon*.

A análise funcional do unigenes iniciar com a constatação de região de codificação correspondente usando a ferramenta TransDecoder (Haas & Papanicolaou *et al.*, manuscrito em preparação), após a previsão de peptídeo ocorreu, a anotação automática executada usando o software on-line KAAS – servidor KEGG (MORIYA *et al.*, 2007), permitindo a geração de KO termos usados na análise comparativa entre as três espécies envolvidas neste estudo referência cruzada.

5.1.2.7 Análise *in silico* de peptídeos antimicrobianos no *dataset* do transcriptoma de *Potamotrygon*.

A partir da previsão de peptídeo de TransDecoder e desde que o comprimento médio do AMP está entre 20 a 100 bp e, usou-se o primeiro filtro da ferramenta bioawk parametrizada, para selecionar apenas peptídeos no intervalo mencionado. Após isto, o próximo passo consiste foi usar várias máquinas de aprendizagem de algoritmos (Máquina de Soporte vetorial SVM: CAMP3; *Random Forest* RF, *Artificial Neural Network* ANN, *Discriminant analysis* DA) (Waghu FH *et al.*, 2015); as quais vão atribuindo a cada sequência de valor probabilístico correspondente com os critérios de intervalos de 0 a 0,5 classificados como não AMP (NAMP) e valores de 0,6 a 1 como um AMP Confirmado. Após, todas as sequências classificadas como NAMP foram removidos do conjunto de dados bastante usando as ferramentas de Cdbfasta ou Seqkit (Shen *et al.*, 2016).

Depois disso, acessando o site CAMP3 (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>), (WAGHU *et al.*, 2014), foi possível usar a máquina de aprendizagem disponível com algoritmos de classificação, visando a identificação de peptídeos Antimicrobianos. A integração dos arquivos de saída com os potenciais candidatos sobre cada estratégia foi integrada em um único arquivo para realizar uma validação cruzada com uma média superior a 0,9, para ser considerado um candidato válido da AMP.

5.1.3 Fase III: Análise Funcional

Para obtenção da peçonha, o epitélio do ferrão foi removido e enxaguado em solução salina tamponada (Tampão fosfato (PBS) pH 7,0), para assemelhar o líquido extracelular e depois transportado em gelo seco até o laboratório, onde foi armazenado a -20° C até o uso.

5.1.3.1 Extração da peçonha, obtenção do extrato bruto (EB)

Esse protocolo, foi modificado do proposto por Gomes (2014), que sugere liofilizar até o uso dos extratos; devido às amostras foram serem usadas dentro das 24 horas seguintes à coleta.

5.1.3.2 Quantificação proteica das amostras

Após a obtenção do EB, o mesmo foi submetido a quantificação de proteínas para saber a concentração a ser usada nos bioensaios; seguindo o protocolo de quantificação *Qubit-Invitrogen*. A quantificação foi realizada por meio da leitura específica para proteína no *Qubit fluorometer*. A leitura de absorvância (ABS) das amostras é convertida em µg/mL.(INVITROGEN®, 2012).

5.1.3.3 Testes de termoestabilidade

Os EB obtidos (200µL) foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de água destilada e homogeneizados por *vortex* três vezes por 1 minuto. As amostras foram incubadas em banho-maria por 24 horas a temperatura de 60° C e 80°C e posteriormente esses extratos foram utilizados para os bioensaios antimicrobianos, que foram realizados em triplicata (LIMSUWANMANEE et al., 2014). Estimou-se uma perda de < 3% da atividade dos extratos submetidos a mais alta temperatura e contínuo o trabalho nos bioensaios antimicrobianos com os extratos submetidos a 60°C.

5.1.3.4 Bioensaios contra Bactérias e fungos

Os testes contra as bactérias e fungos foram realizados com uma concentração inicial de proteínas no EB de $0,7\mu\text{g/mL}$, em meio líquido LB (Luria-Bertani) e Sabouraud, respectivamente. Foi utilizado como controle negativo o meio de cultura sem microrganismos e como controle positivo, gentamicina $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ para bactérias e clotrimazol $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ para leveduras. O crescimento foi determinado por espectrofotometria em leituras temporais consecutivas utilizando um comprimento de onda de 600 nm, monitorado pelo leitor ELISA com termoagitação, a cada 30 minutos (37°C e 50 RPM). Foram utilizadas as estirpes de bactérias obtidas da *American Type culture Collection* (ATCC), Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709) e, *Enterococcus faecalis* (ATCC 14428) e Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27736), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC 11229), além de leveduras da espécie *Candida albicans*, para ter representatividades de os grupos mais comuns dentro das tipologias dos microrganismos patógenos (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008)

5.1.3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

O inóculo foi preparado fazendo uma suspensão direta em solução salina de colônias isoladas selecionadas de uma placa de ágar de 18-24 horas (Müller Hinton). A suspensão ajustou-se para que sua turbidez tivesse uma solução padrão de McFarland 0,5 correspondente a 1 a 2×10^8 UFC.mL⁻¹, em seguida essa suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller Hinton para atingir a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹. Foi utilizado como controle positivo o antibiótico gentamicina nas concentrações estabelecidas no documento NCCLS M-7-A6 (WALKER, 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2015).

6 RESULTADOS

Para a execução do trabalho de caracterização da população foram selecionados 38 espécimes correspondentes à espécie *Potamotrygon magdalенаe*, Duméril, 1865, dos coletados em 17 campanhas no *Embalse del Guájaro* (Colômbia), entre novembro de 2014 e novembro de 2016 (Figura 4).

Figura 4 - Descrição da espécie *Potamotrygon magdalенаe* (Duméril, 1865). Ilustração retirada do “Guía ilustrada para la identificación de especies de tiburones, rayas y quimeras de Colombia”.



Fonte: MEJÍA-FALLA, P. A. *et al.* 2011.

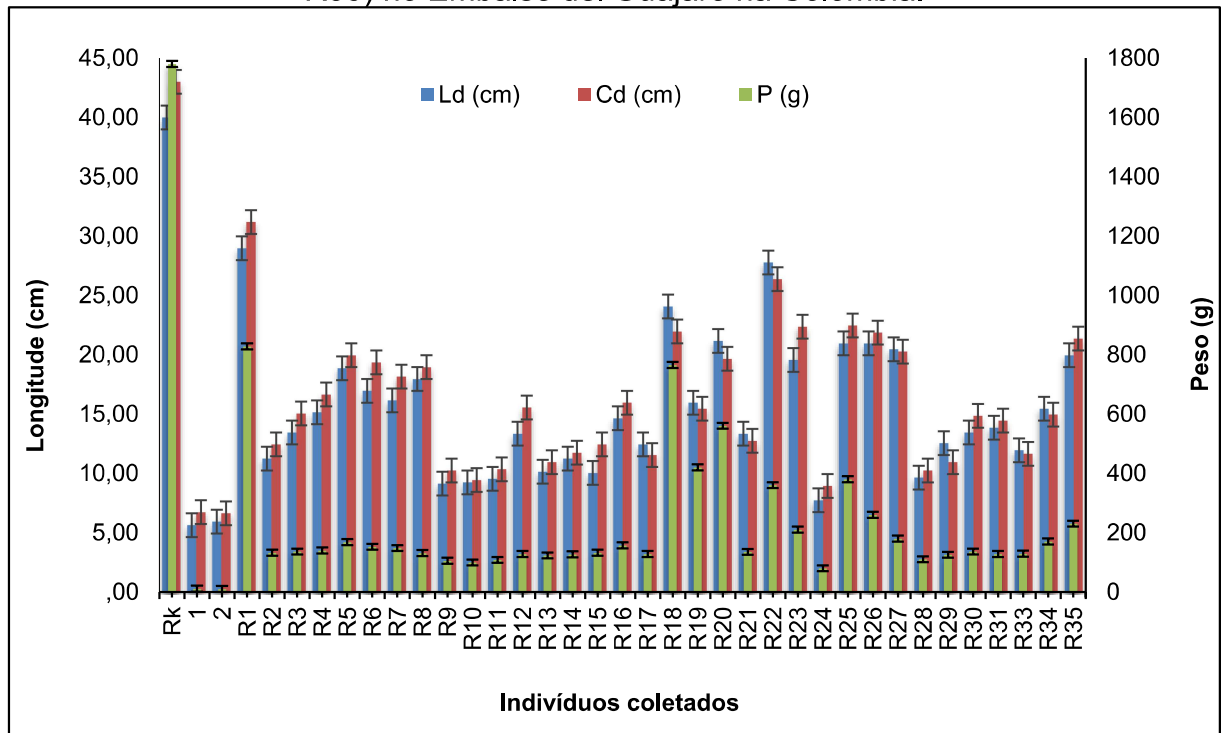
6.1 COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BIOLÓGICA COLETADA

Todos os indivíduos coletados foram medidos e pesados (Figuras 5 e 6), para obter a composição por sexo e estrutura por faixa etária de acordo com a proposta para a espécie (RAMOS-SOCHA; GRIJALBA-BENDECK, 2011), onde largura do disco é um fator relevante no estado de maturidade. Neste total, 27 espécimes correspondem a fêmeas (Figura 7) e 12 aos machos (Figura 8); com representação em toda a faixa etária.

Nos atributos merísticos, a largura do disco (LD) mínima foi de 5,7 cm e a máxima de 40 cm; enquanto o comprimento do disco (CD) mínimo foi de 6,7 cm e o máximo de 43 cm. O peso dos espécimes apresentou uma variação entre 10 e 1780

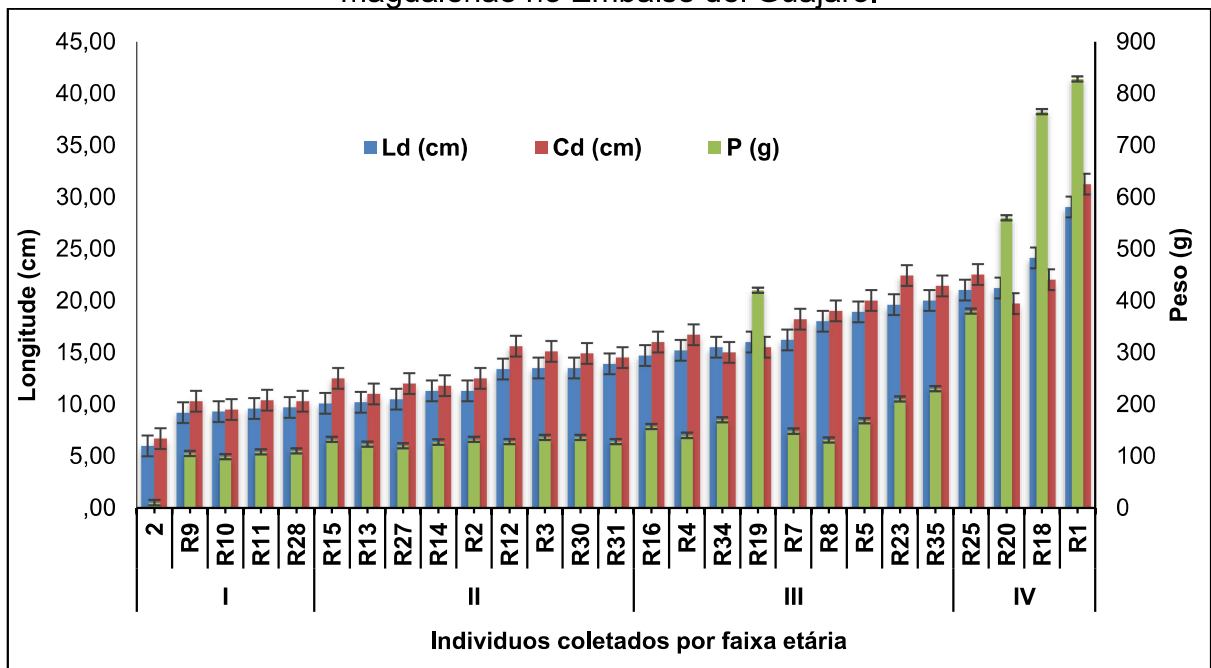
g; sendo os machos os indivíduos com os maiores tamanhos (Figuras 7 e 8), porém foram encontrados em menor número (proporção aproximada de machos e fêmeas 1:2).

Figura 5 - Atributos merísticos (Largura do disco Ld (azul), Comprimento do disco Cd (vermelho) e peso P (verde)) dos espécimes de arraias coletadas (Rk, 1, 2, R1-R35) no Embalse del Guájaro na Colômbia.



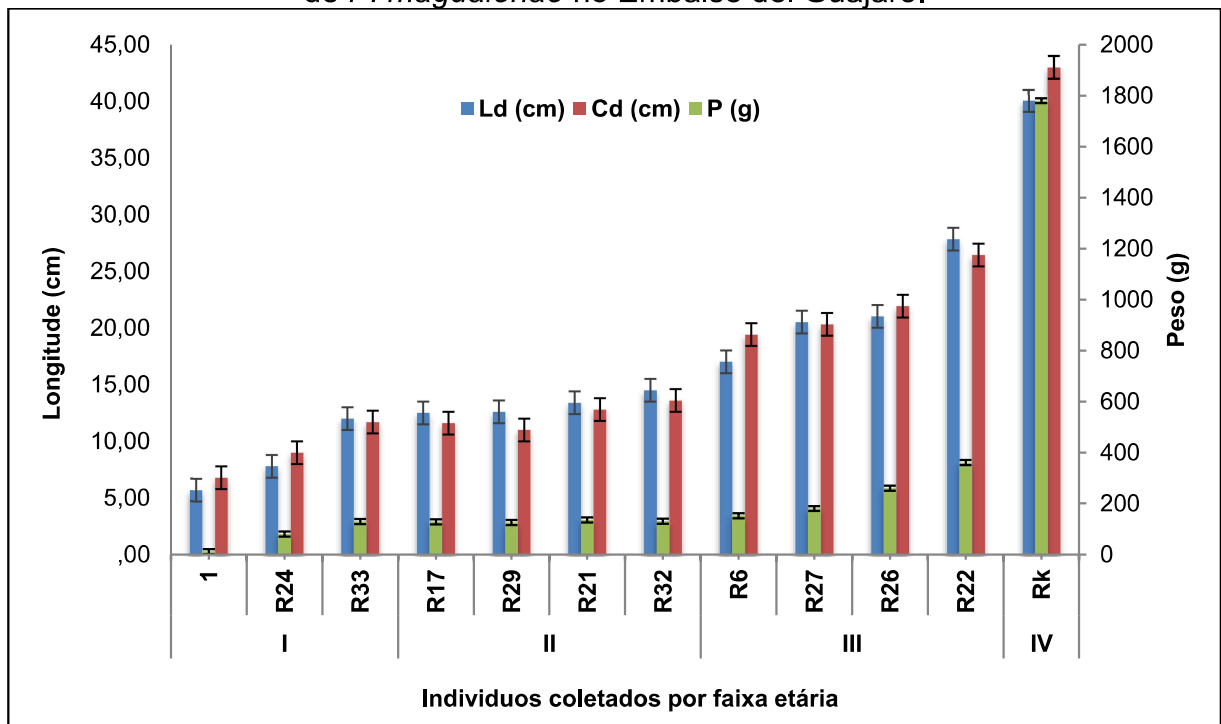
Fonte: próprio autor

Figura 6 - Estrutura da população de arrais por faixa etária (I: neonato; II: juvenil; III: adulto imaturo; IV: adulto maduro) das fêmeas coletadas na população de *P. magdalanae* no Embalse del Guájaro.



Fonte: próprio autor

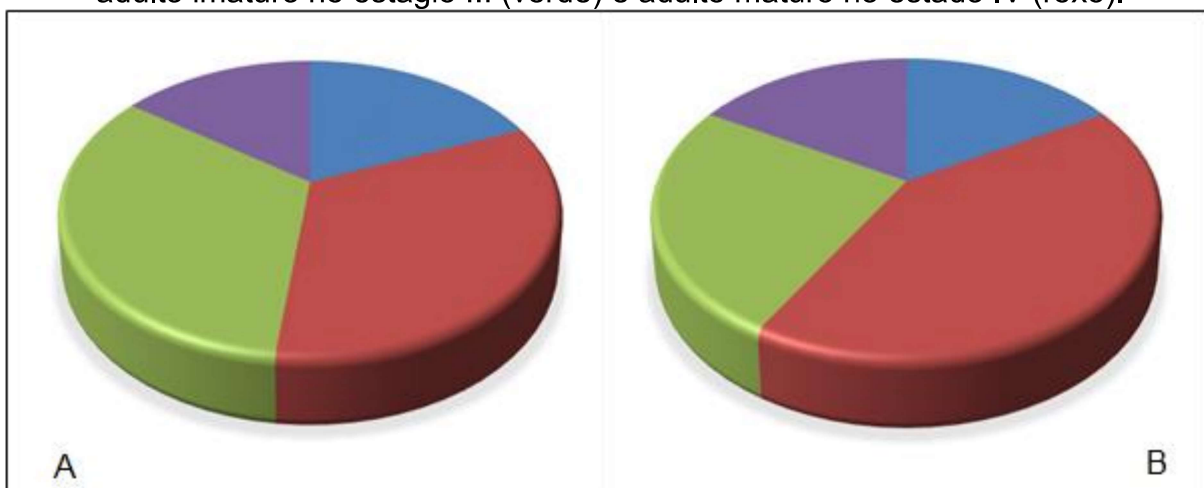
Figura 7 - Estrutura da população de arraias por faixa etária (I: neonato; II: juvenil; III: adulto imaturo; IV: adulto maduro) dos machos coletados (1, R24-Rk) na população de *P. magdalanae* no Embalse del Guájaro.



Fonte: próprio autor

Os estágios de maturidade foram representados no caso das fêmeas, em 18% para o estágio I, 33% para os estágios II e III e 14,8% para o estágio IV, enquanto os machos estiveram representados em 16% no estágio I; 41,7% num estágio II; 25% no estado III e 16,6 no estado IV (Figura 8).

Figura 8 - Distribuição porcentual na população coletada, da faixa etária das fêmeas (A) e os machos (B); neonatos no estado I (azul) juvenis no estágio II (vermelho), adulto imaturo no estágio III (verde) e adulto maturo no estado IV (roxo).



Fonte: próprio autor

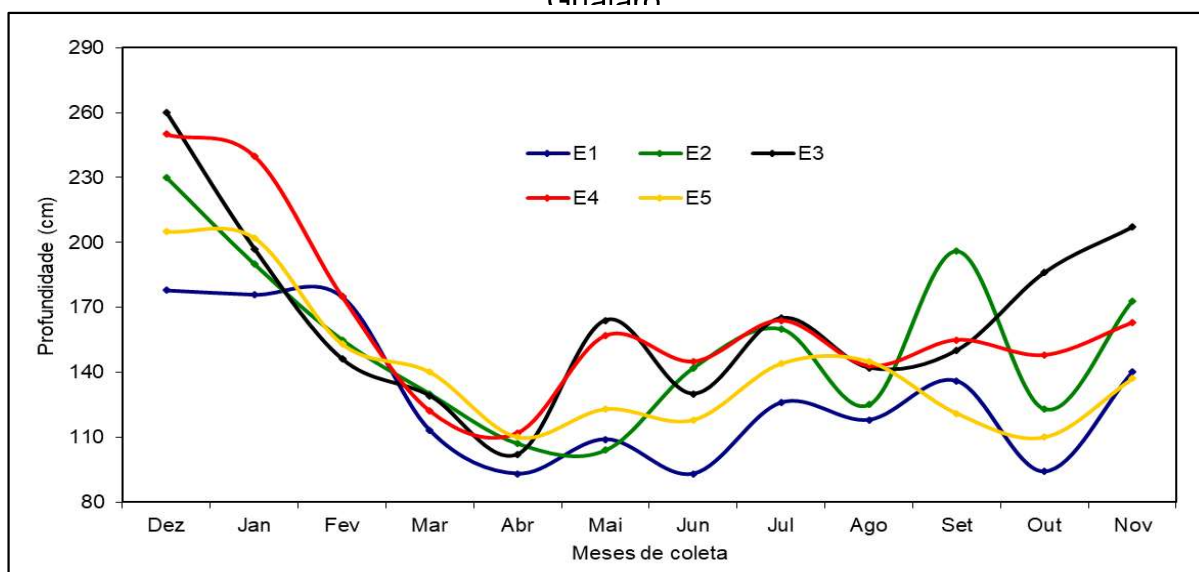
6.2 CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO SISTEMA AQUÁTICO

O meio onde habita o modelo biológico, neste caso as arraias, é relevante nas variações morfofisiológicas, que são em grande medida reflexo do transcriptoma, pelo que são determina-das algumas varáveis físico-químicas do sistema aquático, e os resultados amostraram um sistema lântico (Anexo 1), caracterizado por águas rasas (93-260 cm) permanentemente quentes (26-34) e com alta condutividade (420-2600 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); pelo contrário, a concentração do OD (2,2–12,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e a transparência (15-76 cm), têm muita variação no ano (Tabela 3). Embora sejam águas rasas, o sistema tem períodos de cheios e secos muito marcados pelas chuvas e a seca, o que gera uma flutuação nos níveis da água. Esses resultados foram publicados no ano 2017, como o primer produto deste trabalho (Anexo 4).

A variação do nível de profundidade não apresentou uma relação direita com a presença dos espécimes, que foram coletadas. As dimensões das colunas de água em E1, foram entre 93-178 cm; enquanto para as demais variou da seguinte forma E2, 104-230 cm; para E3, 102-260 cm; E4, 112-250 cm e E5, de 110-205 cm (Figura

9). Os valores máximos para todas as estações se registraram em dezembro, enquanto, que os mínimos se deram em abril e junho; para E1 e E2, em maio; para E3, o mínimo se registrou em abril, igualmente para E4 e para E5 em abril e outubro, demonstrando que a influência de volume da água alto do sistema nos períodos de chuvas e o volume de água baixo na seca, onde o nível de água favorece uma coleta mais fácil das arraias.

Figura 9 - Valores da profundidade (cm) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse do Guáiano

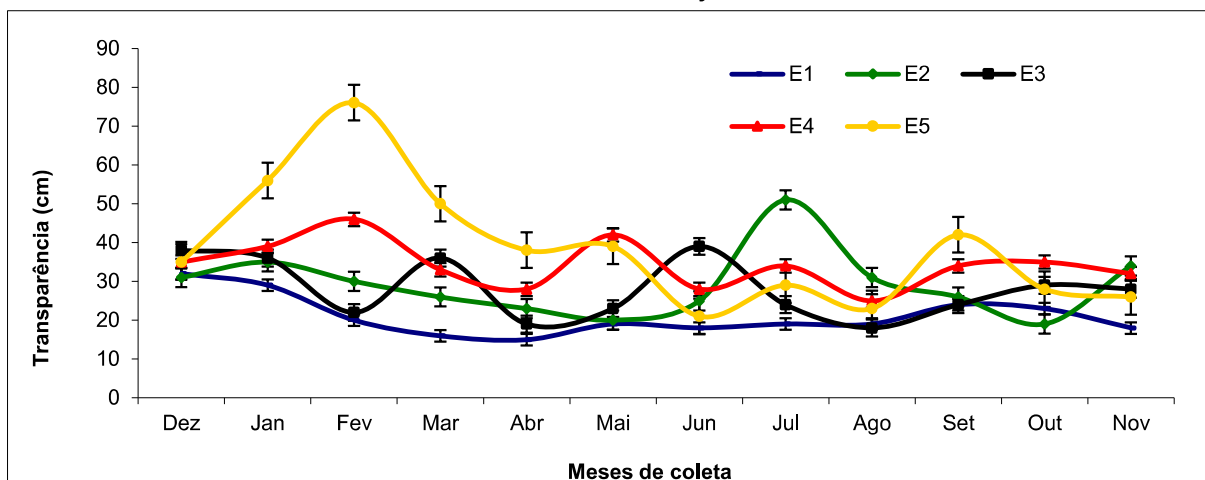


Fonte: próprio autor

Na análise estatística da profundidade, apresentou um sistema que consegue se diferenciar em zona norte de menor profundidade e a zona sul mais afundada, com a transição das duas na zona media do sistema (Anexo3) e essa condição se consegue vincular a facilidade de captura dos espécimes, que foram mais numerosos na zona norte.

Um comportamento similar de setorização do sistema, apresentou a transparência (Anexo 3), que exibiu valores para E1 numa faixa entre 15-32 cm, E2 varia entre 19-51 cm; na E3 foi de 18-39 cm; a E4 registrou valores entre 25-46 cm, enquanto que a E5 apresentou valores entre 21-76 cm. Os valores máximos foram reportados em dezembro para E1, para E2 em julho, na E3 em junho, na E4 e E5 em fevereiro. Os valores mínimos em abril para E1, para E2 em outubro, na E3 o valor mínimo se apresentou em agosto, na E4 em abril e junho; para E5 o valor mínimo se apresentou em junho também (Figura 10).

Figura 10 - Valores da transparência da água (cm) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.

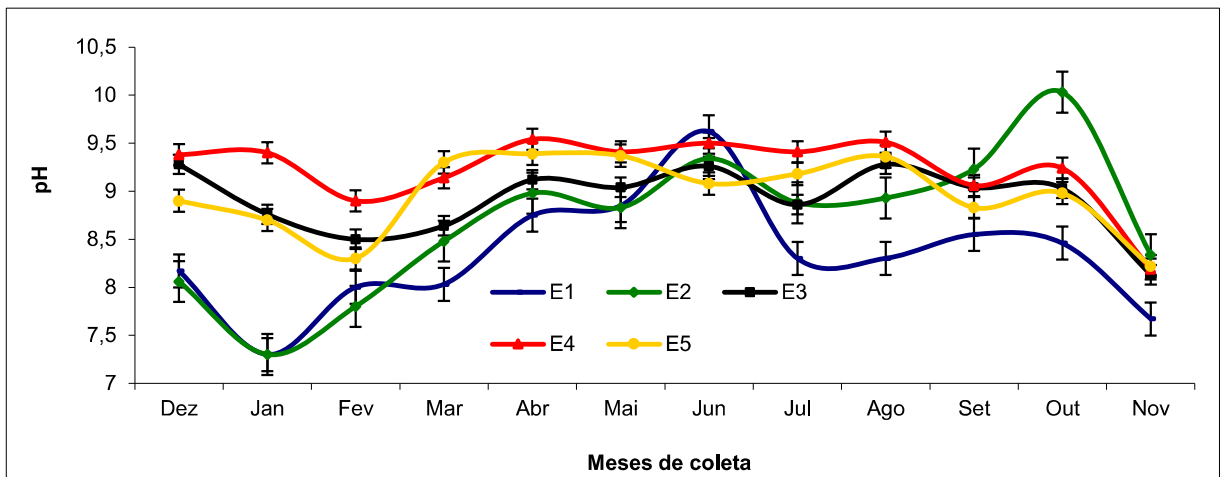


Fonte: próprio autor

O resultado do pH apresentou, uma faixa de 7,30-9,62 para E1, de 7,3-10,03 para E2, enquanto que para E3 foi só de 8,13-9,28, para E4 de 8,19-9,54 e de 8,22-9,39 para E5. Os valores máximos se apresentaram nos meses de junho e outubro para E1 e E2; para E3 foi obtido os picos em dezembro e agosto, pelo contrário, para E4 e E5 com picos em abril (Figura 11). Em quanto que a localização apresentou diferenças estatisticamente altas, com uma setorização do sistema aquático maior que as outras variáveis, confirmado que o sistema consegue se diferenciar por zonas (Anexo 3).

Os valores do OD deixaram ver uma faixa entre 4,35-9,4 mg. L⁻¹ na E1; de 3,05-9,23 mg.L⁻¹ para E2; enquanto que para E3 foi de 1,8-615 mg.L⁻¹; entre 3,4-10,6 para E4 e de 2,9-7.65 para E5. Os mínimos apresentaram-se nos meses de dezembro, janeiro e março para E3, E2 y E1, respectivamente, para E4 y E5 deram-se no mês de outubro. Os máximos, apresentaram-se em dezembro para E1, em setembro para E2, em fevereiro para E3, em janeiro para E4 e em março para E5 (Figura 12). A diferença das anteriores variáveis, o OD mantém nas mesmas condições as zonas norte e centro e só separa o sul com maiores valores (Anexo 3), possivelmente pela influência na abertura e fechada das exclusas no setor sur que permitem o ingresso do fluxo do rio Magdalena.

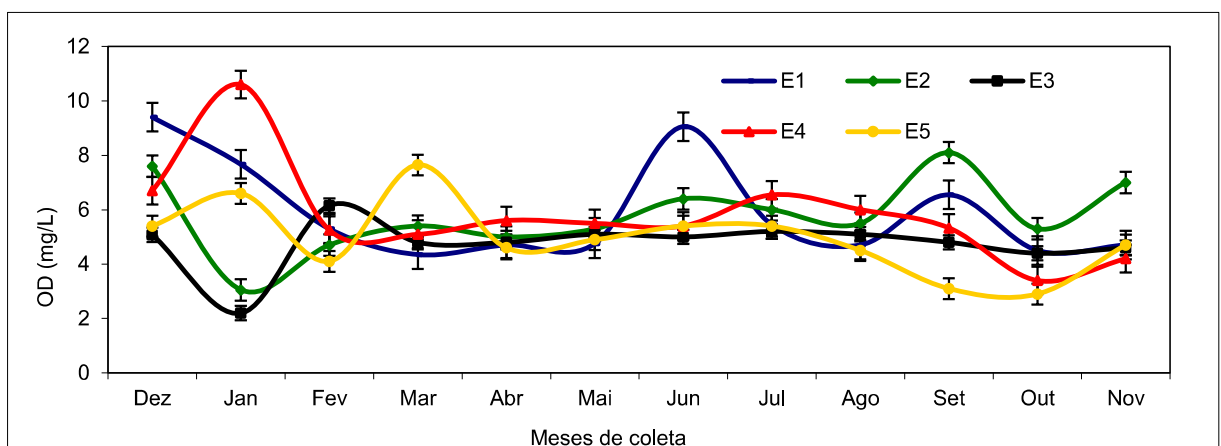
Figura 11 - Valores do pH durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro.



Fonte: próprio autor

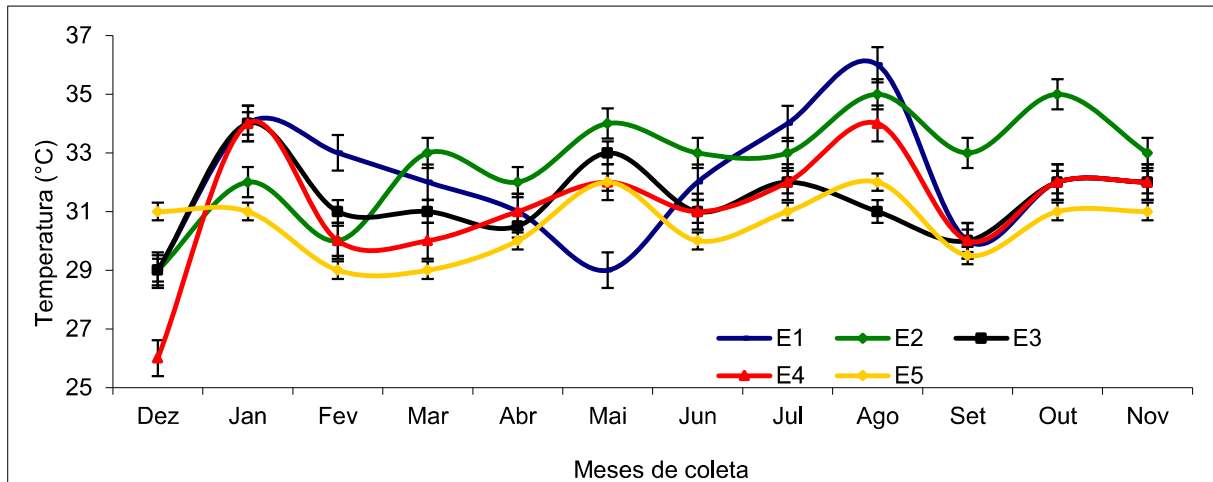
A temperatura da água, registrou valores entre 29-36 °C para E1; uma faixa similar para E2 com os valores entre 29-35 °C, para E3, de 29-34 °C; para E4 vai de 26-34 °C e para E5 entre 29-32 °C. Os valores máximos apresentaram-se em agosto para E1, a E2 e a E4; em outubro apresentou-se um segundo pico na E2; e em janeiro a E3 e a E4 amostram o seu máximo da temperatura na água, enquanto E5 apresentou-o em maio (Figura 13).

Figura 12 - Valores do OD (mg/L) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, , E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro



Fonte: próprio autor

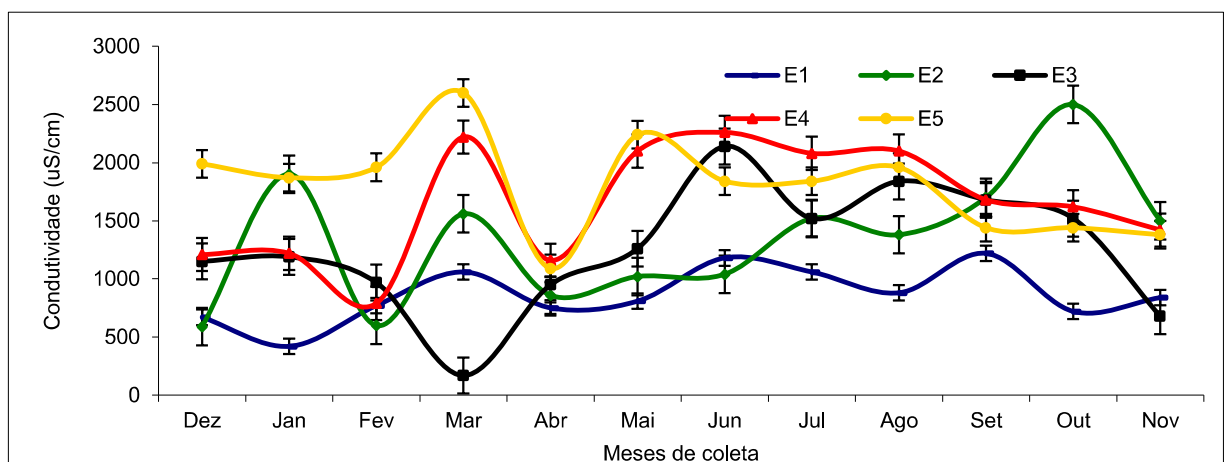
Figura 13 - Valores da temperatura (°C) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse do Guájaro



Fonte: próprio autor

A condutividade é a variável causante dos maiores gradientes na qualidade da água (Anexo 3); apresentou valores entre 420-1220 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para E1, uma faixa entre 590-2500 para E2, de 680-2140 para E3, de 790-2260 para E4 e entre 1090-2600 para E5. Os valores mínimos apresentaram-se em janeiro para E1 e E2; para E3 em novembro, para E4 em fevereiro e para E5 em abril. Os máximos em mudanças apresentaram-se em setembro para E1; em outubro, para E2 e para E3 e a E4 em junho e E5 em março (Figura 14).

Figura 14 - Valores da condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) durante os meses de coleta (dezembro-novembro) para os cinco pontos de coleta (E1, E2, E3, E4 e E5) no Embalse del Guáiaro



Fonte: próprio autor

Junto com a profundidade durante quase todo o ciclo anual, a condutividade marca um gradiente que vai setorizando o sistema aquático durante a época seca (CASTELLANOS ROMERO et al., 2017), fato que se manteve devido a novos aportes de chuvas.

Esses resultados das condições ambientais, foram correlacionados com a abundância de arraias nos pontos de coleta e o resultado da correlação (Pearson; $\alpha=0,05$) confirmou que a condutividade pode ser uma variável relevante na presença e distribuição dos indivíduos (Tabela 3).

De acordo com esses resultados, o valor de abundancia das arraias se correlaciona positivamente com valores altos de condutividade; amostrando que elas podem ter maior preferência pelos setores do sistema lântico onde a condutividade é maior, pela condição dos peixes cartilaginosos de detectar as suas presas pelo impulso elétrico; e porque a *P. magdaleneae* aproveita como alimento aos insetos da ordem Ephemeroptera (gênero *Campsurus*), os quais abundam nos fundos deste sistema aquático (ROMERO et al., 2017).

Tabela 3 - Análise de correlação (Pearson; $\alpha=0,05$) entre a abundância de arraias e as condições ambientais.

Estação vs abundância de Arraias		pH vs Abundância de Arraias	
Número de pares XY	60	Número de pares XY	60
Pearson r	0,6586	Pearson r	0,2226
	0,4859-		-0,033-
95% intervalo de confiança	7818	95% intervalo de confiança	0,4510
P valor	< 0,0001	P valor	0,0874
É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Sim	É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Não
R ²	0,4337	R ²	0,04953
Profundidade vs Abundância de Arraias		OD vs Abundância de Arraias	
Pearson r	-0,07168	Pearson r	-0,0119
	-0,319-		
95% intervalo de confiança	1857	95% intervalo de confiança	-0,265-0,243
P valor	0,2931	P valor	0,9281
É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Não	É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Não
R ²	0,005139	R ²	0,0001417

Continuação

Estação vs abundância de Arraias		pH vs Abundância de Arraias	
Transparência vs Abundância de Arraias		Condutividade vs Abundância Arraias	
Pearson r	0,2016	Pearson r	0,2472
95% intervalo de confiança	-0.05-434	95% intervalo de confiança	-0.007-0.472
P valor	0,0612	P valor	0,0285
É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Não	É uma correlação significativa? ($\alpha=0.05$)	Sim
R ²	0,04063	R ²	0,06109

Fonte: próprio autor

6.3 NOVO TRANSCRIPTOMA OBTIDO DO EPITELIO DE FERRÃO DA ARRAIA-DE ÁGUA DOCE: *Potamotrygon magdalenae*

O principal resultado é um transcriptoma novo para o gênero *Potamotrygon* que foi obtido de *Potamotrygon magdalenae*, uma arraia de água doce endêmica da Colômbia (com identidade corroborada); que permite obter uma quantidade maior de informações do transcriptoma do gênero.

6.3.1 Montagem e Sequenciamento de novo do transcriptoma da glândula de veneno de *P. magdalenae*

O sequenciamento de glândula de veneno colombiano listra resultou em um total de 15.102.703.800 bp (dados brutos), em 87.043.765 *reads* não transformadas e comprimento médio de 160 bp, que foram filtradas para chegar em 12.379.265.392 bp total e 85.504.681 *reads* de alta qualidade; com um comprimento médio de leitura de 145 bp e que em comparação com os resultados das outras espécies do gênero, atinge um maior volume de informações de controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo estatístico do sequenciamento e da montagem do transcriptoma de novo de três espécies de amostras de cDNA do gênero *Potamotrygon*.

Descritores	<i>P. magdalенаe</i>	<i>P. amandae</i> *	<i>P. falkneri</i> *
Antes do pré-processamento			
Número de <i>reads brutos</i>	87.043.765	14.539.142	15.375.430
Dados brutos (bp)	15.102.703.800	3.357.743.092	3.384.969.885
Comprimento médio de <i>reads</i>	160	231	220
Depois do pré-processamento			
Valor de alta qualidade dos <i>reads</i>	85.504.681	13.109.527	13.730.400
Dados limpos (bp)	12.379.265.392	2.637.602.285	2.627.406.006
% de <i>reads</i> com <i>Phred score</i> \geq 33	97,1	92,7	92,4
Comprimento médio de <i>reads</i> (bp)	145	200	207
Estatística da montagem com Trinity			
Número de <i>contigs</i>	258.142	147.881	105.191
<i>Contigs</i> (bp)	136.844.739	50.987.297	42.504.708
N50	695	3.015	2.700
Comprimento médio dos <i>contig</i> (bp)	530	2.032	1.924
Comprimento mínimo dos <i>contig</i> (bp)	201	293	297
Comprimento máximo dos <i>contig</i> (bp)	12.130	15.915	14.247

Fonte: GOMES DE OLIVEIRA *et al.*, 2017.

De acordo com os resultados de pré-processamento (Tabela 5), os dados limpos de *P. magdalенаe* excederam significativamente o número de pares de bases de *P. amandae* e *P. falkneri*, que renderam um número semelhante de pares de bases (2.632.504.151 como média); correspondentes ao 21% do que foi obtido para *P. magdalенаe* (12.379.265, 392bp) e com 97,1 de todas as bases, tendo o golo de PQV (Q) acima de 33, que indica a qualidade de bom sequenciamento. Os *contigs* montados de *P. magdalенаe* foram submetidos a uma análise de quantificação de precisão de abundância dos transcritos obtidos por *RNA-seq* RSEM (do inglês: *accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome*). Além disso, aqueles que apresentaram baixa expressão (<1 FPKM (do inglês: *Fragments per Kilobase Million*)) e outra com comprimentos < 200bp foram eliminados. O uso desse valor de limiar da FPKM; baseado em um estudo de *RNA-Seq* com Trinity, determina o limite pelo qual são expressas as transcrições de relevância biológica.

Em seguida, os *contigs* filtrados submeteram-se à identificação do candidato codificação região (*in silico*) utilizando o software TransDecoder, que permitiu a obtenção de 258.142 *contings* para *P. magdalenae*; um valor que excede cerca de 43%, o número de *contings* obtidos por *P. amandae* e aproximadamente 59% o número de *contings* de *P. falkneri*.

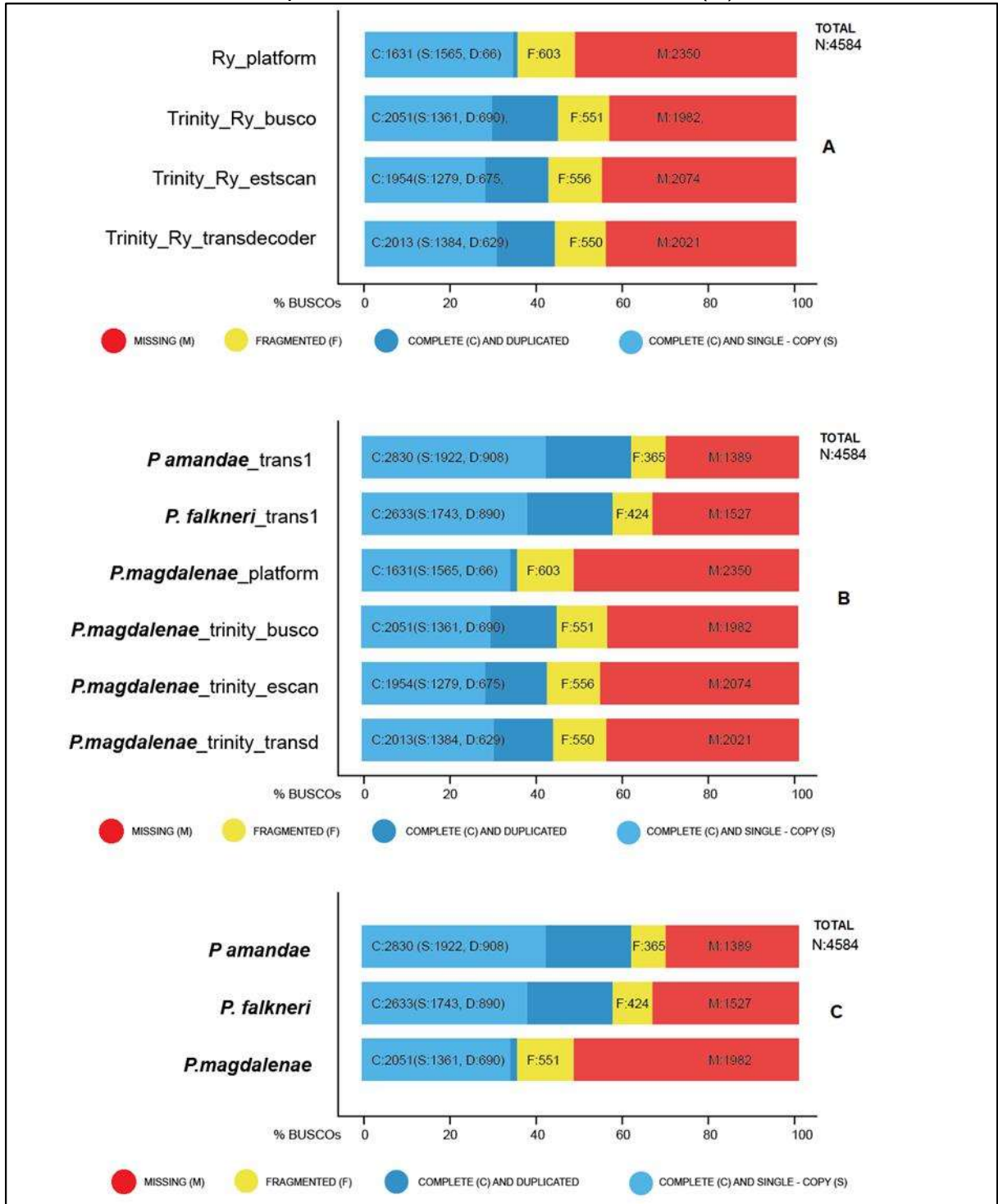
6.3.2 Anotação do transcriptoma da *Potamotrygon magdalenae*

As sequências de filtrado de *P. magdalenae* foram comparadas com aqueles obtidos por *P. amandae* e *P. falkneri*, para determinar semelhanças com as sequências localizadas no banco de dados de peptídeos não-redundante (nr) NCBI, usando BLASTx. Isto resultou em 21.245 (84,7%) e 19.316 (87,5%) hits, que coincidem com proteínas similares de outras espécies do gênero, respectivamente. Destes, entre 81,3 e 83,1% dos hits BLASTx têm pelo menos $40e-1$ coincidências com proteínas existentes no banco de dados do NCBI nr e os sucessos com um *e-value* = 0, que correspondem entre 31,8 e 31,6%, ao número total de *contigs*, nos bancos dois dados, respectivamente.

Da mesma forma, os transcritos montados de *P. magdalenae* com BLASTx contra o banco de dados UniProtKB, encontraram um total de 17.250 (68,8%) transcrições que correspondem às sequências já referenciadas (Tabela 2). Porém, nas pesquisas em NCBI e UniProtKB BLASTx, não resultaram referenciadas a 15,3% das transcrições em um total de 3.387 de *P. magdalenae*. Uma análise mais detalhada dessas transcrições mostrou que 3.773 transcritos de *P. magdalenae*, continham uma ORF \geq 100 aminoácidos, sugerindo que uma parte significativa destes pode corresponder a transcrições putativas para esta espécie.

Com a finalidade de pesquisar genes ortólogos entre espécies, para iniciar a anotação funcional da transcriptoma, foram usados os resultados da ferramenta BUSCO (Figura 15A). Ao comparar usando estes genes, obtiveram-se os resultados mostrados nas figuras 15B e 15C. Informações mais detalhadas sobre a classificação das proteínas, desde os sucessos de UniProtKB obtidos a partir da análise de BLASTx e a cruzar dados com a base a InterPro, mostrou um total de 16.961 (67,6%) sucessos nas transcrições montadas de *P. magdalenae*.

Figura 15 - Avaliação dos resultados da busca dos genes ortólogos entre as três espécies do gênero *Potamotrygon* comparadas; resultados comparativos das ferramentas utilizadas para *P. magdalenae* (A), Resultados comparativos entre as linhas, de acordo com a ferramenta BUSCO (B); os resultados comparativos entre espécies com ferramentas adicionais (C).



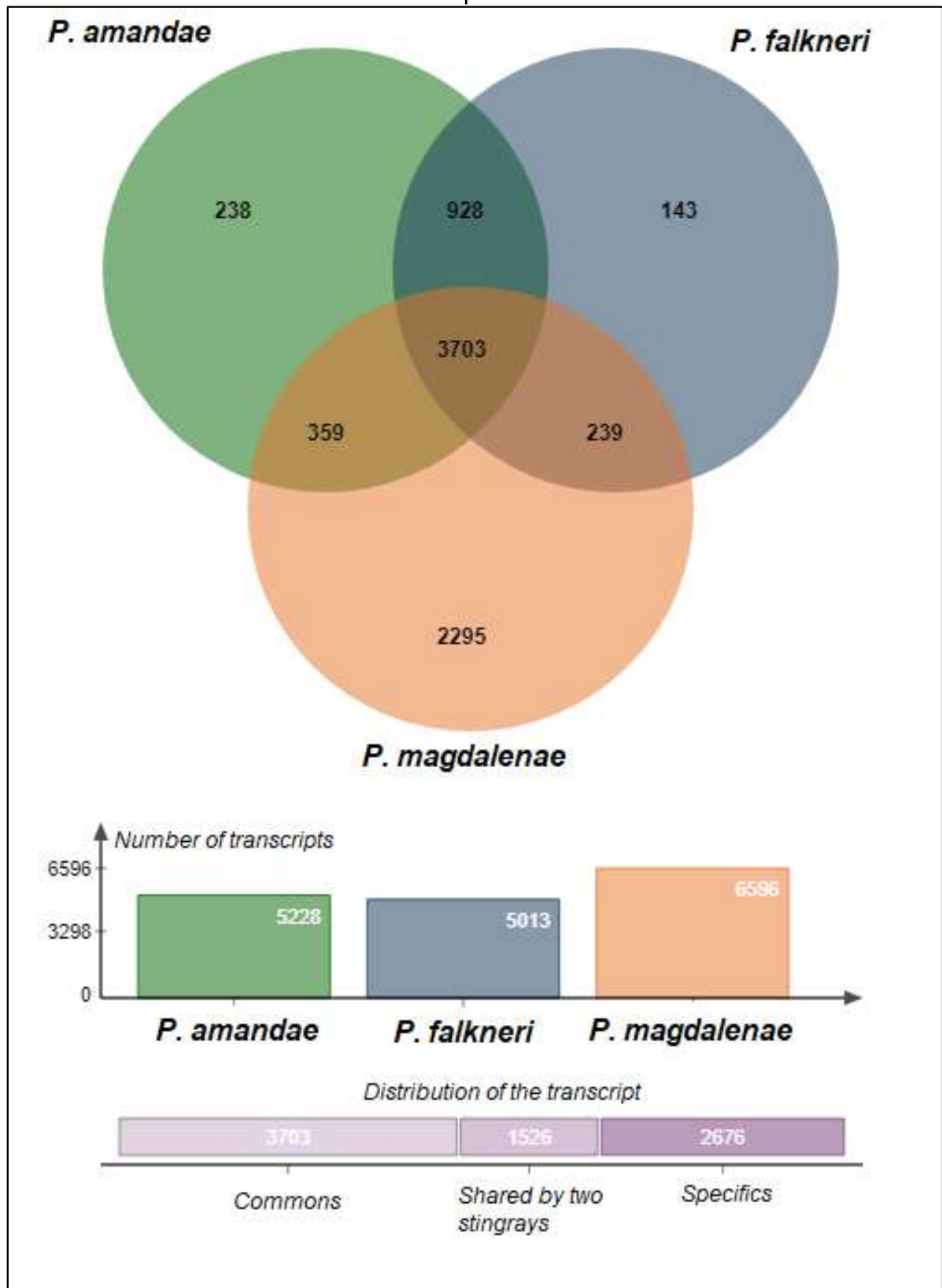
Fonte: próprio autor

Ao contrário dos transcritos reunidos de *P. amandae* e *P. falkneri* que não resultaram na identificação da região não codificadora usando o software TransDecoder, os de *P. magdalенаe* permitiram determinar a previsão de RNAs longos não-codificantes (lncRNAs). Essa classe de transcritos está envolvida em importantes processos biológicos, como compensação, regulação da expressão gênica e regulação do ciclo celular. Esta análise resultou na previsão de 1.611 potenciais pncRNAs de *P. magdalенаe*.

6.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DE *Potamotrygon magdalенаe* E ANÁLISE COMPARATIVA COM AS DEMAIS ESPÉCIES DO GÊNERO

Na análise dos transcritos obtidos, apresentou um total de 2.676 exclusivos somados das três espécies, dos quais 85,76% (2.295) correspondem a *P. magdalенаe*. Um total de 3.703 transcritos são comuns das três raias e 1.526 correspondem a transcrições compartilhadas entre duas das espécies deste gênero. O tamanho de cada lista mostra em detalhes o número de transcrições específicas e aquelas que são comuns a duas delas ou compartilhadas entre todas (Figura 16).

Figura 16 - Número total de transcrições, exclusivas de cada espécie, e comuns entre as três espécies de arraias.



Fonte: próprio autor

Esse resultado, baseado apenas no número de transcrições, corrobora as diferenças de expressão, mostrando uma diferença marcante entre as transcrições exclusivas das espécies brasileiras e do norte colombiano; sem esquecer que *P. amandae* é uma espécie comum entre os dois países. *P. amandae* e *P. falkneri* compartilharam um alto número de transcritos (88,5%, 92,4%, respectivamente), deixando uma baixa porcentagem de transcritos exclusivos para cada um (11,4% e 7,6%, respectivamente). *P. magdalenae* compartilha valor que não excede ao 100% das transcrições exclusivas nesta análise. *P. magdalenae* compartilha com *P. amandae*, 61,58% desses transcritos anotados e 59,8% com *P. falkneri*; retendo cerca de 40% das transcrições exclusivas do total das estudadas.

Os transcriptomas reunidos no trabalho de Gomes de Oliveira e colaboradores (2016), para *P. amandae* e *P. falkneri*, com a adição de *P. magdalenae*, foram submetidos a uma nova anotação de seqüências envolvidas nos processos biológicos, com a ferramenta Blas2GO. No mapeamento da restituição das vias metabólicas da ferramenta KEGG, as faixas são categorizadas em seis grupos: "Metabolismo", "Processamento de informação genética", "Processamento de informação ambiental", "Processos celulares", "Sistemas orgânicos" e "Doenças humanas". A diferença do trabalho de Gomes *et al.*, (2016); onde os resultados foram ligados a 37 vias metabólicas, esta nova anotação permitiu um número de 42 vias às quais as transcrições foram ligadas, porque as transcrições relacionadas com as vias de "Processos orgânicos," incorpora "envelhecimento", à categoria de "doenças humanas" é adicionado além da subcategoria de "câncer em geral", um referente a "Tipo específico de câncer" e outro relacionado a "dependência de substância"; adicionalmente, a discriminação na subcategoria de "infecções", os tipos "viral", "bacteriano" e "parasitário" e uma subcategoria de "resistência a drogas antineoplásicas" se somam a esse grupo (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da Classificação KEGG das transcrições de três espécies do gênero *Potamotrygon*, separadas em seis categorias: Metabolismo, Processamento de Informação Genética, Processamento de Informação Ambiental, Processo Celular, Sistemas Organizáveis e Doenças Humanas

ID	Classificação KEGG	Via metabólica						Transcrições comuns	Total de transcrições exclusivas	<i>P. magdalenae</i> (%)	<i>P. amandae</i> (%)	<i>P. falkneri</i> (%)
		<i>P. magdalenae</i>	<i>P. amandae</i>	<i>P. falkneri</i>	Transcrições comuns	Transcrições exclusivas	<i>P. magdalenae</i> (%)					
1	Visão global	124	40	43	1066	207	8,1%	5,8%	12,7%			
2	Metabolismo de carboidratos	33	0	7	235	40	2,1%	0,0%	2,1%			
3	Metabolismo energético	6	4	3	101	13	0,4%	0,6%	0,9%			
4	Metabolismo de lipídeos	23	4	9	188	36	1,5%	0,6%	2,7%			
5	Metabolismo de nucleotídeos	11	8	2	136	21	0,7%	1,2%	0,6%			
6	Metabolismo de aminoácidos	31	6	11	191	48	2,0%	0,9%	3,2%			
7	Metabolismo de outros aminoácidos	8	0	2	44	10	0,5%	0,0%	0,6%			
8	Metabolismo e sínteses do glicano	29	2	1	162	32	1,9%	0,3%	0,3%			
9	Metabolismo de cofatores e vitaminas	11	4	7	88	22	0,7%	0,6%	2,1%			
10	Metabolismo de terpenoides e policetidos	1	2		25	3	0,1%	0,3%	0,0%			
11	Biossínteses de outros metabolitos secundários	8	1	5	17	14	0,5%	0,1%	1,5%			
12	Metabolismo e biodegradação de Xenobióticos	4	5	3	42	12	0,3%	0,7%	0,9%			
13	Transcrição	4	2	0	140	6	0,3%	0,3%	0,0%			
14	Tradução	33	1	0	305	34	2,1%	0,1%	0,0%			
15	Dobra, classificação e degradação genética	14	0	3	292	17	0,9%	0,0%	0,9%			
16	Replicação e Reparo	5	3	0	169	8	0,3%	0,4%	0,0%			

ID	Classificação KEGG	Via metabólica		Transcrições comuns		Total de Transcrições exclusivas	<i>P. magdalenae</i> (%)	<i>P. amandae</i> (%)	<i>P. falkneri</i> (%)
		<i>P. magdalenae</i>	<i>P. amandae</i>	<i>P. falkneri</i>	Transcrições comuns				
17	Processamento de Informação Ambiental	0	3	0	18	3	0,0%	0,4%	0,0%
18		214	90	30	1356	334	13,9%	13,0%	8,8%
19		62	33	14	118	109	4,0%	4,8%	4,1%
20	Processos celulares	67	0	0	398	67	4,4%	0,0%	0,0%
21		70	9	6	488	85	4,6%	1,3%	1,8%
22	Motilidade celular	29	10	2	262	41	1,9%	1,4%	0,6%
24		5	6	1	88	12	0,3%	0,9%	0,3%
25	Sistemas organizacionais	109	32	26	634	167	7,1%	4,6%	7,7%
26		86	72	32	615	190	5,6%	10,4%	9,4%
27		19	14	5	88	38	1,2%	2,0%	1,5%
28		39	19	12	168	70	2,5%	2,8%	3,5%
29		7	5	4	58	16	0,5%	0,7%	1,2%
30		54	67	13	280	134	3,5%	9,7%	3,8%
31		8	12	6	48	26	0,5%	1,7%	1,8%
32		11	4	2	117	17	0,7%	0,6%	0,6%
33	Adaptação ambiental	11	5	4	83	20	0,7%	0,7%	1,2%
34		18	17	5	132	40	1,2%	2,5%	1,5%

ID	Classificação KEGG	Via metabólica	Continuação							
			<i>P. magdalenae</i>	<i>P. amandae</i>	<i>P. falkneri</i>	Transcrições comuns	Total de Transcrições exclusivas	<i>P. magdalenae</i> (%)	<i>P. amandae</i> (%)	<i>P. falkneri</i> (%)
35		Câncer: Visão Geral	0	40	17	561	57	0,0%	5,8%	5,0%
36		Câncer: tipos específicos	71	29	8	598	108	4,6%	4,2%	2,4%
37		Doenças imunes	18	9	10	78	37	1,2%	1,3%	2,9%
38		Doenças neurodegenerativas	22	7	3	274	32	1,4%	1,0%	0,9%
39		Dependência de substâncias	28	24	3	76	55	1,8%	3,5%	0,9%
40		Doenças cardiovasculares	22	23	3	147	48	1,4%	3,3%	0,9%
41		Doenças endócrinas e metabólicas	33	13	5	216	51	2,1%	1,9%	1,5%
42		Doenças infecciosas: bacteriana	28	6	12	296	46	1,8%	0,9%	3,5%
43		Doenças infecciosas: Viral	107	52	13	812	172	7,0%	7,5%	3,8%
44		Doenças infecciosas: Parasitárias	38	5	5	155	48	2,5%	0,7%	1,5%
45		Resistência a drogas: antineoplásicas	16	2	2	118	20	1,0%	0,3%	0,6%
Total			1537	690	339			100,0%	100,0%	100,0%

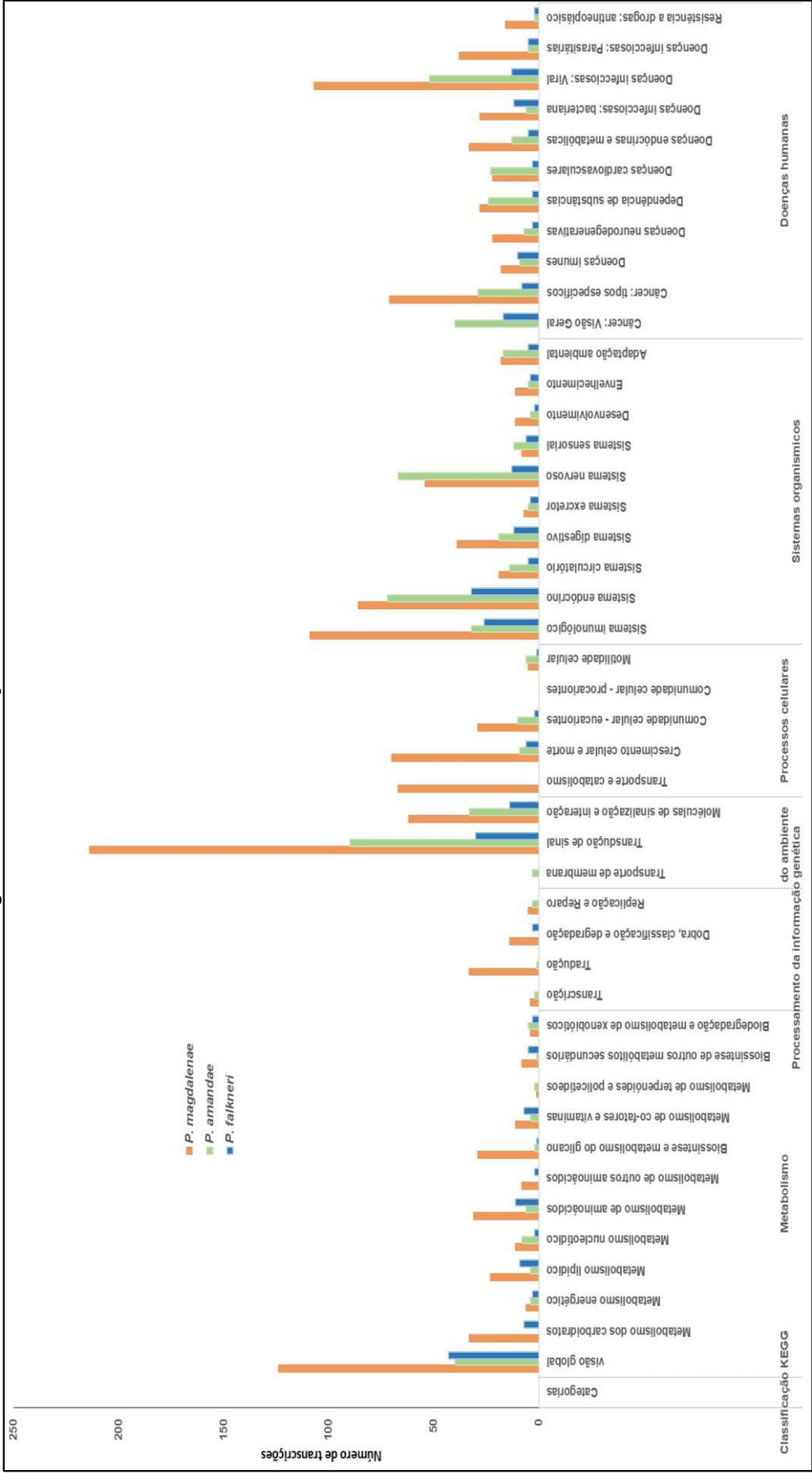
Fonte: próprio autor

Esses resultados mostram que o padrão relatado para *P. amandae* e *P. falkneri* é mantido, onde os grupos mais representativos são "cânceres", "transdução de sinal", "sistema imunológico" e "doenças infecciosas", respectivamente; no entanto, com *P. magdalanae*, esse padrão é modificado, deixando em primeiro lugar as transcrições ligadas à "Tradução de sinais", na categoria de "processamento de informações ambientais", em segundo lugar "câncer" e produtos relacionados a " infecções do tipo viral ", na terceira posição de abundância de transcrições; o que poderia ser uma alta especialização dessas vias metabólicas (ZHU *et al.*, 2006).

A categoria de "metabolismo", em específico, as vias associadas ao metabolismo de aminoácidos e carboidratos, com participação importante da biossíntese de glicano, cofatores e vitaminas, além de metabólitos secundários, *P. magdalanae* supera as outras espécies no número de transcritos (Tabela 6 e Figura 17). Sem esquecer que essa categorização das vias metabólicas vem dos produtos oriundos do epitélio das arraias, todas essas vias relacionadas à biossíntese proteica poderiam estar diretamente envolvidas na produção das proteínas do veneno, pelo continuar com proteômica no seguinte passo resolveria novos interrogantes gerados no trabalho

A partir da análise de transcrições exclusivas de cada espécie por categoria metabólica, pode-se evidenciar que *P. magdalanae*, tem aproximadamente 25% de seus produtos exclusivos em funções ligadas a doenças e 24% em funções do organismo, enquanto em *P. amandae*, esta contribuição percentual de transcrições exclusivas, são investidas em 30% e 36%, respectivamente. Porém, *P. falkneri*, mantém a maior porcentagem de transcritos exclusivos (32,2%) com base nas funções do organismo, e liga 27% na função metabólica.

Figura 17 - Classificação KEGG das transcrições exclusivas para cada espécie, separadas em seis categorias: Metabolismo, Processamento de Informações Genéticas, do ambiente, Processamento de Informações Ambientais, Processos Celulares, Sistemas Organismicos, Doenças humanas, Organizáveis e Doenças Humanas.



Fonte: próprio autor

Além das vias metabólicas e da ação desses produtos decorrentes da anotação, a anotação de potenciais Peptídeos antimicrobianos (AMP, do inglês *Antimicrobial peptides*) foi feita com as informações das três espécies, para comparar o potencial de atividade antimicrobiana, cujos resultados mostraram uma probabilidade > 90%, que *P. magdalena* poderia ter em torno de 283 AMPs, *P. amandae* 569 e *P. falkneri* 400, com comprimento médio de 100 aminoácidos; e com probabilidade de ocorrência 95%, estes AMP seriam 189, 340 e 234, respectivamente, dos que se apresentam os mais frequentes nas Tabelas 6, 7 e 8.

Dentro destes resultados, os mais frequentes foram selecionados para comparação entre as espécies analisadas, conforme apresentado nas tabelas 6, 8 e 9. Um elevado número de proteínas das múltiplas isoformas do domínio PDZ, semelhantes àquelas referenciadas para *Callorhinchus milii* (Tubarão Elefante) são encontrados em *P. magdalena*, mas não em outras espécies, com tal frequência, enquanto as proteínas tipo *five finger*, relatadas para *Rhincodon typus* (tubarão-baleia) são frequentes para as três espécies; mas contribuem, com mais de 80% das mais abundantes em *P. falkneri* e *P. amandae*, e com menos de 20% para *P. magdalena*. Nas últimas espécies, mais de 20% de AMP, não referenciados anteriormente nas bases de dados foram encontrados, ou não caracterizados, mas alguns referenciados para *Astyanax mexicanus* (sardinha)

Tabela 6 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em *P. magdalenae* e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.

Referencia	Tipo de molécula	Anotação	Localização taxonomica	Tax ID	Número de hits
UPI0006B0AA90	Sialosfoproteína tipo dentina n = 1	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF49.1-like n = 1	<i>Limulus polyphemus</i>	6850	9
UPI0009A316E9	1	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF7.1-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	13
UPI0009A2B1FC		proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	9
UPI0009A3A712		proteína hipotética n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	10
UPI000C77F16C		isoforma do membro 10 da superfamília da imunoglobulina X1 n = 2	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	2751	14
UPI0003C1069A		isoforma de proteína do domínio PDZ múltipla X1 n = 1	<i>Latimeria chalumnae</i>	7897	9
UPI00045739DE		isoforma de proteína do domínio PDZ múltipla X2 n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI0004571F33		isoforma de proteína do domínio PDZ múltipla X3 n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI00045748A7		isoforma proteica do domínio PDZ múltipla X4 n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI00045734B6		isoforma proteica do domínio PDZ múltipla X5 n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI0004572856		isoforma proteica do domínio PDZ múltipla X6 n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI0004575E8B		Múltipla proteína do domínio PDZ n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
V9K7M9		Proteína derivada de elemento derivado em piggyBac	<i>Callorhinchus milii</i>	7868	9
UPI0006446EF2	4-like		<i>Glupea harengus</i>	7950	14
H9GA98	Proteína não caracterizada (Fragmento) n = 1		<i>Anolis carolinensis</i>	28377	10
A0A3B1JAU9	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Astyanax mexicanus</i>	7994	42
A0A267F272	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Macrostomum lignano</i>	282301	27
W5K5E5	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Astyanax mexicanus</i>	7994	22
A0A3B1INC8	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Astyanax mexicanus</i>	A7994	18
W5KGF7	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Astyanax mexicanus</i>	7994	15
R4GAX4	Proteína não caracterizada n = 1		<i>Anolis carolinensis</i>	28377	11

Anotação		Número	
Referência	Tipo de molécula	Tax ID	de hits
UPI0009A45A07	proteína de dedo de zinco 229-like n = 1 isoforma de proteína de dedo de zinco 239-like X1 n = 1	259920	9
UPI0009A27301	1	259920	9
UPI0009A31403	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	33
UPI0009A2ED78	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	15
UPI0009A3F424	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	10
UPI0009A397E4	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	9
UPI0009A2EF42	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	9
UPI0009A28F6D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	259920	9
UPI0008DB7C22	proteína dedo de zinco 418 n = 1	9135	9
UPI0009A33BA6	proteína dedo de zinco 585A-like n = 1	259920	23
UPI0009A2A835	proteína de dedo de zinco 623-like n = 1	259920	9

Fonte: próprio autor

Tabela 7 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em *P. amandae* e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.

Referência	Anotação		Número de hits
	Tipo de molécula	Localização taxonomica	
UPI0009A316E9	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF49.1-like n = 19	<i>Rhincodon typus</i>	83
UPI0009A32801	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF7.1-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	44
UPI0009A31FD4	proteína de dedo de gástrula de zinco XICGF8.2DB-like isoforma X1 n=1	<i>Rhincodon typus</i>	30
UPI0009A39ADB	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-como isoforma X2	<i>Rhincodon typus</i>	49
UPI0009A28CFF	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	73
UPI0009A2BCC9	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	29
UPI000C77F16C	proteína hipotética n = 1	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	63
UPI000457290B	Proteínas contendo domínios 3 de NACHT, LRR e PYD n = 1	<i>Callorhinchus milii</i>	40
UPI0009A2CCF2	Proteínas contendo domínios 3 de NACHT, LRR e PYD n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	20
UPI0006D8FF88	Proteínas contendo domínios 5, NACHT, LRR e PYD, n = 1	<i>Latimeria chalumnae</i>	21
A0A2H9U7Y2	Proteína não caracterizada (Fragmento) n = 1	<i>Aeromonas cavernicola</i>	33
A0A2T2YPR2	Proteína não caracterizada (Fragmento) n = 1	<i>Nocardia nova</i>	22
UPI0009A25D40	proteína não caracterizada LOC109920619 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	50
A0A3B1KGA6	Proteína não caracterizada n = 1	<i>Astyanax mexicanus</i>	32
UPI0009A45A07	proteína de dedo de zinco 229-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	49
UPI0009A27301	isoforma de proteína de dedo de zinco 239-like X1 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	69
UPI0009A344B0	proteína de dedo de zinco 239-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	57
UPI0009A387C2	proteína de dedo de zinco 239-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	55
UPI0009A31403	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	102
UPI0009A36EA0	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	80

Anotação		Anotação		Anotação	
Referência	Tipo de molécula	Localização taxonomica	Tax ID	Número de hits	
UPI0009A2EF42	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	48	
UPI0009A38B8C	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	43	
UPI0009A2ED78	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	40	
UPI0009A45826	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	34	
UPI0009A3F424	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	30	
UPI0009A28F6D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	29	
UPI0009A46A2D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	28	
UPI0009A2F4BF	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	28	
UPI0009A35C95	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	23	
UPI0009A35EA0	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	20	
UPI0009A33294	proteína de dedo de zinco 271-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	30	
UPI0009A34E25	proteína dedo de zinco 585A-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	30	
UPI0009A2A835	proteína de dedo de zinco 623-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	29	
UPI000DF3B0D6	isoforma de proteína de dedo de zinco 729-like X2 n = 1	<i>Oreochromis niloticus</i>	8128	21	
UPI0009A45FBA	proteína de dedo de zinco 91-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	25	

Fonte: próprio autor

Tabela 8 - Análise comparativa entre as sequências peptídicas anotadas com maior abundância em *P. falkneri* e as sequências peptídicas de várias espécies de peixes obtidas a partir de estudos transcriptômicos.

Referência	Anotação		Tax ID	Número de hits
	Tipo de molécula	Localização taxonomica		
UPI0009A316E9	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF49.1-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	70
UPI0009A32801	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF7.1-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	25
UPI0009A31FD4	proteína de dedo de gástrula de zinco XICGF8.2DB-like isoform X1n=1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	41
UPI0009A39ADB	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	67
UPI0009A2BCC9	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	49
UPI0009A28CFF	proteína de dedo de gástrula zinco XICGF8.2DB-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	38
UPI000C77F16C	proteína hipotética n = 1	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	2751	21
UPI0009A25D40	proteína não caracterizada LOC109920619 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	20
A0A3B1K5J3	Proteína não caracterizada n = 1	<i>Astyanax mexicanus</i>	7994	37
UPI0009A45A07	proteína de dedo de zinco 229-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	40
UPI0009A27301	isoforma de proteína de dedo de zinco 239-like X1 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	47
UPI0009A303B7	isoforma de proteína de dedo de zinco 239-like X1 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	31
UPI0009A344B0	proteína de dedo de zinco 239-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	43
UPI0009A387C2	proteína de dedo de zinco 239-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	33
UPI0009A2A8E0	proteína de dedo de zinco 239-like isoform X2 n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	33
UPI0009A31403	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	89
UPI0009A36EA0	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	76
UPI0009A2F4BF	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	37
UPI0009A2ED78	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	34
UPI0009A45826	proteína de dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	31

Anotação		Referência		Anotação		Referência	
Referência	Tipo de molécula	Localização taxonomica	Tax ID	Número de hits	Referência	Tipo de molécula	Localização taxonomica
UPI0009A2EF42	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	30	UPI0009A28F6D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A28F6D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	28	UPI0009A46A2D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A46A2D	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	25	UPI0009A409AE	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A409AE	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	23	UPI0009A34440	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A34440	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	22	UPI0009A294CC	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A294CC	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	22	UPI0009A38B8C	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A38B8C	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	21	UPI0009A46B50	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A46B50	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	20	UPI0009A3F424	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A3F424	proteína dedo de zinco 239-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	20	UPI0009A36EE9	proteína dedo de zinco 3-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A36EE9	proteína dedo de zinco 3-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	36	UPI0009A2639F	proteína dedo de zinco OZF-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>
UPI0009A2639F	proteína dedo de zinco OZF-like n = 1	<i>Rhincodon typus</i>	259920	26			

Fonte: próprio autor

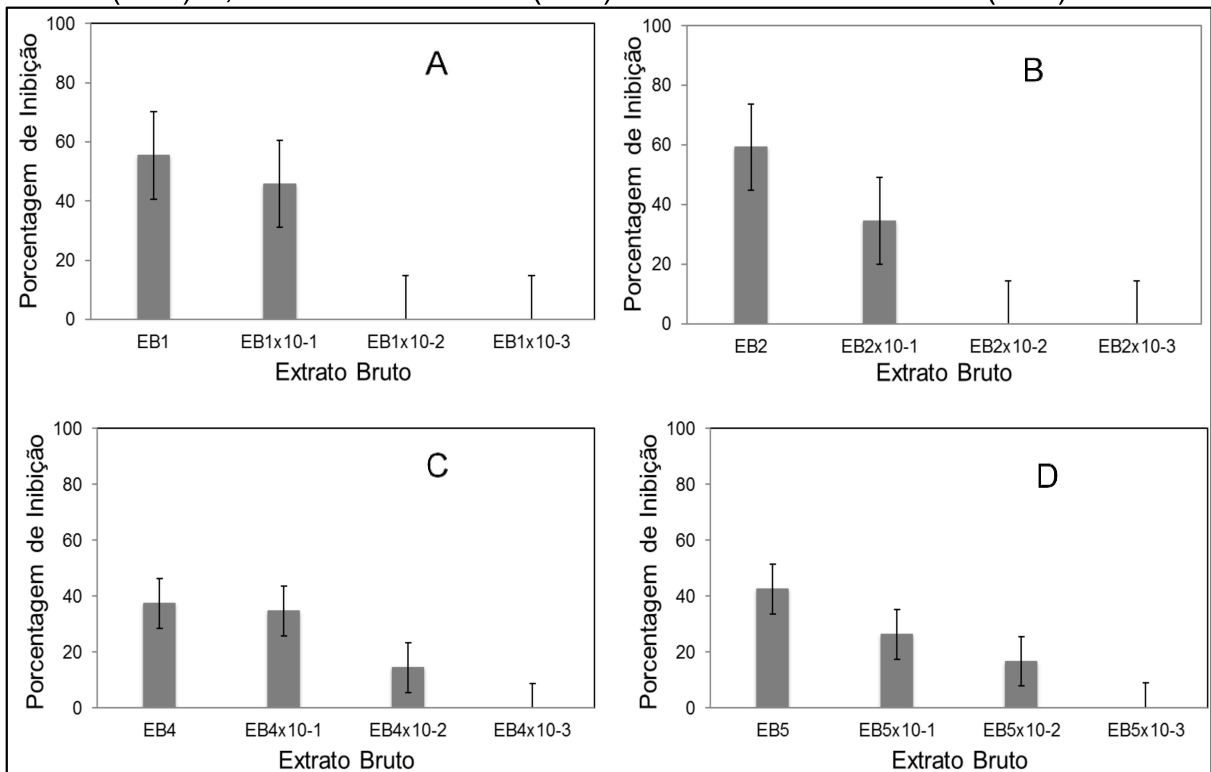
6.5 BIOENSAIOS COM OS EXTRATOS BRUTOS (EB) DO EPITÉLIO DE FERRÃO

Para a realização dos bioensaios com extrato bruto (do epitélio de ferrão) (EB), foram feitos testes prévios de difusão em caixa com os extratos dos espécimes coletados (Teste de Kirby-Bauer), para fazer a seleção dos extratos que posteriormente foram testados por microdiluição. Os extratos escolhidos foram os dos espécimes: das fêmeas, R12, R14, R15 da faixa etária II e R18, R20, R25 da faixa etária IV; dos machos, R1, R24, R33 da faixa I e R22, R27, R26 da faixa etária III, para ter representatividade nas faixas e sexos. Assim se trabalhou com 3 réplicas biológicas por faixa etárias e sexo diferenciados e 3 repetições técnicas para cada diluição. Foram usados Gentamicina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o controle negativo das bactérias e Clotrimazol ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para as leveduras.

Para apresentar os resultados, os extratos são nominados como EB1, correspondente aos machos da faixa III; EB2, para as fêmeas da faixa IV, EB4 para as fêmeas da faixa II e EB5 para os machos da faixa I (Figuras 18-27). Foram testados os EB nas diluições até 1×10^{-3} , usando um inóculo de 10^7 UFC. mL^{-1} .

Afim de melhor observar o efeito inibitório dos EB contra as bactérias e leveduras, apresenta-se em porcentagem de inibição para cada um dos bioensaios (Figura 18), onde os extratos das arraiais de maior maturidade (indistintamente do sexo), conseguem inibir mais de 50% das leveduras *Candida albicans*; e as jovens conseguem inibir perto de 40% na fase logarítmica do crescimento (Figura 18).

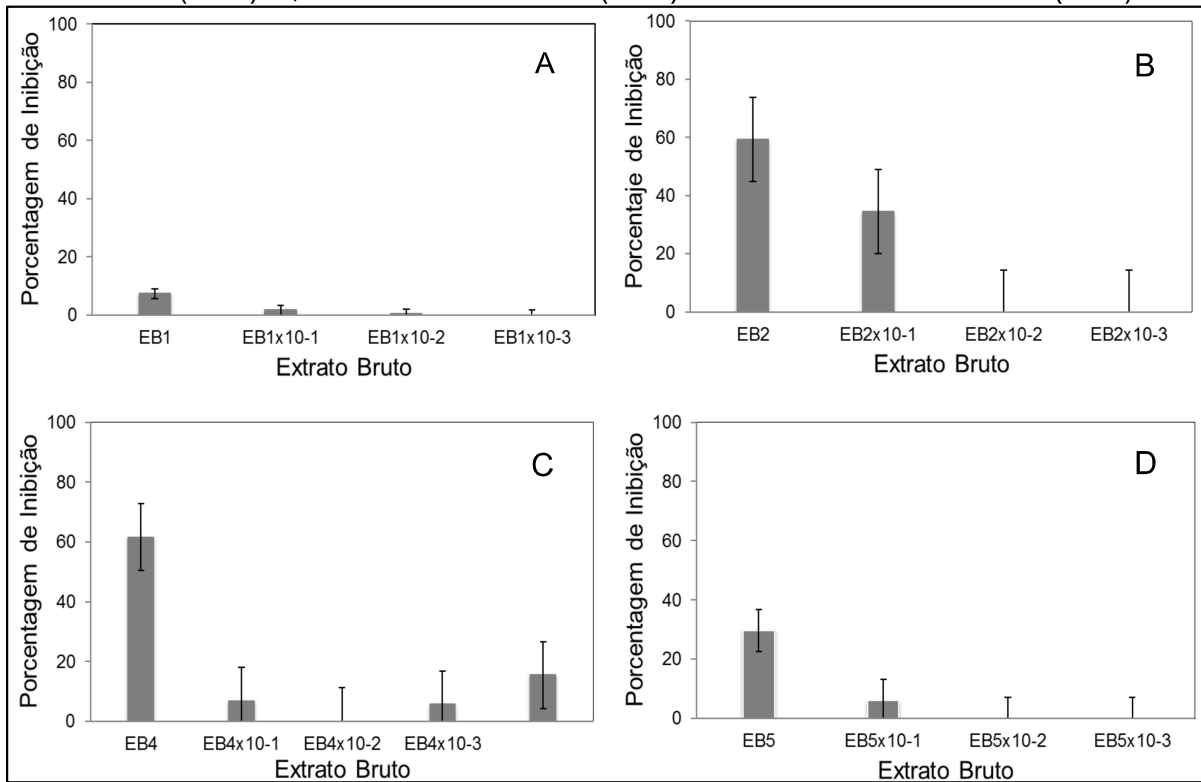
Figura 18 - Avaliação da inibição de *Candida albicans* vs extratos brutos (EB com $0,7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.



Fonte: próprio autor

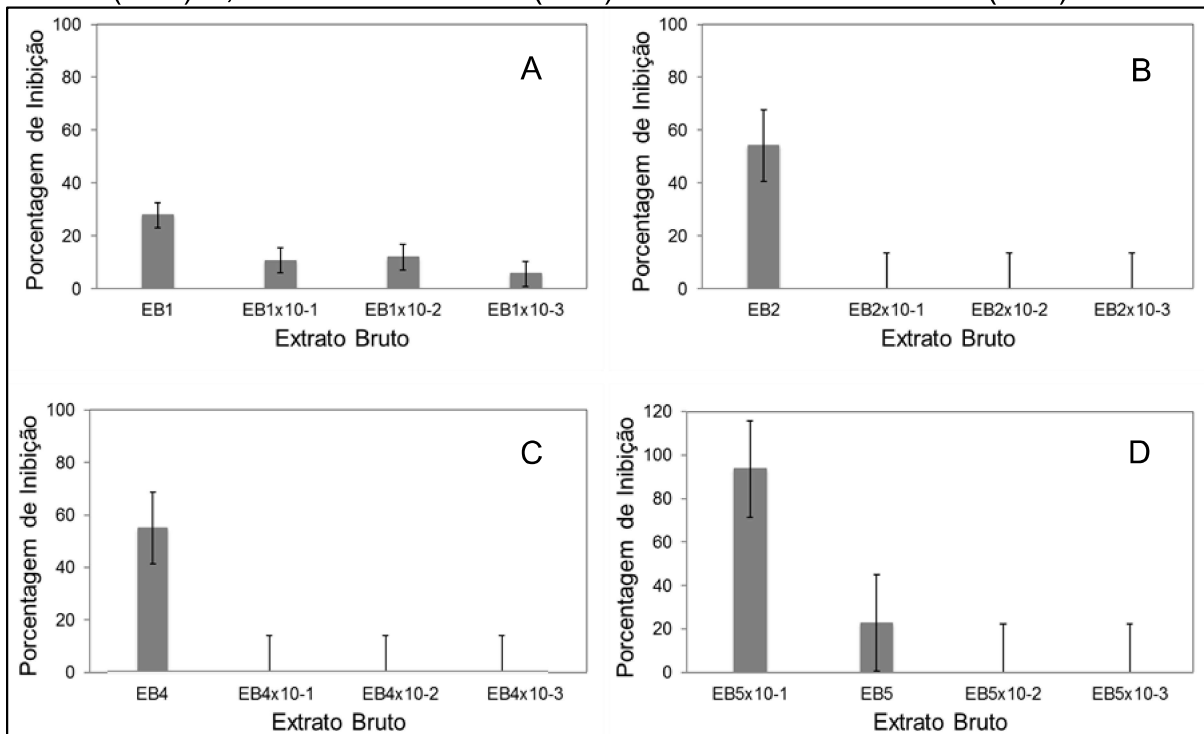
No ensaio contra *Pseudomonas aeruginosa*, encontrou-se um comportamento, mas tendente a uma linha reta onde os extratos não amostraram uma diferença na inibição dos extratos obtidos dos machos (EB1 e EB5), enquanto os extratos das fêmeas (EB2 e EB4), conseguiram inibir o crescimento bacteriano (Figura 19). Pode-se ver mais claramente o comportamento dos extratos EB2 e EB4, que causam o 100% da inibição. Com as diluições maiores essa inibição é reduzida.

Figura 19 - Avaliação de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* vs extratos brutos (EB com $0,7\mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.



Fonte: próprio autor

Figura 20 - Avaliação da inibição de *Escherichia coli* vs extratos brutos (EB com $0,7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.

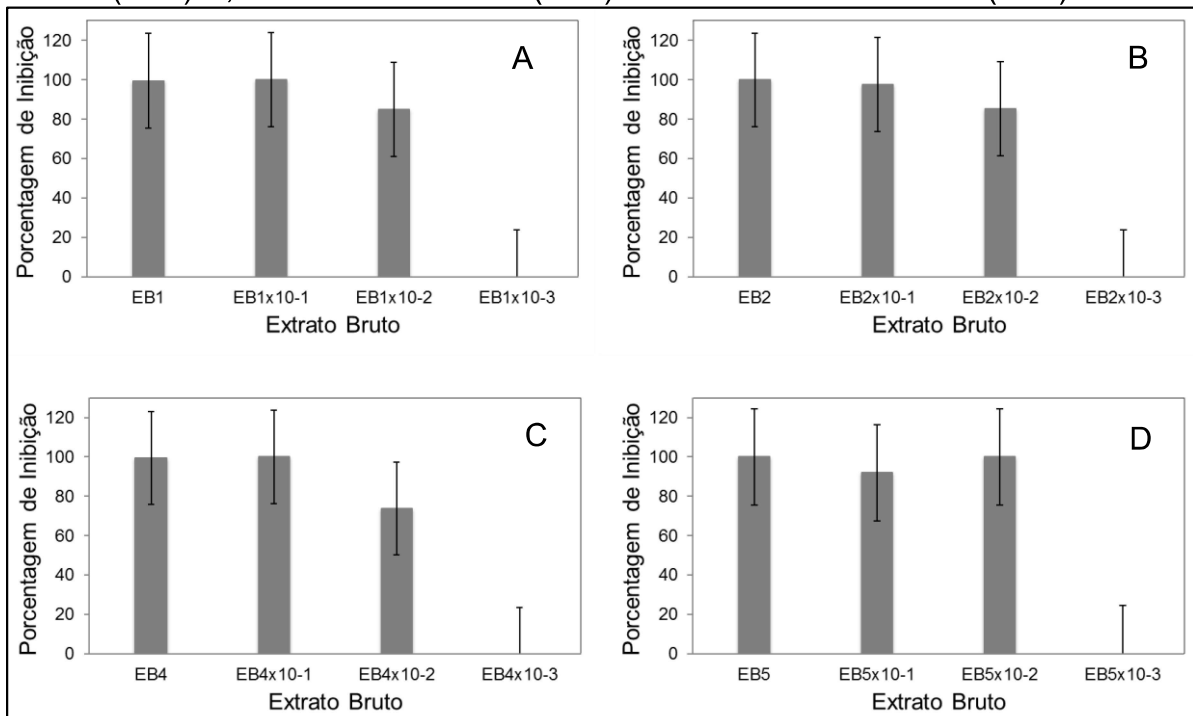


Fonte: próprio autor

Para os ensaios com *Escherichia coli*, os resultados foram particulares para cada tipo de extrato, onde EB1 amostra uma porcentagem máxima do 25% e vai diminuindo com as diluições, mas para o EB5 que é outro extrato de macho a porcentagem é muito alto (quase 100%). O extrato EB2, proveniente de uma fêmea resulta inibindo mais do 50% do inóculo, enquanto o outro EB4 não tem efeito nas bactérias (Figura 20). Neste resultado não há um padrão para os extratos do mesmo sexo, nem a faixa etária, já que o efeito inibitório foi para fêmeas maduras e machos imaturos, em diferente magnitude.

O bioensaio realizado para *Klebsiella pneumoniae* teve os melhores resultados no efeito dos extratos, tanto em inibição bem como na permanência dessa inibição nos extratos e as diluições (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação da inibição de *Klebsiella pneumoniae* vs extratos brutos (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.

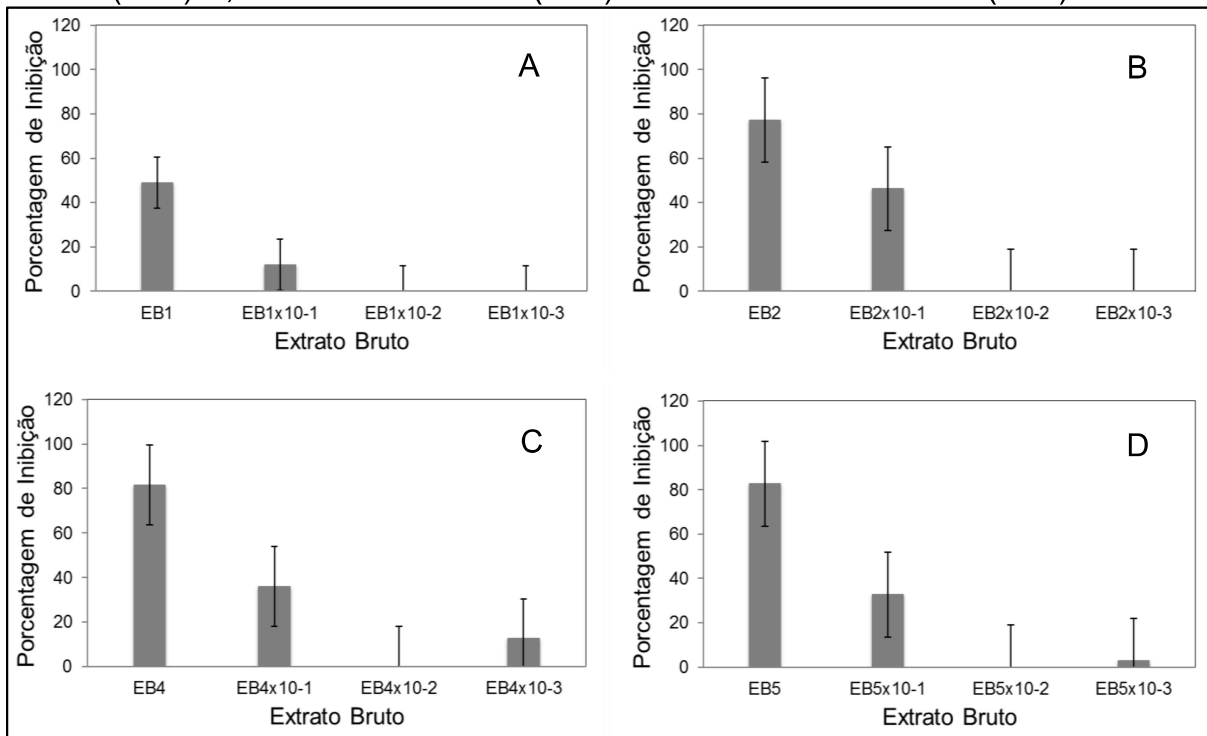


Fonte: próprio autor

Desde o início da fase de crescimento bacteriano, já consegue se enxergar como a concentração de UFC/mL é afetada, ainda nas diluições do extrato até 100 vezes. Mais evidente ainda, nas porcentagens de inibição (Figura 21), onde as diluições até 1×10^{-2} do extrato, inibem pelo menos num 80% o crescimento bacteriano.

No caso de *Staphylococcus aureus*, o comportamento do crescimento contra todos os extratos, apresentou que as diluições maiores (até 1×10^{-2}) têm o efeito inibitório. Consegue-se ver nas figuras da porcentagem de inibição (Figura 22), o efeito inibitório indiferente ao sexo e faixa etária das araias das que foi obtido dito extrato, com maior efeito na maior diluição.

Figura 22 - Avaliação da inibição de *Staphylococcus aureus* vs extratos brutos. (EB com [0,7ug.mL⁻¹ de proteína]) de fêmeas em estado IV (EB2) B, fêmeas no estado II (EB4) C, machos no estado I (EB1) A e machos no estado III (EB5) D.



Fonte: próprio autor

Estes resultados foram suportados pelos ANOVA correspondentes (prévio teste de normalidade e homogeneidade de variância) e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$; $p<0,0001$) e de acordo com isto, o efeito dos extratos foi significativo quando comparado com o controle negativo (inóculo sem extrato). Especialmente para *K. pneumoniae*, onde o teste confirma a significância do efeito, com inibição do 100% (como se fosse o extrato bruto sem diluir) (Figura 22).

6.5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos brutos

Com base nos resultados do efeito dos EB e a significância encontrada nas análises estatísticas, foi realizado o cálculo de MIC, pela Equação de Gompertz: $(\frac{dN}{dt} = rN \ln \frac{K}{N})$, onde $N(t)$, é a população de celular (bactérias o leveduras) no instante t ; r , é a constante de crescimento intrínseca das células, com $r > 0$; K , é a capacidade de carga celular, ou seja, é o tamanho máximo que o mesmo pode ser atingido pelo tratamento (proteínas do EB) e, portanto, temos que $K > 0$ (WIEGAND; HILPERT;

HANCOCK, 2008). Para MICs determinadas, é muito interessante que o efeito é conseguido uma baixa concentração (Tabela 9).

Tabela 9 - MIC dos extratos sobre as cepas testadas.

Microrganismo	MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o valor Regressão							
	EB1	R ²	EB2	R ²	EB3	R ²	EB4	R ²
<i>C. albicans</i>	0,0871	1,0						
			0,0131	1,0				
					ND*	ND*		
<i>P. aeruginosa</i>							ND*	ND*
	ND*	ND*						
			ND*	ND*				
<i>E. coli</i>								
	ND*	ND*						
			ND*	ND*				
<i>K. pneumoniae</i>								
	ND**	ND**						
			ND**	ND**				
<i>S. aureus</i>								
			0,1807	1,0				
				ND*	ND*			
							ND*	ND*

Fonte: próprio autor

ND* Sem inibição suficiente

ND** Inibição total

7 DISCUSSÃO

As condições nos sistemas aquáticos do litoral norte da Colômbia, podem permitir às arraias uma distribuição espacial e temporal mais ampla dos espécimes, permitindo a coleta todo o ano dos indivíduos de todas as faixas etárias para a obtenção dos epitélios. Foi observado que o sistema aquático mencionado teve influência do pulso de inundação, (não tem estações), permite a reprodução todo o ano da espécie *P. magdalenae*, sobrepesando uma das maiores dificuldades no desenvolvimento deste tipo de projetos, que é encontrar os indivíduos (ROMERO *et al.*,2017).

7.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

As análises mostram uma relação entre a população de arraias e as variáveis que caracterizam o sistema aquático. A condutividade apresentou uma relação direta com esses organismos, o que pode se explicar pelo mecanismo dos peixes cartilaginosos de detectar a suas presas pelos impulsos elétricos percebidos nos receptores elétricos na região ao redor da boca. No entanto, essa relação poderia também pode ser um reflexo da qualidade da água determinada por algumas variáveis permite o estabelecimento de outras comunidades biológicas que estão ligadas à ecologia das arraias e sua rotatividade dentro do sistema. Essa correlação significativa vincula a permanência das arraias e os gradientes de concentração da condutividade e a população de macroinvertebrados bentônicos; também a transparência, a profundidade, e o pH, conseguem influenciar nesta composição de organismos. Essa relação pode ser devido ao fato de as águas condutoras e com sólidos dissolvidos, são mais ricas em macroinvertebrados (Ephemeroptera, Trichoptera), itens alimentícios de preferência para a espécie *P. magdalenae* condicionando a seleção do habitat (RAMOS-SOCHA; GRIJALBA-BENDECK, 2011).

Pelo que os resultados das correlações entre as condições físico-químicas e a presença das arraias, permitiram fazer uma seleção dos locais de coleta e assim ter um número representativo de espécimes, igualmente ter a estrutura da população completa. Por outro lado, o sedimento é um habitat muito homogêneo, diferindo apenas pela profundidade, granulometria, concentração de matéria orgânica e composição salina; mas essa comunidade do reservatório, em particular, não tem um

substrato duro à disposição, pois a remoção de sedimentos é alta devido às correntes e também há baixa incidência de luz devido à turbidez pelo nível de sedimentação dos sólidos ser alto. Todas estas características são a causa possível de uma reduzida riqueza de organismos que servem de alimento às arraias necessitando da especialização de organismos neste habitat (bentos). Em consequência, o biótopo bentônico, consegue abrigar um número restrito de espécies, que são tolerantes a esses processos; o que pode explicar a diferença no número de indivíduos encontrados neste substrato quando é influenciado pelo fluxo de água (entrada e saída, segundo o período climático). No sul do sistema, onde está a conexão com o rio, há remoção permanente de sedimentos, enquanto as áreas média e alta do pantanal, são mais estáveis, permitindo que os grupos de macroinvertebrados, fonte de alimento das arraias, incrementem a sua abundância (ROMERO *et al.*, 2017)

É difícil estabelecer um padrão de distribuição espacial para peixes; no entanto, os hábitos das arraias estão ligados a organismos de baixa mobilidade, dependentes do substrato, como alguns artrópodes, anelídeos e moluscos, em estágios iniciais que respondem efetivamente às condições de alcalinidade, condutividade e dureza; o que é consistente com os estudos de autoecologia e adaptação evolutiva deste grupo aos ecossistemas aquáticos epicontinentais (SILVA *et al.*, 2007). Os demais fatores físico-químicos da água não mostram uma clara incidência na distribuição espaço-temporal da população das arraias, mas se uma incidência é observada na composição, apresentando nas condições de um sistema lântico com tendências de meso a eutróficas, onde são selecionadas espécies tolerantes como as arraias, neste caso, *P. magdalenae* como representante do gênero.

7.2 ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA

Com a obtenção do transcriptoma de *P. magdalenae* novos resultados são obtidos para arraias de água doce, com possibilidade de comparação destes resultados, com os dos transcriptomas de referência; considerando a dificuldade de realizar análises com essas espécies, dos quais são os primeiros estudos, conforme expresso por Gomes de Oliveira et al. al., (2016). De fato, o primeiro trabalho deste gênero *Potamotrygon*, nos permite reiterar que as espécies de água doce possuem uma maior riqueza de peptídeos e proteínas ligados ao veneno da que apresentada nas arraias marinhas, pelo observando na análise transcriptômica de *N. kuhlii*

(GOMES DE OLIVEIRA, 2016). Além das outras espécies dulciaquícola, onde foram identificados transcritos de fosfolipases, metaloproteinases ou hialuronidases (MAGALHÃES; SILVA JÚNIOR; ULHOA, 2008).

De acordo com a análise KEGG deste estudo, onde as três espécies do gênero *Potamotrygon* são comparadas, as vias metabólicas representam uma grande parte das classes de transcritos encontradas para as três espécies e compartilham as principais vias metabólicas associadas aos aminoácidos, carboidratos e o metabolismo lipídico (Tabela 6, Figura 17) e, no caso do metabolismo proteico, uma grande representação de enzimas e proteínas especializadas, que leva à produção de veneno, utilizado por essas espécies na defesa e na predação (FRY et al., 2009).

Além disso, a participação do metabolismo de carboidratos que é necessário para modificações pós-traducionais, tipo glicosilação; processo fundamental em organismos em suas funções venômicas e que também associam outras famílias de proteínas relacionadas ao envenenamento, como os fatores ativadores da protrombina (em mecanismos de coagulopatia intravascular disseminada, DIC), como ativador dos zimogênios na cascata da coagulação (ação da trombina) (MAGALHÃES et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011; KUMAR et al., 2011). Outras famílias de proteínas encontradas nos transcritos, já foram descritas como sendo ligadas ao veneno incluindo, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP, do inglês: *Cysteine-Rich Secretory Proteins in Reptile Venoms*); que correspondem a glicoproteínas exclusivas de vertebrados, às quais atribuem funções na reprodução de mamíferos e na produção da peçonha de répteis, além da formação de AMP no bloqueio de canais iônicos, causando paralisia muscular de presas. Da mesma forma que acontece com outros produtos de peçonha, foram encontrados transcritos correspondentes a neurotoxinas causadoras de hiperalgesia (semelhante à α -atrotoxina-Lt1a), um sintoma característico que foi descrito como exacerbado em envenenamentos, acompanhado por paralisia muscular, mesmo como acontece como efeito de outros organismos com peçonha como no caso de aranhas (HE et al., 2013).

Todas essas enzimas, assim como as demais mencionadas, representam as principais causas de intoxicação por arraias, uma vez que os trombos formados por eles podem causar sintomas mais complexos. O trabalho nas arraias do gênero *Potramotrygon* permitiu observar a expressão das principais famílias de enzimas que causam os efeitos tóxicos e conseqüentemente a sintomatologia expressa. Por

exemplo, as hialuronidasas, altamente expressas nos transcritos das três arraias, são fundamentais na difusão de fluidos através da pele através da degradação do ácido hialurônico, contribuindo para a disseminação do veneno, potencializando o envenenamento sistêmico e demonstrando um grande potencial no processo de hemorragia local. Os sintomas descritos nas intoxicações de *P. magdalenae*, assim como *P. amandae* e *P. falkneri*, correspondem à resposta na atividade desta família enzimática. Isto é apoiado no trabalho de caracterização do veneno de *P. amandae* e *P. falkneri* (que ainda não foi realizado em *P. magdalenae*), no qual também foram encontradas fosfolipases A2, abundantes em muitos venenos animais, com toxinas tanto características digestivas e à qual é atribuída atividade neurotóxica, miotóxica, edematogênica, hiperalgésica, pró-inflamatória, hemolítica, hipotensora e citotóxica (GOMES DE OLIVEIRA, 2016); assim como o efeito das metaloproteinases, que em acidentes devido ao envenenamento da arraia, produzem hemorragia e necrose no membro onde ocorre a lesão (Anexos 5, 6 e 7).

A abordagem transcriptômica de estruturas e/ou tecidos produtores de venenos dos peçonhentos, fornece uma visão mais específica dos produtos e vias metabólicas envolvidas nas estratégias de predação e / ou defesa; no caso de arraias de água doce; cuja evidência do efeito está no estudo de casos de envenenamento (TARTAR *et al.*, 2013). Entretanto, após as características comuns do gênero *Potamotrygon*, nesses mecanismos, existem diferenças na expressão dos transcritos, decorrentes das particularidades das espécies (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010). Essas particularidades, refletidas em transcrições exclusivas, poderiam estar ligadas à interação desses organismos com seu ambiente (ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013). É assim que as arraias das bacias brasileiras apresentam grandes semelhanças em seu transcriptoma, em comparação com as espécies da bacia colombiana, das quais foram obtidas transcrições exclusivas, em maior proporção, considerando que a bacia inferior do Rio Magdalena, cujas condições são as típicas dos sistemas limnológicas com conexão terciária ao rio (ROMERO *et al.*, 2017), mantém esta espécie isolada das outras bacias do sul da Colômbia; lembrado que *P. amandae* é uma espécie em comum com o Brasil.

A diversificação entre os venenos pareceu seguir a especiação refletindo a adaptação específica das espécies, e essa divergência pode estar diretamente relacionada às atividades de caça, dieta, defesa, sugerindo uma linha coevolucionária harmônica (MARGRES *et al.*, 2013). Isso permitiria entender as variações nos

componentes das proteínas e as diferenças na interpretação dos sintomas clínicos durante o envenenamento humano e o efeito que eles podem ter sobre outros organismos dos que procura se defender. O que abre uma janela de possibilidades no campo da biotecnologia (JIANG et al., 2013); na busca por moléculas bioativas e com aplicações a novas proteínas com possíveis aplicações terapêuticas (ZELANIS et al., 2012), inclusive proteínas relacionadas à resposta a doenças infecciosas.

De acordo com a informação anterior, neste trabalho se obteve um número de dados interessantes para continuar com a mineração dos mesmos; uma metodologia que é reconhecida atualmente pelos pesquisadores como um tema relevante de aplicação, em diferentes áreas, especialmente na genômica. Com a informação que pudesse depositar nos bancos de dados, pode-se continuar um trabalho de pesquisa de novas informações biológicas sobre os peptídeos do gênero *Potamotrygon*.

Levando em conta que a anotação que permitiu a identificação de peptídeos antimicrobianos anotados, usando diferentes ferramentas, sugeriu um *pool* de candidatos potencialmente adequados para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Tabelas 6, 7 e 8); são necessárias, outros testes usando técnicas de modelagem molecular e atividades para continuar nessa procura. Esses métodos podem ser úteis também para outras proteínas, e não só para PAMs; sem esquecer que nos resultados obtiveram-se um grupo de moléculas não referenciadas anteriormente nos bancos de dados, o que acrescenta, informação a utilizar e no caso dos PAMs. Isto poderia ser útil para desenvolver novos agentes antimicrobianos capazes de combater as bactérias resistentes (PORTO et al., 2017).

Em outro foco de interesse, se encontram os peptídeos antimicrobianos obtidos de fontes naturais (PAMs) com o potencial de se tornarem agentes antimicrobianos valiosos nos próximos anos, uma vez que oferecem amplo espectro de ação, rápida atividade bactericida e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência em comparação com os antibióticos tradicionais de acordo com o descrito por Hincapié e colaboradores (2018). A busca e aprimoramento de metodologias para a descoberta de novos AMPs para o tratamento de bactérias resistentes como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são necessárias para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos e as abordagens transcriptômicas estão ganhando relevância nas últimas décadas; quando vários peptídeos foram descobertos com base em sua capacidade de inibir o crescimento de potenciais patógenos microbianos. Esses PAMs, poderiam ter

possibilidade de ser encontrados, participando da resposta imune inata, fornecendo uma rápida defesa de primeira linha contra a infecção. Gallo e colaboradores (2002), em uma revisão discute a biologia dessas moléculas, com ênfase em sua estrutura, processamento, expressão e função, mostrando que podem ser multifuncionais, atuando tanto como antibióticos naturais quanto como moléculas de sinalização que ativam os processos celulares hospedeiros envolvidos na defesa imunológica e no reparo. Além do que a expressão anormal desses peptídeos também pode se associar à doenças (GALLO et al, 2002).

Para entender os AMPs, é útil revisar sua distribuição, e muito provável que a atividade biológica de cada antibiótico natural individual seja específica para o papel defensivo que o peptídeo deve jogar em diferentes tipos de células. Porque microbiota residente, potenciais patógenos e estresse ambiental são muito diferentes em cada tecido, a expressão padrão e regulação dos PAMs em cada órgão fornecem discernimento sobre sua função e importância (GALLO et al, 2002) e o padrão de expressão e regulação dos PAMs na pele fornece uma ilustração informativa de como estas moléculas participam na defesa imunológica inata. Baixo de condições de repouso, locais de entrada potencial de bactérias, como as estruturas foliculares, produzem pequenas quantidades de AMPs que provavelmente fornecem uma barreira química à infecção onde um físico está ausente. Depois da lesão, a pele reage rapidamente pelo aumento da produção de AMPs do epitélio e deposição de AMPs de degranulação de neutrófilos recrutados. A pele fornece nas secreções, que age como barreira à proliferação microbiana que é ativada após detecção de uma falha na barreira física que a pele mesma representa (IMRAN *et al.* 2018). Nas arraias é um reservatório de organismos e moléculas que interatuam e permitem a homeostases destes organismos.

De acordo com Felício e Colaboradores (2017) as infecções crônicas que são capazes de facilitar à aparição e progressão do câncer; devido à instabilidade no sistema imunológico que permite que as células cancerosas proliferem. Felício e colaboradores (2017) amostraram que o sistema imune inato de uma ampla gama de organismos e pessoas que sofrem de câncer e infecções multirresistentes aumentou, pelo que ambas as doenças já são vistas como as principais causas de morte atuais e futuras. Além disso, a debilidade física associada ao câncer ou à própria terapia antineoplásica abre o caminho para infecções oportunistas; demandando o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, com maior eficiência e menores

efeitos colaterais. As arraias do gênero *Potamotrygon* têm sido identificadas tanto pela presença de muitas moléculas de interesse terapêutico (MAGALHÃES *et al.*, 2006; 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011) quanto baixa taxa de infecções (DOSAY-AKBULUT, 2006), visando-se como uma fonte promissora para as moléculas alternativas às que atualmente são usadas contra infecções, como o caso dos peptídeos antimicrobianos. Esses peptídeos já foram descritos como moléculas que apresentam mecanismos de morte no nível da membrana, mas também atuam em direção a alvos intracelulares, o que aumenta o seu sucesso em comparação com drogas específicas de um alvo, de acordo com os ensaios clínicos (FELÍCIO *et al.*, 2017).

Outro tipo de moléculas encontradas nas análises bioinformáticas são as dos domínios ZF responsáveis da estabilidade da matriz extracelular (MEC); vinculadas a processos complexos, incluindo adaptações bioquímicas nas metaloproteinases. De Sousa e colaboradores (2018), desenvolveram um trabalho testando moléculas similares, concluindo uma regulação positiva da atividade da MMP-2 dos músculos em envelhecimento, sugerindo que ela pode ser uma ferramenta útil para a manutenção do remodelamento da MEC (DE SOUSA *et al.*, 2018)

7.3 ANÁLISES FUNCIONAIS

Os resultados das provas *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos brutos mostraram que estatisticamente, não se apresentaram diferenças significativas pela faixa etária nem os sexos; embora, as porcentagens de inibição (Figuras 18-24) permitem ver que os extratos dos indivíduos maiores não mantêm esse efeito até as diluições 1×10^{-3} como acontece com os extratos dos organismos de menor estágio; independentemente do sexo. Na literatura não há uma referência no efeito inibitório antimicrobiano do veneno das arraias em geral, mas ao comparar com os organismos mais perto delas, se tem as serpentes, e no particular a *Bothrops jararaca*, de que se conta que com estudos multiplex do proteoma do veneno; onde se apresenta variação considerável do efeito na transição de recém-nascidos a adultos, que é associado com mudanças na dieta de presa ectotérmica no início da vida até a presa endotérmica na idade adulta (ZELANIS *et al.*, 2012). Além disso, a comparação do teor da codificação das toxinas (por EST *expressed sequence tags*) em glândulas de veneno de machos

e fêmeas apresentou algumas diferenças entre os sexos; deixando aos machos como os que possuem o maior efeito.

Nos bioensaios contra as leveduras e as bactérias testadas, os extratos brutos foram ativos significativamente contra *Candida albicans* e *K. pneumoniae* em primeiro lugar; com inibição até do 100% nas diluições maiores (1×10^{-4}) e com uma atividade menor para *P. aeruginosa*, e *E. coli*; em quanto com *S. aureus* a atividade foi baixa; porém os efeitos avaliados apresentaram baixas concentrações inibitórias mínimas (Tabela 10). O que pode ser o ponto de início para começar a pesquisar sobre a composição deste extrato e testes específicos com as frações do mesmo, para definir os peptídeos causantes do efeito, especialmente em bactérias Gram⁻ e leveduras.

Além disso, no futuro, a atividade bactericida e as informações sobre os possíveis mecanismos de ação, poderiam ser descritas com estudos de microscopia eletrônica de varredura, mesmo como tem sido feito na produção de antibióticos como ácido clavulânico ou cefamicina; antimicrobianos que foram obtidos a partir de uma aproximação no que se descobriram genes relevantes, que as análises genômicas do *Streptomyces clavuligerus*, negligenciaram (AYALA-RUANO *et al.*, 2019).

No caso das serpentes, pode-se enxergar que as pesquisas envolvendo o veneno, superaram gradualmente a simples descoberta de novas moléculas utilizando processos de purificação e caracterização estrutural, estendendo-se à identificação de seus alvos moleculares e à avaliação de seu potencial terapêutico (SIMÕES-SILVA, *et al* 2018). No entanto, isso só se tornou possível devido ao progresso constante em biologia experimental e abordagens de purificação de proteínas. Na revisão feita pelo Simões-Silva e colaboradores (2018), abordaram os principais componentes dos venenos de serpentes que foram investigados para fins biotecnológicos, e a descoberta de biomoléculas promissoras obtidas pela purificação de alto grau, o que resultou no conhecimento de proteínas e peptídeos com diferentes aplicações biomédicas e biotecnológicas. Eles, acreditam que os avanços experimentais e computacionais significativos, surgirão em proporções semelhantes nos próximos anos, o que permitirá aos pesquisadores mapear as regiões moleculares responsáveis por suas ações farmacológicas, seus respectivos mecanismos de ação e seus alvos celulares (SIMÕES-SILVA, *et al* 2018).

Com a problemática atual, na que cada vez mais antibióticos são tornados ineficazes por bactérias resistentes aos medicamentos, o foco deve ser mudado para terapias alternativas para o tratamento de infecções. Embora várias alternativas já

existam na natureza, o desafio é implementá-las no uso clínico. Avanços na biotecnologia, engenharia genética e química sintética abriram novos caminhos para a busca de terapias que possam substituir os antibióticos.

De acordo com o relatado anteriormente, as moléculas obtidas de fontes naturais, fornecem uma introdução às várias abordagens promissoras que foram adotadas a esse respeito (GHOS *et al.*, 2019) e em alguns casos, precisa-se usar as estratégias de modificação. O exemplo que melhor explica é o dos peptídeos cíclicos ricos em prolina, que produz a esponja marinha, porém que posteriormente foram sintetizados de modo com o fim de melhorar a atividade da de dois dos seus análogos que contêm o grupo fluoreto de sulfonilo e um derivado substituído com arginina. Exibindo assim, uma citotoxicidade significativamente aumentada contra células de câncer, contribuindo para a melhoria da atividade antitumoral. Apresentando-se este, como um modelo de uma estratégia de referência que fornece um método para melhorar a atividade de peptídeos obtidos de fontes naturais (WU *et al.*, 2018).

8 CONCLUSÕES

A espécie *P. magdalenae* apresentou grande afinidade pela condutividade da água, evidenciado no maior número de indivíduos coletados nas estações mais condutivas que conseguem separar do resto do sistema nos períodos de seca, constituindo um gradiente que leva consigo a presença das arraias.

A abordagem transcriptômica de estruturas e/ou tecidos produtor de venenos nesses organismos fornece uma visão mais específica dos produtos e vias metabólicas envolvidas nas estratégias de predação e/ou defesa.

Pode-se salientar que além de confirmar as características comuns nas vias metabólicas envolvidas na defesa do gênero *Potamotrygon*, nesses mecanismos, existem diferenças na síntese, decorrentes das particularidades das espécies (ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013).

As particularidades de cada espécie, refletidas em transcrições exclusivas, poderiam estar ligadas à interação desses organismos com seu ambiente. As espécies das bacias brasileiras apresentam grande semelhança em seu transcriptoma, em comparação com as espécies da bacia colombiana, das quais foram obtidas transcrições exclusivas, em maior proporção. Isso permitiria entender as variações nos componentes das proteínas e as diferenças na interpretação dos sintomas clínicos durante o envenenamento humano e o efeito que eles podem ter sobre outros organismos. Isso representa uma grande possibilidade no campo da biotecnologia; através da bioprospecção de moléculas bioativas e com aplicações farmacológicas de novas proteínas com potenciais aplicações terapêuticas, inclusive relacionadas à resposta a doenças infecciosas, e no caso particular de transcritos de *P. magdalenae* relacionados à atividade antimicrobiana.

A abordagem transcriptômica não é importante apenas para bioprospecção de moléculas, mas também para preencher as lacunas de informação dessas espécies carentes de estudos sobre sua biologia. O presente estudo, amostra uma espécie pouco explorada *P. magdalenae*, que poderia ser fonte de compostos bioativos de uso potencial no setor farmacêutico. Inicialmente, desde um análise utilizando ferramentas de bioinformática, levando em conta o potencial dos PAMs preditos neste trabalho e que juntamente com as caracterizações e bioensaios necessários, permitiriam determinar a ação específica do veneno.

Em relação aos resultados de bioprospecção inicial do veneno do ferrão, nos bioensaios com os extratos brutos contra *K. pneumoniae* o efeito inibitório de 100% e a significância do teste, ainda nas menores diluições, constitui um resultado importante para continuar na busca de atividade antibacteriana, especialmente em bactérias Gram⁻. De maneira similar, com as leveduras. *C. albicans* submetidas ao extrato bruto do ferrão, o crescimento foi inibido significativamente nas maiores diluições. Os resultados do bioensaio de atividade *in vitro* podem ser considerados como promissores, demonstrando alto potencial antimicrobiano do extrato do ferrão das araias.

Outro aspecto em destaque é que o sexo e a faixa etária das araias provavelmente não determinam o efeito inibitório do extrato, de acordo com o encontrado nos bioensaios. Os extratos não apresentam diferenças significativas relativas ao sexo dos espécimes, já que os extratos obtidos para ambos, tem efeito sobre *C. albicans* e a *K. pneumoniae*, e em menor porcentagem de inibição sobre, *E. coli* e *P. aeruginosa*, até incluindo *S. aureus*; resultados que são promissores ao ver que o efeito pode ser mantido ainda nas maiores diluições.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. P. **Pesca, policromatismo e aspectos sistemáticos de *Potamotrygon scobina* Garmam, 1913 (Chondrichthyes : Potamotrygonidae) da região da Ilha de Colares - Baía de Marajó - Pará.** 2003. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará, 2003.
- ALMEIDA, M. P., LINS, P. M. O., CHARVET-ALMEIDA, P., BARTHEM, R. B. Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, Brazil, v. 70, p. 155–162, 2010.
- American Public Health Association (APHA): American Water Works Association: Water Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** Disponível em: <https://www.awwa.org/>. Acesso em: 23 jun. 2018.
- ARAÚJO, M. L. G., CHARVET-ALMEIDA, P., ALMEIDA, M. P., PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. **Information document AC**, Brazil, 20.8: 1-6, 2004.
- ASCHLIMAN, N. C., NISHIDA, M., MIYA, M., INOUE, J. G., ROSANA, K. M., NAYLOR, G. J. Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Washington, v. 63, n. 1, p. 28–42, abr. 2012.
- BADUEL, C., TOWNSEND, K., MUELLER, J. F. Size and age-concentration relationships for perfluoroalkyl substances in stingray livers from eastern Australia. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 496, p. 523–530, 5 out. 2014.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Xi'an, China v. 6, n. 2, p. 71–79, 2015.
- BARBARO, K. C., SADIKI, M., IBNSOUDA, S. K. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, London, v. 50, n. 5, p. 676–687, out. 2007.
- BOUZID, W., KLOPP, C., VERDNAUD, M., DUCANCEL, F., VÉTILLARD, A. Profiling the venom gland transcriptome of *Tetramorium bicarinatum* (Hymenoptera: Formicidae): The first transcriptome analysis of an ant species. **Toxicon**, London, v. 70, p. 70–81, ago. 2013.
- 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**, Auckland, 2776(1), 13-48, 2011.

CASTELLANOS ROMERO, K., DEL RÍO, J. P., VILLARREAL, K. C., ANILLO, J. C. C., ZARATE, Z. P., GUTIERREZ, L. C., *et al.* Lentic water quality characterization using macroinvertebrates as bioindicators: An adapted BMWP index. **Ecological Indicators**, New York, v. 72, 2017.

CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G., ROSA, R. S., RINCÓN, G. Neotropical *Freshwater stingrays*: diversity and conservation status. **Shark News**, Gland, Switzerland, 14: 47-51, 2002.

CONCEIÇÃO, K., SANTOS, J. M., BRUNI, F. M., KLITZKE, C. F., MARQUES, E. E., BORGES, M. H., *et al.* Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbigny* freshwater stingray venom. **Peptides**, Fayetteville, N. Y., v. 30, n. 12, p. 2191–2199, 2009.

CRAWLEY, M. J. **The R book**. John Wiley & Sons, New York, United States, 2012.

CRUZ, V. P. **Estudos genéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na Bacia do Rio Paraná**. 2013. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

DELAYE, L., POSSANI, L. D., HERRERA-ESTRELLA, A. Global Transcriptome Analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: New toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 7, n. 8, 2012.

DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de raias d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). **Comptes Rendus Biologies**, Paris : Elsevier, 329.7: 483-493, 2006.

DOSAY-AKBULUT, M. Specification of phylogenetic interrelations between skate-rays and sharks. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, New York, v. 42, n. 2, p. 128–133, mar. 2006.

ENZOR, L. A., WILBORN, R. E.; BENNETT, W. A. Toxicity and metabolic costs of the *Atlantic stingray* (*Dasyatis sabina*) venom delivery system in relation to its role in life history. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 409, n. 1–2, p. 235–239, 2011.

FREDERICO, R. G. FARIAS, I. P., ARAÚJO, M. L. G. D., CHARVET-ALMEIDA, P., ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Muller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 10, n. 1, 2012.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, Cold Spring Harbor, NY, 15.3: 403-420, 2005.

FRY, B. G. K., CHAMPAGNE, D. E., SCHEIB, H., TYNDALL, J. D., KING, G. F., RENJIFO, C. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. **Annual Review Genomics Human Genetic**, Palo Alto, CA, v. 10, p. 483–511, 2009.

GARCIA, D., LASSO, C. A., MORALES, M., CABALLERO, S. J. Molecular systematics of the *Freshwater stingrays* (myliobatiformes: potamotrygonidae) of the Amazon, Orinoco, Magdalena, Esequibo, Caribbean, and Maracaibo basins (Colombia – Venezuela): evidence from three mitochondrial genes. **Mitochondrial DNA**, Singapore : Springer, v. 1736, 2015.

GOMES, N. **Análises transcritômicas comparativas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* Análises transcritômicas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* : o primeiro estudo transcritômico do ferrão de espécies de arraia.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 2014.

GRABHERR, M. G., HAAS, B. J., YASSOUR, M., LEVIN, J. Z., THOMPSON, D. A., AMIT, I., *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature biotechnology**, New York, 29.7: 644-652, 2011.

GRABMÜLLER, M., MADEA, B., COURTS, C. Comparative evaluation of different extraction and quantification methods for forensic RNA analysis. **Forensic Science International: Genetics**, Amsterdam, v. 16, p. 195–202, 2015.

HADDAD JR, V., ZHANG, B., ZHU, J., ZHANG, Q., HU, Y., WANG, S., *et al.* Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, London, 43.3: 287-294, 2004

HE, Q. DUAN, Z., YU, Y., LIU, Z., LIU, Z., LIANG, S. The venom gland transcriptome of *Iatrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 8, n. 11, 2013.

HU, H., BANDYOPADHYAY, P. K., OLIVERA, B. M., YANDELL, M. Elucidation of the molecular envenomation strategy of the cone snail *Conus geographus* through transcriptome sequencing of its venom duct. **BMC genomics**, London, 13.1: 284, 2012.

JACOBSEN, I. P.; BENNETT, M. B. A Comparative analysis of feeding and trophic level ecology in stingrays (Rajiformes; Myliobatoidei) and electric rays (Rajiformes: Torpedinoidei). **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 8, n. 8, 2013.

JIANG, L., LIU, C., DUAN, Z., DENG, M., TANG, X., LIANG, S. Transcriptome analysis of venom glands from a single fishing spider *Dolomedes mizhoanus*. **Toxicon**, London, v. 73, p. 23–32, out. 2013.

JÚNIOR, N. G. D. O., DA ROCHA FERNANDES, G., CARDOSO, M. H., COSTA, F. F., DE SOUZA CÂNDIDO, E., NETO, D. G., *et al.* Venom gland

- transcriptome analyses of two *Freshwater stingrays* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Scientific Reports**, Brazil, v. 6, 26 fev. 2016.
- KUMAR, K. R., ZHANG, B., ZHU, J., ZHANG, Q., HU, Y., WANG, S., *et al* Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Norwell, MA, v. 31, n. 4, p. 464–471, 2011.
- LE PORT, A.; LAVERY, S. Population structure and phylogeography of the short-tailed stingray, *Dasyatis brevicaudata* (Hutton 1875), in the southern hemisphere. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 174–185, mar. 2012.
- LIMSUWANMANEE, J. CHAIJAN, M., MANURAKCHINAKORN, S., PANPIPAT, W., KLOMKLAO, S., BENJAKUL, S. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from stingray (*Himantura signifier*) non-protein nitrogenous fraction and sugar model systems. **LWT - Food Science and Technology**, Berlin/Heidelberg, v. 57, n. 2, p. 718–724, 2014.
- LIU, Z. C., ZHANG, R., ZHAO, F., CHEN, Z. M., LIU, H. W., WANG, Y. J., *et al*. Venomic and transcriptomic analysis of centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. **Journal of proteome research**, United States, 11.12: 6197-6212, 2012.
- LOBODA, T. S.; CARVALHO, M. R. DE. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 11, n. 4, 2013.
- MA, Y. HE, Y., ZHAO, R., WU, Y., LI, W., CAO, Z. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: Implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 5, p. 1563–1576, 2011.
- MAGALHÃES, K. W. LIMA, C., PIRAN-SOARES, A. A., MARQUES, E. E., HIRUMA-LIMA, C. A., LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. **Toxicon**, London, v. 47, n. 5, p. 575–583, abr. 2006.
- MAGALHÃES, M. R.; SILVA JÚNIOR, N.; ULHOA, C. J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (Freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. **Toxicon**, London, v. 51, n. 6, p. 1060–1067, 2008.
- MALDONADO-OCAMPO, J. A., VARI, R. P., USMA, J. S. Checklist of the freshwater fishes of Colombia. **Biota Colombiana**, Colombia, v. 9, n. 2, p. 143–237, 2008.
- MARGRES, M. J., ARONOW, K., LOYACANO, J., ROKYTA, D. R. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. **BMC genomics**, London, 14.1: 531, 2013.

MEJÍA-FALLA, P. A.; NAVIA, A. F.; PUENTES, V. **Guía para la identificación de especies de tiburones, rayas y quimeras de Colombia**. Fundación Squalus, Bogotá, 2011.

MEJÍA-FALLA, P. A. CORTÉS, E., NAVIA, A. F., ZAPATA, F. A. Age and growth of the round stingray *Urotrygon rogersi*, a particularly fast-growing and short-lived elasmobranch. **PLoS ONE**, San Francisco, CA, v. 9, n. 4, 28 abr. 2014.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J. CONCEIÇÃO, K., SEIBERT, C. S., MARQUES, E. E., SILVA JÚNIOR, P. I., SOARES, A. B., .*et al.* Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 1368–1377, set. 2011.

MORO, G.; CHARVET, P.; ROSA, R. S. Insectivory in *Potamotrygon signata* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), an endemic freshwater stingray from the Parnaíba River basin, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Brazil, 2012, 72.4: 885-891.

ODDONE, M. C.; VELASCO, G.; CHARVET, P. Record of the freshwater stingrays *Potamotrygon brachyura* and *P. motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) in the lower Uruguay River, South America. **Acta Amazonica**, Brazil, 42.2: 299-304, 2012.

OULART, E. R. G. Trophic ecomorphology of *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) on the upper Paraná river floodplain, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, Brazil, v. 4, p. 436–445, 2009.

PEDROSO, C. M., JARED, C., CHARVET-ALMEIDA, P., ALMEIDA, M. P., NETO, D. G., LIRA, M. S., *et al.* Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and *Freshwater stingrays*. **Toxicon**, London, v. 50, n. 5, p. 688–697, out. 2007.

PI, C. LIU, J., PENG, C., LIU, Y., JIANG, X., ZHAO, Y., *et al.* Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. **Genomics**, United States, NY, v. 88, p. 809–819, 2006.

RAMOS-SOCHA; GRIJALBA-BENDECK. Bioecología de la raya de agua dulce (Myliobatiformes) en la Ciénaga de sabayo , Bioecology of the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* (Duméril , 1865) (Myliobatiformes). **Ciénaga de sabaayo**, New York, v. 227, p. 109–118, 2011.

REMIGIO, E.; DUDA, T. Evolution of ecological specialization and venom of a predatory marine gastropod. **Molecular Ecology**, Hoboken, NJ, v. 17, p. 1156–1162, 2008.

RINCON FILHO, G. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau)(Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no Rio Paraná-Tocantins**. 2006. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, São Paulo, 2006.

ROKYTA, D. R. LEMMON, A. R., MARGRES, M. J., ARONOW, K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC genomics**, London, 13(1), 312, 2012.

ROKYTA, D. R.; WRAY, K. P.; MARGRES, M. J. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. **BMC genomics**, London, 14.1: 394, 2013.

ROMERO-GUTIE, M. T.; VALDEZ-VELA, L. L. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **PloS one**, San Francisco, CA, v. 8, n. 6, 2013.

SAULINO, H. H. L.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Macroinvertebrados aquáticos associados às raízes de *Eichhornia azuera* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae) em uma lagoa marginal no Pantanal, MS. **Biotemas**, Brazil, v. di, n. 3, p. 65–72, 2014.

SHIBUYA, A.; ZUANON, J.; TANAKA, S. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). **Neotropical ichthyology**, São Paulo, 10.1: 189-196, 2012.

SILVA, T. B.; UIEDA, V. S. Preliminary data on the feeding habits of the Freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Biota Neotropica**, Brazil, v. 7, n. 1, p. 0–0, 2007.

SILVA, J. P. C. B., DE CARVALHO, M. R. A taxonomic and morphological redescription of *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 209–232, 2011a.

TERRAT, Y. BIASS, D., DUTERTRE, S., FAVREAU, P., REMM, M., STÖCKLIN, R., *et al.* Toxicon High-resolution picture of a venom gland transcriptome: Case study with the marine snail *Conus consors*. **Toxicon**, London, v. 59, n. 1, p. 34–46, 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**, Dordrecht, Norwell, v. 23, n. 4, p. 299–314, 1988.

VENKATESH, B.; ERDMANN, M. V; BRENNER, S. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 98, p. 11382–11387, 2001.

WALKER, J. M. **Antibiotic Resistance protocols**. 2 ed. London: Springer Protocols, Humana Press, Totowa, Nova Jersey, 2010.

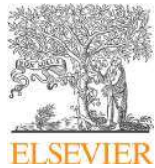
WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocol**, London, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

ZELANIS, A. ANDRADE-SILVA, D., ROCHA, M. M., FURTADO, M. F., SERRANO, S. M., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L., *et al.* A Transcriptomic View of the Proteome Variability of Newborn and Adult Bothrops jararaca Snake Venoms. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 15–18, 2012.

ZHU, J. YAN, K., LU, L., PENG, C., ZHOU, C., CHEN, S., *et al.* Molecular cloning and characterization of CD9 cDNA from cartilaginous fish, red stingray, *Dasyatis akajei*. **Molecular Immunology**, Oxford, UK, v. 43, n. 10, p. 1534–1540, abr. 2006.

APÊNDICE A - Artigo publicado durante o doutorado

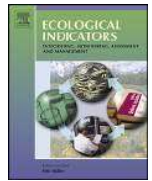
Ecological Indicators 72 (2017) 53–66



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind



Lentic water quality characterization using macroinvertebrates as bioindicators: An adapted BMWP index



Karina Castellanos Romero^{a,b}, Javier Pizarro Del Río^b, Kelly Cuentas Villarreal^b, José Camilo Costa Anillo^c, Zaskia Pino Zarate^b, Luis Carlos Gutierrez^b, Octavio Luiz Franco^{d,e,*}, Jorge W. Arboleda Valencia^{b,f}

^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Ciências Biológicas, Rua Jose Lourenço Kelmer s/n Martelos, Bairro São Pedro Juiz de Fora MG CEP 36036330 Brazil

^b Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología Km 7 vía Puerto Colombia, Colombia

^c Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca AUNAP, Calle 22 #4-70 Edificio Galaxia Oficina 321, Barranquilla, Colombia

^d Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B Avenida W5, CEP 70790160, Brasília, DF, Brazil

^e S-Inova Biotech, Pos Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Avenida Tamarandê 6000, Jardim Seminário, Campo Grande, MS, CEP 79117900, Brazil

^f Universidad de Manizales, Centro de Investigaciones en Medio Ambiente y Desarrollo, CIMAD, Cr 9 No. 19-03, Manizales, Caldas, 17001, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2016

Accepted 14 July 2016

Keywords:

Water quality
Bioindication
Lentic system
Lowland
Macroinvertebrates
BMWP_L (Biological Monitoring Working Party in Lowland lentic systems)

ABSTRACT

Water quality in lowland lentic system was evaluated through the use of aquatic macroinvertebrates as bioindicators, and their relationship with basic physicochemical factors was considered; thus, two biotopes were established for identifying both groups of macroinvertebrates, one being the population associated with macrophytes (AM) and the other being benthic (B). As a result, 46 families of macroinvertebrates were collected, with Hydrobiidae, Chironomidae, Thiaridae and Polymitarcyidae being the most abundant in the system. In addition, families with high tolerance to extreme conditions, such as Ceratopogonidae, Chironomidae and Syrphidae, were found, as well as some families with low tolerance to these conditions, such as Caenidae and Leptoceridae. The first biotope presented 7.189 individuals (50.42%) and the second 7.056 (49.5%), for a total of 14.259 individuals. Biotope AM presented 100% of the richness, while biotope B was significantly less rich, with 15 families, which represent 32.06%. In order to evaluate the families found in the lowland lentic system, their distribution in the ranges of variation of the physicochemical factors and tolerance levels was taken into account. As a consequence, a new score table was established, where this system obtained a total score of 207 with an average of 166 per sampling station, suggesting signs of contamination. Finally, these results allow an adaptation of the *BMWP* (Biological Monitoring Working Party) index to be proposed, including the lowland lentic systems.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Until the last century, the methodologies to study and monitor water resources were almost exclusively based on physicochem-

ical analysis (Alba-Tercedor, 1996; Hawkes, 1998). Nevertheless, the increase in new contaminant products, as well as the fact that polluting effluents are usually specific in time, encourages the use of unusual methodologies (Zamora-Muñoz et al., 1995). Amongst them is included bioindication by using aquatic macroinvertebrates, a methodology that shows efficacy in the detection and mapping of alteration in water quality (Prat et al., 2006; Duran and Suicmez, 2007; Abarca, 2007). Besides, its use is cheap, fast and accurate, reflecting the conditions that existed long ago, while conventional analytical methods offer a momentary assessment of the system. The implementation of these methodologies does not necessarily involve the elimination of the analytical methods, which could be useful for further analysis in conflicting sections, such as specific waste dumping (MacNeil et al., 2010; Colpo et al.,

* Corresponding author at: Universidade Católica de Brasília. SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Módulo C., Brasília, DF, Brazil.

E-mail addresses: karinaicr@yahoo.es, karinacastellanos@mail.uniatlantico.edu.co (K. Castellanos Romero), fotopizarro@gmail.com (J. Pizarro Del Río), cuentasvillarreal@hotmail.com (K. Cuentas Villarreal), jose.costa@aunap.gov.co (J.C. Costa Anillo), zaskiapino@hotmail.com (Z. Pino Zarate), rotifero1@gmail.com (L.C. Gutierrez), ocfranco@pos.ucb.br, ocfranco@gmail.com (O.L. Franco), jwarboleda@gmail.com (J.W. Arboleda Valencia).

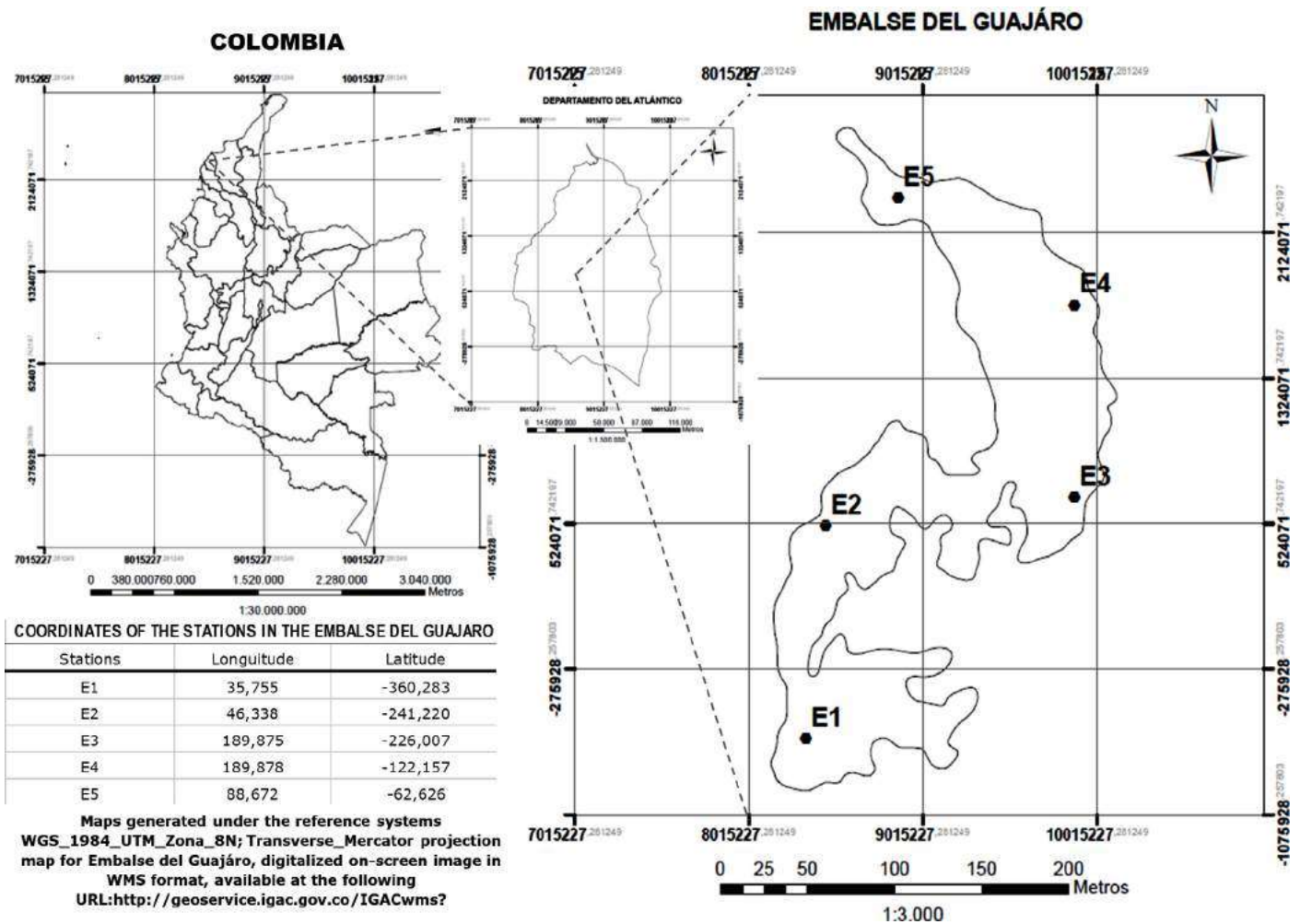


Fig. 1. Study area location showing stations E1, E2, E3, E4 and E5 used in the sampling area.

Table 1

Methods for physicochemical analysis used in this study.

Variable	Convention	Method (APHA AWWA-WPCF 2012)
Physicochemical		
Depth (cm)	Dep	SM Bathymetric 2130 B
Transparency (cm)	Tran	SM Bathymetric 2130 B
pH (Und. de pH)	pH	SM Electrometric 4500 H + B
Temperature (°C)	T	SM Electrometric 2550B
Dissolved Oxygen (mg/L)	DO	SM Azido Modification 4500-O C
Alkalinity (mg/L CaCO ₃)	Alk	SM Titration 2320 B
Hardness (mg/L Ca + 2 + Mg + 2)	Hn	SM EDTA Titrimetric 3500-Mg B
Conductivity (uS/cm) (<i>in situ</i>)	Cdv	SM Electrometric 2510 B
Biochemical oxygen demand (mgO ₂ /L)	BOD5	SM Test BOD 5210 B
Suspended solids (mg/L)	SS	SM Gravimetric 2540 D
Sulphates (mg SO ₄ -2/L)	SOx	SM Acetic acid Turbidity 4500 SO4-E
Nitrates (mg NO ₃ /L)	NOx	SM Spect. Uv 4500 NO3-B
Ammonia nitrogen (mg NH ₃ -N/L)	NHx	SM NH ₃ -N 4500C
Phosphates (mg P-PO ₄ /L)	POx	SM Spect. 4500 P – E
Hydrobiological		
Macrophytes Associated Macroinvertebrates	AM	SM 10500 A–D
Benthic Macroinvertebrates	B	SM 10500 A–D

2009; Nubia et al., 2009). All these aspects have been considered in the implementation of this methodology in many countries around the world (Czerniawska-Kusza, 2005; Królak and Korycińska, 2008; Varnosfaderany et al., 2010; Suleiman and Abdullahi, 2012). However, its use has been concentrated in lotic and lentic systems from high and low latitudes as well as at high altitude in the

Neotropic (Pinilla, 2010; Trama and Marcauzco, 2013; Ramírez and Gutiérrez-Fonseca, 2014).

Around the world, there are many researchers working on the setting of the most common index that uses aquatic macroinvertebrates, called BMWP (Biological Monitoring Working Party). This index is modified according to the present biodiversity settings present in these places (Mustow, 2002; Roche et al.,

Table 2Physicochemical factors of water in the lowland lentic wetland. The values represent average of five replicates \pm standard deviation by station (E1, E2, E3, E4 and E5).

Station													
Month	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	
E1													
T	29 \pm 0.2	34 \pm 0.8	33 \pm 0.4	32 \pm 0.4	31 \pm 0.3	29 \pm 0.6	32 \pm 0.5	34 \pm 0.8	36 \pm 0.4	30 \pm 0.6	32 \pm 0.4	32 \pm 0.5	
Tran	32 \pm 2.5	29 \pm 4.0	20 \pm 2.0	16 \pm 3.0	15 \pm 2.5	19 \pm 5.0	18 \pm 1.0	19 \pm 1.0	19 \pm 2.0	24 \pm 3.5	23 \pm 2.0	18 \pm 4.5	
Dep	178 \pm 9.5	176 \pm 5.0	175 \pm 4.5	113 \pm 2.5	93 \pm 3.5	109 \pm 4.5	93 \pm 3.5	126 \pm 4.0	118 \pm 2.5	136 \pm 7.5	94 \pm 5.0	140 \pm 3.5	
DO	9.4 \pm 1.6	7.67 \pm 3.3	5.3 \pm 2.7	4.35 \pm 2.9	4.7 \pm 1.3	4.75 \pm 3.4	9.05 \pm 3.5	5.45 \pm 1.4	4.7 \pm 2.6	6.55 \pm 2.1	4.5 \pm 1.5	4.7 \pm 0.8	
pH	8.17 \pm 1.2	7.3 \pm 0.8	8 \pm 0.2	8.03 \pm 0.2	8.75 \pm 0.3	8.85 \pm 0.5	9.62 \pm 0.8	8.3 \pm 0.6	8.3 \pm 0.5	8.55 \pm 0.3	8.46 \pm 0.2	7.67 \pm 0.2	
Cdv	670 \pm 6.0	420 \pm 8.0	770 \pm 5.0	1060 \pm 6.0	750 \pm 6.5	810 \pm 6.0	1180 \pm 3.0	1060 \pm 4.5	880 \pm 8.0	1220 \pm 5.0	720 \pm 6.5	840 \pm 6.0	
SS	120 \pm 44.5	120 \pm 32.0	456 \pm 40.0	160 \pm 35.5	414 \pm 40.0	476 \pm 35.0	454.5 \pm 29.5	116 \pm 34.0	116 \pm 40.0	406 \pm 36.0	280 \pm 28.5	222 \pm 44.5	
Alk	68 \pm 6.7	73 \pm 10.7	128 \pm 10.9	100 \pm 9.6	170 \pm 7.8	196 \pm 8.2	148 \pm 10.0	136 \pm 10.6	104 \pm 10.2	112 \pm 10.0	128 \pm 9.8	93 \pm 9.0	
Hn	70 \pm 8.7	74 \pm 10.4	115 \pm 11.1	130 \pm 10.0	159 \pm 10.7	180 \pm 10.2	157 \pm 9.6	90 \pm 10.0	100 \pm 9.6	116 \pm 10.2	130 \pm 9.2	79 \pm 8.5	
Nox	0.7 \pm 0.1	0 \pm 0.1	0.25 \pm 0.1	0.25 \pm 0.1	0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	
NHx	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	
POx	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	
BOD	2.6 \pm 1.0	2.9 \pm 1.0	2.6 \pm 1.0	1.6 \pm 1.0	2.2 \pm 1.0	2.15 \pm 1.0	9.05 \pm 1.0	1.77 \pm 1.0	1.2 \pm 1.0	5.75 \pm 1.0	3.3 \pm 1.0	3.3 \pm 1.0	
E2													
T	29 \pm 0.5	32 \pm 0.3	30 \pm 0.2	33 \pm 0.4	32 \pm 0.5	34 \pm 0.5	33 \pm 0.7	33 \pm 0.7	35 \pm 0.6	33 \pm 0.5	35 \pm 0.4	33 \pm 0.5	
Tran	31 \pm 3.0	35 \pm 2.5	30 \pm 3.0	26 \pm 4.0	23 \pm 2.0	20 \pm 2.5	25 \pm 2.5	51 \pm 3.5	31 \pm 5.0	26 \pm 7.0	19 \pm 5.5	34 \pm 4.5	
Dep	230 \pm 10.3	190 \pm 9.8	155 \pm 9.2	130 \pm 11.2	107 \pm 7.3	104 \pm 9.4	142 \pm 11.2	160 \pm 13.2	125 \pm 9.0	196 \pm 12.3	123 \pm 11.9	173 \pm 10.0	
DO	7.6 \pm 0.2	3.05 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2	5.4 \pm 0.7	5 \pm 0.5	5.3 \pm 0.5	6.4 \pm 0.7	6 \pm 0.9	5.5 \pm 0.7	8.1 \pm 0.9	5.3 \pm 0.9	7 \pm 0.5	
pH	8.06 \pm 0.5	7.3 \pm 0.8	7.8 \pm 0.8	8.48 \pm 1.0	8.98 \pm 0.9	8.83 \pm 0.7	9.34 \pm 1.3	8.88 \pm 1.4	8.93 \pm 0.9	9.23 \pm 0.6	10.03 \pm 0.3	8.34 \pm 0.5	
Cdv	590 \pm 12.0	1900 \pm 16.0	600 \pm 12.0	1560 \pm 16.0	860 \pm 15.0	1020 \pm 10.0	1040 \pm 12.0	1520 \pm 13.0	1380 \pm 16.0	1700 \pm 16.0	2500 \pm 16.0	1500 \pm 15.0	
SS	120 \pm 40.0	170 \pm 28.0	226 \pm 29.0	137 \pm 39.0	459 \pm 38.0	497 \pm 23.0	358 \pm 41.0	296 \pm 37.0	256 \pm 40.0	401 \pm 32.0	531 \pm 54.0	339 \pm 48.0	
Alc	78 \pm 6.5	102 \pm 12.0	150 \pm 17.0	180 \pm 18.0	197 \pm 9.0	214 \pm 12.0	200 \pm 20.0	140 \pm 18.0	160 \pm 17.0	190 \pm 14.0	214 \pm 12.0	170 \pm 12.0	
Hn	74 \pm 10.0	102 \pm 10.0	153 \pm 9.0	156 \pm 8.0	184 \pm 11.0	190 \pm 11.0	183 \pm 16.0	134 \pm 10.0	146 \pm 11.0	180 \pm 9.0	192 \pm 10.0	154 \pm 10.0	
Nox	2.5 \pm 0.5	5 \pm 0.5	5 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0 \pm 0.5	1.5 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.2 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.1 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5	
NHx	0.5 \pm 0.1	1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	
POx	1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	
BOD	2.45 \pm 1.0	1.35 \pm 1.0	3.58 \pm 1.0	2.1 \pm 1.0	1.8 \pm 1.0	2.4 \pm 1.0	6.4 \pm 1.0	0.48 \pm 0.1	1 \pm 1.0	8.1 \pm 1.0	5.3 \pm 1.0	6.66 \pm 1.0	
E3													
T	29 \pm 0.2	34 \pm 0.4	31 \pm 0.4	31 \pm 0.3	30.5 \pm 0.4	33 \pm 0.1	31 \pm 0.2	32 \pm 0.5	31 \pm 0.5	30 \pm 0.4	32 \pm 0.3	32 \pm 0.3	
Tran	38 \pm 2.5	36 \pm 2.0	22 \pm 2.5	36 \pm 2.0	19 \pm 3.0	23 \pm 3.5	39 \pm 3.5	24 \pm 1.5	18 \pm 1.0	24 \pm 2.0	29 \pm 4.0	28 \pm 2.0	
Dep	260 \pm 3.0	197 \pm 7.0	146 \pm 13.0	129 \pm 12.0	102 \pm 12.5	164 \pm 7.5	130 \pm 10.0	165 \pm 5.0	142 \pm 6.0	150 \pm 4.0	186 \pm 5.0	207 \pm 6.0	
DO	5.08 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2	6.15 \pm 1.6	4.8 \pm 0.8	4.8 \pm 0.6	5.1 \pm 0.5	5 \pm 0.5	5.2 \pm 0.5	5.1 \pm 0.9	4.8 \pm 1.2	4.4 \pm 0.8	4.6 \pm 0.9	
pH	9.28 \pm 0.7	8.76 \pm 0.4	8.5 \pm 0.5	8.64 \pm 0.3	9.12 \pm 0.1	9.04 \pm 0.1	9.26 \pm 0.6	8.86 \pm 0.9	9.28 \pm 0.5	9.04 \pm 0.6	9.03 \pm 0.3	8.13 \pm 0.4	
Cdv	1150 \pm 12.5	1190 \pm 10.0	970 \pm 4.0	170 \pm 2.5	950 \pm 7.5	1260 \pm 9.5	2140 \pm 15.0	1520 \pm 8.0	1840 \pm 10.0	1680 \pm 6.5	1520 \pm 5.0	680 \pm 2.0	
SS	120 \pm 54.0	280 \pm 28.0	348 \pm 45.0	412 \pm 65.0	628 \pm 55.0	595 \pm 50.0	729 \pm 59.0	618 \pm 38.0	469 \pm 47.0	673 \pm 65.0	690 \pm 57.0	607.5 \pm 50.0	
Alc	92 \pm 16.4	230 \pm 12.2	254 \pm 8.0	266 \pm 14.5	240 \pm 9.4	276 \pm 13.5	198 \pm 10.1	264 \pm 8.9	280 \pm 19.0	290 \pm 15.3	302 \pm 12.6	280 \pm 16.0	
Hn	84 \pm 11.8	186.5 \pm 18.2	195 \pm 11.4	204 \pm 16.1	200 \pm 14.5	261 \pm 15.5	208 \pm 12.0	204 \pm 14.6	214 \pm 11.0	220 \pm 13.5	220 \pm 12.4	208 \pm 11.8	
Nox	0.5 \pm 0.4	0 \pm 0.4	5 \pm 0.4	2.5 \pm 0.4	0 \pm 0.4	1.5 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	
NHx	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	
POx	0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	0 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	
BOD	3.4 \pm 0.4	2.15 \pm 0.4	1.12 \pm 0.4	1.8 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4	4.8 \pm 0.4	4.58 \pm 0.4	3 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4	3.95 \pm 0.4	
E4													
T	26 \pm 0.6	34 \pm 0.4	30 \pm 0.3	30 \pm 0.3	31 \pm 0.4	32 \pm 0.5	31 \pm 0.5	32 \pm 0.3	34 \pm 0.2	30 \pm 0.1	32 \pm 0.2	32 \pm 0.5	
Tran	28 \pm 2.0	28 \pm 3.0	28 \pm 2.0	28 \pm 1.0	28 \pm 2.0	28 \pm 3.0	28 \pm 1.0	28 \pm 2.0	28 \pm 2.0	28 \pm 4.0	28 \pm 2.0	28 \pm 3.0	
Dep	250 \pm 5.0	240 \pm 7.0	175 \pm 12.0	122 \pm 10.0	112 \pm 8.0	157 \pm 8.0	145 \pm 10.0	164 \pm 11.0	143 \pm 7.0	155 \pm 6.0	148 \pm 5.0	163 \pm 6.0	
DO	6.7 \pm 0.5	10.6 \pm 0.8	5.25 \pm 0.4	5.1 \pm 0.3	5.6 \pm 0.2	5.5 \pm 0.6	5.4 \pm 0.1	6.55 \pm 0.3	6 \pm 0.3	5.33 \pm 0.5	3.4 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4	
pH	9.38 \pm 0.3	9.4 \pm 0.3	8.9 \pm 0.1	9.14 \pm 0.1	9.54 \pm 0.1	9.41 \pm 0.2	9.5 \pm 0.1	9.41 \pm 0.1	9.51 \pm 0.1	9.06 \pm 0.1	9.24 \pm 0.1	8.19 \pm 0.1	
Cdv	1210 \pm 14.3	1220 \pm 18.8	790 \pm 7.3	2220 \pm 10.2	1160 \pm 14.2	2100 \pm 11.6	2260 \pm 1.8	2080 \pm 9.9	2100 \pm 7.8	1680 \pm 10.5	1620 \pm 8.1	1420 \pm 7.9	
SS	360 \pm 52.0	420 \pm 20.0	392 \pm 63.0	319 \pm 47.0	378 \pm 71.0	647 \pm 56.0	842 \pm 56.0	608 \pm 52.0	593 \pm 34.0	783 \pm 56.0	672 \pm 49.0	721 \pm 50.0	
Alc	276.5 \pm 5.5	240 \pm 3.5	260 \pm 4.5	265 \pm 4.0	260 \pm 6.0	279 \pm 5.5	288 \pm 4.5	276 \pm 5.0	288 \pm 7.0	299 \pm 7.5	300 \pm 6.5	304 \pm 6.0	
Hn	206 \pm 7.7	188 \pm 6.9	192 \pm 6.3	198 \pm 7.0	194 \pm 7.5	204 \pm 0.5.9	210 \pm 6.2	209 \pm 5.0	216 \pm 5.6	220 \pm			

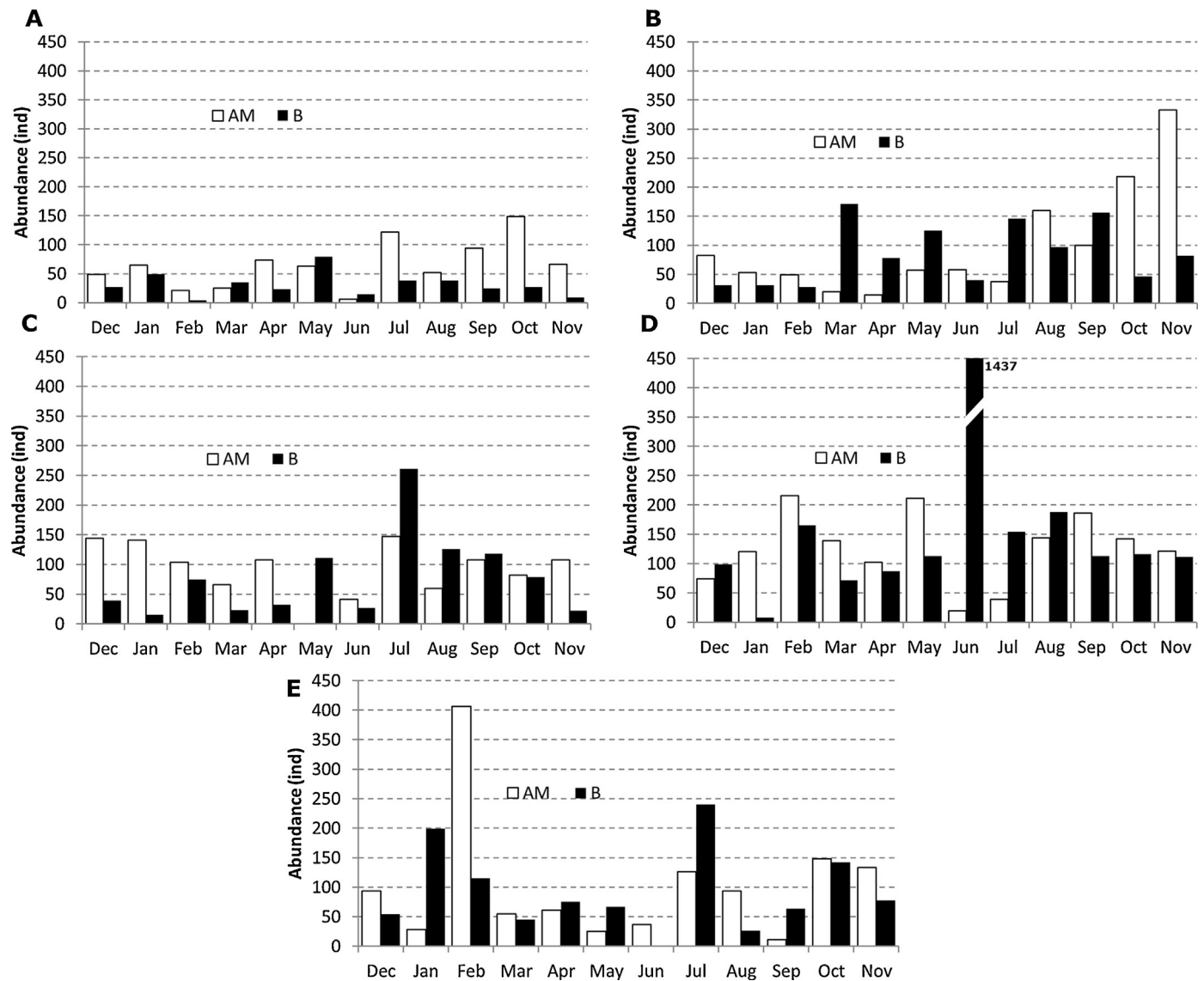


Fig. 2. Abundance present by biotope (AM: macrophyte associated and B: Benthos), during the sampling period by station: E1(A), E2(B), E3(C), E4(D) and E5(E).

2010; Slavevska-stamenković et al., 2015). However, no study has included the presence of these groups in lowland lentic systems, where fluctuations in water level are drastic and differently characterized from other lentic systems. Temporally and spatially, macroinvertebrates are distributed in ranges that differ from those established for lotic and lentic systems in high mountains (Wing, 2008; Oyanedel et al., 2008). In order to adapt the bioindication index to be used with macroinvertebrates in diverse aquatic systems, this study was carried out in a representative system belonging to a lowland, allowing an adaptation of the BMWP in a way that responds to environmental pressures typical of these systems.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Five sampling stations were selected, taking into account the system morphology (Fig. 1); which is a lowland lentic system (maximum depth of 8 m) and the greatest watershed from the Department of Atlántico – Colombia (160 Km²), named *Embalse del Guájaro*. Monthly monitoring was carried out throughout a year

in order to include typical variations in the rainy and dry periods of those latitudes. The physicochemical variables were measured both *in situ* and *ex situ* by taking superficial water samples (Triplicate samples in depths between 30 and 60 cm; Table 1) (APHA, 2012). The biological samples (composite sample for a volume of 729 in³) (Hanson et al., 2010) were classified into two biotopes: macroinvertebrates associated with macrophytes (AM) and benthic macroinvertebrates (B), considering the differential conditions between a lotic and a lentic system (Barchi, 2012). Due to the water retention times (Saulino and Trivinho-Strixino, 2014), the latter allows the establishment of macroinvertebrates in the floating and emergent vegetation (Alta and Río, 2012).

2.2. Sample processing

Table 1 summarizes the methodology used for determining the basic physicochemical variables, based on the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2012). Collection, separation and identification of macroinvertebrates were carried out by using dredges and nets as proposed by Maroñas et al. (2010) (Gutiérrez, 2010). Furthermore, the free CO₂ was estimated through

Table 3

Macroinvertebrate taxonomic hierarchies present in the lowland lentic system from total of individuals identified.

Order	Family	Total individuals	
Acari	Hydrachnidae	127	
Coleoptera	Curculionidae	78	
	Dytiscidae	15	
	Elmidae	32	
	Hydrophilidae	226	
	Lampyridae	48	
	Noteridae	288	
	Scirtidae	52	
	Staphilynidae	3	
	Belostomatidae	109	
	Corixidae	7	
	Hydrometridae	2	
	Mesoveliidae	9	
	Naucoridae	13	
Hemiptera	Nepidae	2	
	Notonectidae	55	
	Pleidae	71	
	Cantharidae	1	
	Leptoceridae	39	
	Polycentropodidae	53	
	Odonata	Aeshnidae	2
	Coenagrionidae	128	
	Libellulidae	96	
Order	Family	Total individuals	
Lepidoptera	Pyrilidae	13	
Diptera	Ceratopogonidae	167	
	Chironomidae	1861	
	Culicidae	17	
	Muscidae	1	
	Stratiomyidae	3	
	Syrphidae	14	
	Tabanidae	33	
	Tipulidae	2	
	Ephemeroptera	Baetidae	12
		Caenidae	28
Polymitarcyidae		996	
Oligochaeta	Tubificidae	469	
Hirudinidae	Glossiphoniidae	165	
	Hirudinidae	155	
Gastropoda	Ampullariidae	345	
	Ancylidae	112	
	Chilinnidae	1	
	Hydrobiidae	6127	
	Lymnaeidae	48	
	Physidae	86	
	Planorbidae	383	
	Thiaridae	1751	

the factor cited by these authors which establishes the alkalinity-pH-CO₂ relationship (Arango et al., 2008).

2.3. Information analysis

A work protocol for evaluating the adjustment of the limnological condition of the lowland lentic systems, which are associated with the lowland lotic systems. As a starting point, the BMWP adapted for Colombia (BMWP_{Col}) (Roldán, 1999), was calculated to demonstrate that this valuation exceeds the established range of 80 for this water quality index (Ríos-Touma et al., 2014). Furthermore, an analysis for comparing the physicochemical factor ranges was carried out, establishing the influence of the sources of variation (space and time) on experimentation. Thus, the dependent relations between the macroinvertebrates and physicochemical factors were detected and subsequently subjected to multivariate analysis, by Pearson correlations analysis (PCA), which included biological attributes as well as abundance and richness (Molina et al., 2008). This analysis performed support by a principal component analysis,

to establish whether the determining factors in the dynamics of the systems were then conditioned to the macroinvertebrate families found. The variation ranges allowed a valuation of the families to be obtained and a value to be assigned to the macroinvertebrates found in the lowland lentic systems (BMWPL) (Fig. 5).

3. Results and discussion

3.1. The physicochemical factors values

These values (Table 2) show that the lentic system studied is characterized by having high values of conductivity (420–2.600 μS/cm), alkalinity (65–702 mg/L) and hardness (70–261 mg/L), since calcium and magnesium carbonate salts are leached from the soils to the water by runoff and temporary streams, describing a gradient increasing from south to north (from E1 to E5). Moreover, a high concentration of SO₄ (2.2–12.3 mg/L), DBO₅ (0.3–12.3 mg/L), as well as transparency (Secchi: 15–76 cm) could be caused by the phytoplankton population which produces and demands oxygen and CO₂.

3.2. Macroinvertebrate families found

The macroinvertebrates found during the sampling period were distributed into eleven orders (Table 3). The biotope analysis showed a total abundance of 14.259 individuals, from which 7189 corresponded to biotope AM (50.42%) and 7056 to biotope B (49.5%). This proportion was observed throughout the sampling period (Fig. 2). The most abundant family was *Hydrobiidae*, having 6127 individuals (around 43% of the total), followed by the families *Chironomidae*, *Thiaridae* and *Polymitarcyidae*, with 1861 (13%), 1751 (12.28%) and 996 (6.98%) individuals, respectively (Table 3). This abundance of the family *Hydrobiidae* was seen at all stations (Fig. 2) and during the whole sampling period, while the other families were present occasionally. Station E4 had the highest relative abundance (Fig. 2D), with a total of 4373 individuals reported (30.67%), followed by E5 (Fig. 2E) with 3106 (27.78%); E3 (Fig. 2C), 2663 (18.68%); E2 (Fig. 2B), 2450 (17.18%) and E1 (Fig. 2A), 1667 individuals (11.7%).

3.3. Related to the number of families found by biotope

It was established that the highest richness was associated with the macrophytes throughout the entire sampling period for all stations. From the 46 families found in the system, the greatest number of them came from this biotope, while the B families had just one third (16 families) for five stations (Figs. 3 and 4), where the most abundant families respond positively to the physicochemical gradient that characterizes the system.

3.4. Spatial and temporal variation of macroinvertebrate families by biotope

It was necessary to analyze the macroinvertebrate populations regarding their distribution by biotope, considering the different microhabitat conditions (Fierro et al., 2012). Forty-six families were associated with macrophytes (AM), and the biotope with the highest richness was compared to the benthic population (B) which presented 16 families (Fig. 3) (Barchi, 2012). For both variance and range, the comparison of abundance (Fig. 4A) showed that there were no statistically significant differences between the individual number (Fig. 2); when comparing AM family richness throughout the sampling time, the results show differences between the dry (February and June) and rainy period (October and November) (Figs. 3 and 4B and C). This explains the behavior over time; the permanence of the families associated with

Table 4

Result of significant correlation (Pearson; $p < 0.05$) between physicochemical factors that were determinants for space-time distribution of the macroinvertebrate population. CDV: Conductivity. ALK: Alkalinity. Hn: Hardness. DO: Dissolved oxygen.

Family	Cdv	Alk	Hn	DO
Ampullaridae AM	0.0108	0.0549	0.0002	-0.0252
Ampullaridae B	0.2092	0.2635	0.3624	-0.2407
Ancylidae AM	-0.2327	-0.0832	0.3156	-0.1142
Ancylidae B	0.0409	0.1815	0.2507	-0.2184
Baetidae AM	-0.0989	0.1898	-0.0996	-0.1037
Belostomatidae AM	0.1578	0.1984	0.0915	-0.0986
Caenidae AM	-0.0453	0.1656	0.1823	-0.1136
Ceratopogonidae AM	0.2013	0.0723	0.0837	-0.0301
Ceratopogonidae B	0.2732	0.0498	0.2500	-0.0836
Chironomidae AM	0.2754	-0.0851	0.1178	0.2104
Chironomidae B	-0.1137	-0.0554	0.0286	0.0000
Coeagrionidae AM	-0.1057	0.2807	-0.0848	0.0446
Corixidae AM	-0.0843	-0.1282	-0.1683	-0.0322
Curculionidae AM	-0.0562	0.0724	-0.1927	0.1282
Dytiscidae AM	-0.0977	-0.0973	-0.3684	-0.1366
Elmidae AM	-0.0246	0.2018	-0.1294	-0.0965
Glossiphoniidae AM	0.1619	-0.0411	0.2046	-
Glossiphoniidae B	0.0965	-0.0649	0.1312	-
Hirudinidae AM	-0.0147	0.5523	0.0742	-
Hirudinidae B	0.1108	-0.0955	0.1218	-
Hydrachnidae AM	-0.0707	-0.0294	0.1106	-
Hydrobiidae AM	0.2448	0.0528	0.1429	-
Hydrobiidae B	0.2418	0.0692	0.1354	-
Hydrophilidae AM	-0.0604	0.0874	0.0523	-
Lampyridae AM	-0.1129	0.2836	-0.1176	-
Leptoceridae AM	-0.0871	-0.1297	-0.1620	-
Libellulidae AM	-0.0255	0.0078	0.1123	-
Lymnaeidae AM	0.1975	-0.0792	0.1331	-
Naucoridae AM	-0.1437	-0.1059	-0.0476	-
Noteridae AM	-0.2131	-0.0163	-0.3721	-
Notonectidae AM	-0.0102	0.1147	0.0369	-
Physidae AM	-0.0120	0.1591	-0.1249	-
Physidae B	-0.0465	0.0477	0.0543	-
Planorbidae AM	-0.1082	-0.1082	-0.1653	-
Planorbidae B	0.1300	0.4663	0.2704	-
Pleidae AM	-0.0617	0.0092	-0.1517	-
Polycentropodidae AM	-0.2006	0.1010	-0.2431	-
Polymitarciidae B	-0.0608	0.3224	0.0956	-
Pyrilidae AM	-0.1498	0.1850	0.0220	-
Tabanidae AM	0.0983	0.0459	0.1853	-
Tabanidae B	-0.0865	-0.1123	-0.2349	-
Thiaridae AM	-0.1242	-0.1625	-0.2013	-
Thiaridae B	0.3817	0.0882	0.1240	-
Tubificidae AM	0.1282	-0.0328	-	-
Tubificidae B	0.1115	-0.1738	-	-

the macrophytes is higher than 80% during the sampling period at all sampling stations and presents a direct correlation with the rainy periods (Saulino and Trivinho-Strixino, 2014). In contrast, for B families these range differences do not depend on the rainy and dry periods, because differences were noted between the sampling stations, allowing the behavior in space to be explained (E1 with E4 and E5; Fig. 4C and E) (Oliveira and Callisto, 2010).

When the relative abundance or the number of individuals per family were analyzed it was found that there is no marked tendency; this population attribute is not related to the kind of biotope, which means that there are no significant statistical differences between the abundances of individuals associated with macrophytes and benthic (Fig. 3). This result could be explained by taking into account that the more numerous families (dominant families) are common in both biotopes, as is seen with *Hydrobiidae*. The spatial-temporal distribution analysis of abundance showed different results, because the abundance present in the macrophytes presented changes in the annual cycle; a significant increment during the rainy months can be explained if a growth of the floating vegetation is considered, which makes substrate more abundant for these organisms (Slavevska-stamenković et al., 2015). Besides,

the results could be a consequence of the reproductive cycles under favorable conditions.

Particularly, the benthos (B) shows a higher number of individuals toward the northern zone; this difference was marked by the presence of gastropod individuals (*Hydrobiidae* and *Thiaridae*). The proliferation of these species is facilitated by optimum conditions such as substrate type, availability of organic and inorganic compounds (Barchi, 2012), specifically higher carbonate concentrations (Table 2), which is necessary for the production of shells. Other families do not show the same distribution pattern, such as *Chironomidae* and *Glossiphoniidae* in AM, and *Thiaridae* and *Polymitarciidae* in B, which contributed to the abundance. Likewise, the family *Tubificidae* was present in both biotopes (Table 3).

From the perspective of the composition by order in the system, the results show characteristics of a lentic water body with highly carbonated soils. Moreover, the physicochemical factors influence the composition of other macroinvertebrate orders in the lowland lentic system, belonging to Diptera, Hemiptera and Coleoptera. These are significantly represented in the space-time distribution, a typical result of lentic system water bodies from the Caribbean Neotropics.

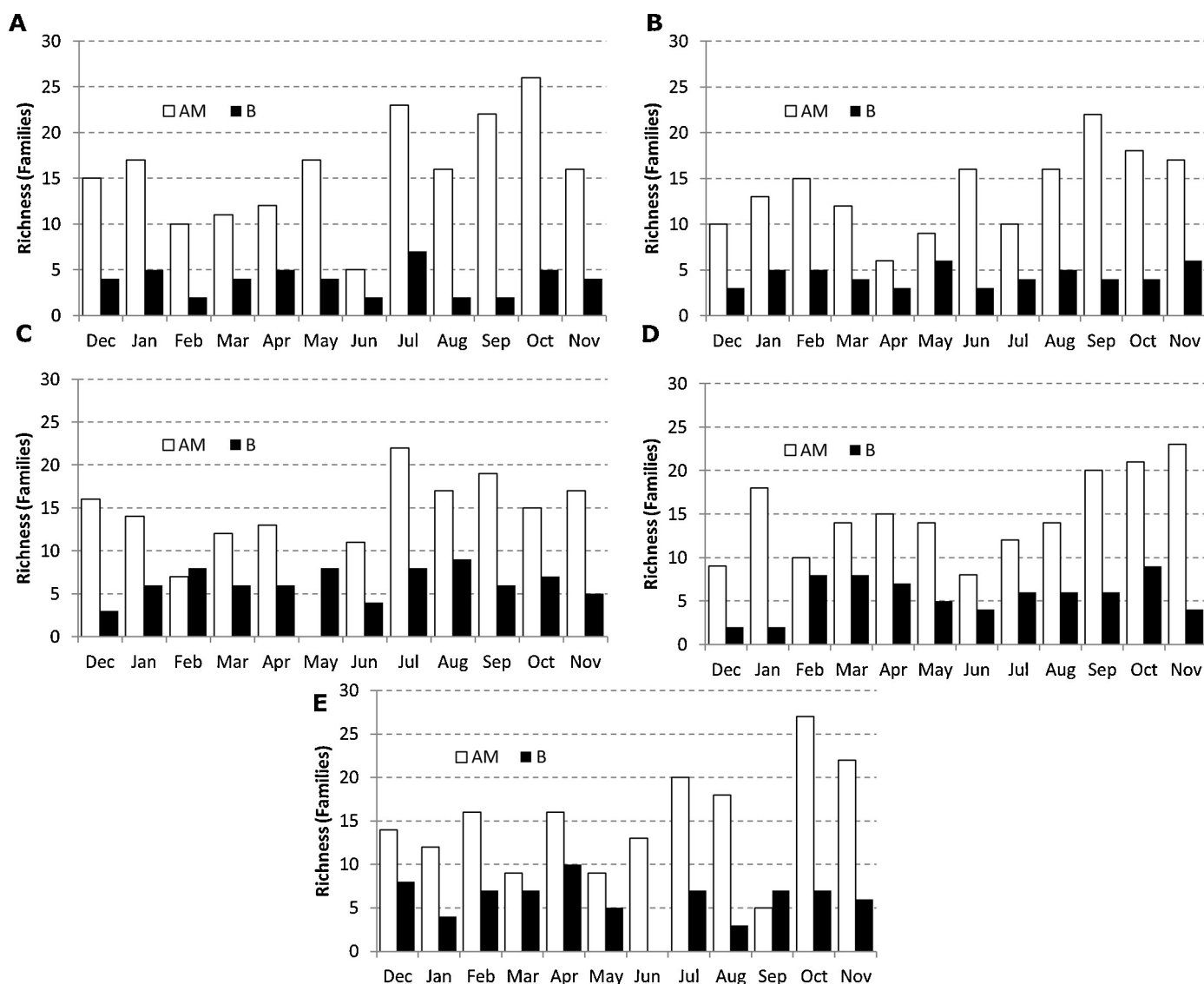


Fig. 3. Richness present by biotope (AM and B), during the sampling period by station: E1(A), E2(B), E3(C), E4(D) and E5(E).

3.5. Relationship between physicochemical and biological factors

The Pearson correlation index applied to matrices from total data showed a significant linear relationship ($p < 0.05$; $\alpha = 0.05$) between the physicochemical factors, such as conductivity, alkalinity and hardness with family abundance (Table 4). The analysis of the physicochemical characteristics revealed no significant differences in the variation of these factors, either over the sampling period or between stations, excepting the alkalinity, conductivity and hardness, which themselves have a significant relationship and consequently make differences in the lentic system. This is especially pronounced during the dry period, when they slice up the ecosystem; for this kind of lentic system these features are determinants, as well as indirectly influencing changes by depth (Fig. 6).

The spatial distribution pattern of gastropods is better adjusted to the variations in alkalinity, conductivity and hardness. This result is consistent with studies of autecology and evolutionary adaptation to this epicontinental aquatic ecosystem group. The other water physicochemical factors do not show a direct effect on the space-time distribution of the macroinvertebrate population, although they show an influence on the composition, and

categorize the lentic system as an aquatic ecosystem with mesoeutrophic trends observed. Moreover, the presence of families with euri-tolerant behavior confirms their usage as water quality indicators (Guimarães et al., 2009)

3.6. Rating families to assign a score to the adapted $BMWP_L$

The evaluation of the families was adjusted according to changes in the physicochemical factor ranges that arose during their collection (Table 5). It took into account the correlation and multivariate analysis that allowed the scale of assessment presented in other works (Zamora-Muñoz et al., 1995; Ríos-Touma et al., 2014). Accordingly, from the application of $BMWP_L$ (Biological Monitoring Working Party for lowland lentic systems) the value table for macroinvertebrates as indicators of water quality in lentic systems was modified (Table 6). In this table families graded with 9 and 10 were not considered, since they were previously rated as stenotolerant because they emerge in pristine waters (Uherek and Pinto Gouveia, 2014). Finding them in this system with no oligotrophic conditions suggests that they modified their tolerance ranges and

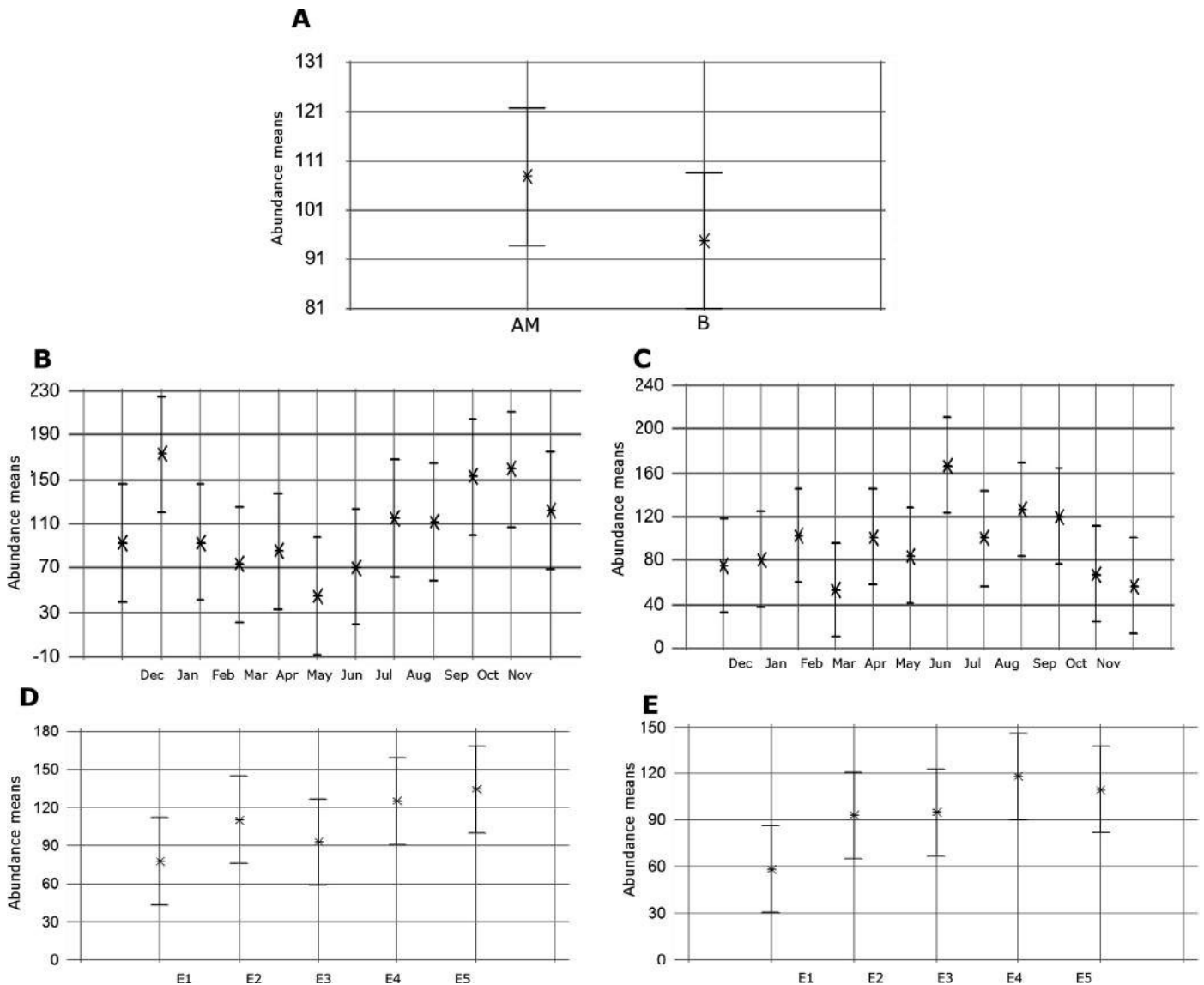


Fig. 4. Comparison of the overall mean abundance among biotopes (AM: macrophyte associated and B: Benthos) (A). Comparison of mean abundance during the sampling period (B and C), and comparison by station (E1, E2, E3, E4, E5 in D and E).

have lost their value as an indicator, moving out of their normal position in the table (Table 6).

The total score that resulted was 207 (Table 7), differently from values established for lotic water (value maximum = 150). An adjusted scale is shown in Table 8, and this table is not only useful for the classification of water quality, but also reveals many families that have lost their value as an indicator.

3.7. BMWPL application for water quality bioindication in lowland lentic systems

According to the assessment of the families present in the marsh, the total score for this system is 207 and the average score by station is 166 (Table 7; Fig. 6). These values were obtained from averaging the scores of the sampling stations, and they exceed the maximum values when compared to the ones in any of the tables for cartographic presentation of water quality, which is not consistent with the system conditions. However, to keep the score by families, taking into account the great diversity of this lentic system, it was necessary to establish the adjusted scale (Table 8) for Neotropical water systems.

Sniffer (2007) not only recommend work with BMWP of previously identified families but also suggest several adjustments over time, such as including a multiparametric test and biological indices for those families found for the first time (Sniffer, 2007). However, some authors recommend working with other indexes such as ASPT (Average Score Per Taxon) instead BMWP. It is important to point out that work with the primary value of BMWP instead of ASPT is more practical in terms of analysis, because it gives greater accuracy in assessing, but loses sensitivity to differentiate the effects of pollution because it does not distinguish natural pollution or anthropic effect (Roche et al., 2010). Furthermore, when comparing BMWP and ASPT, the results showed that ASPT demote the system in the classification of water quality, and each application version is significantly different because each region has a number of different taxa (Zeybek et al., 2014). For this reason, these results show the validation of BMWPL applied in three (3) different lentic systems (Tables 9 and 10) and their classification is verified with physicochemical quality indices called WQSI (Water Quality Simplified Index) (data not shown). In addition, when the application of BMWP to neotropical systems is compared to other ecological indices, it is more effective, economical and fast (da Silva et al., 2011). However,

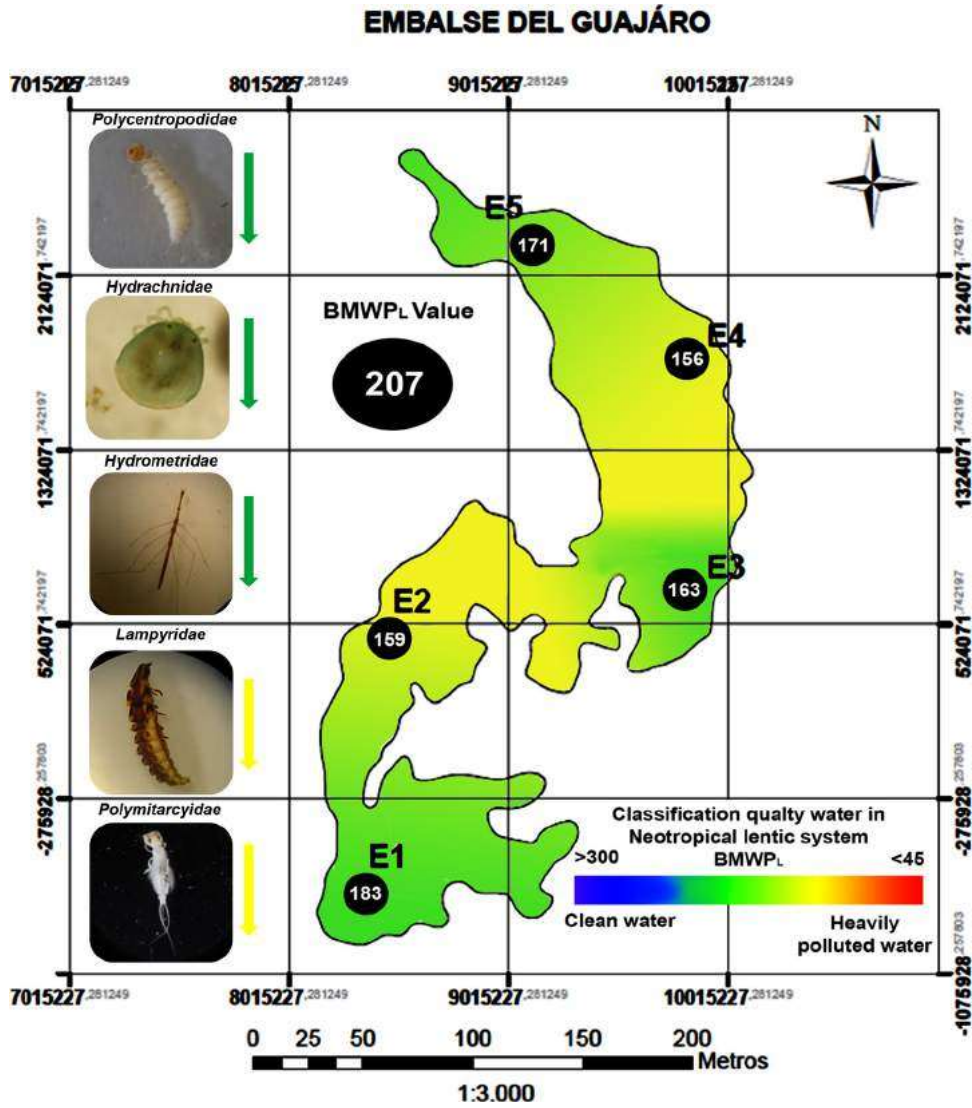


Fig. 6. General map of water quality for the system studied.

Table 6
Value of macroinvertebrate families identified in the lowland lentic system.

Family	Value
Leptoceridae. Polycentropodidae. Xiphocentronidae ^a . Cantharidae. Tricorythidae ^a . Gomphydae ^a . Stratiomyidae. Gammaridae ^a	10
Baetidae. Pleidae. Hydrachnidae. Hydrometridae	9
Pyralidae. Coenagrionidae. Staphylinidae. Chrysomelidae ^a . Libellulidae. Nepidae. Saldidae ^a . Scirtidae	8
Caenidae. Belostomatidae. Hydrophilidae. Corixidae. Curculionidae. Dytiscidae. Elmidae. Notonectidae. Naucoridae. Noteridae. Lampyridae	7
Tabanidae. Tipulidae. Ancyliidae. Muscidae. Culicidae. Ceratopogonidae. Chironomidae. Dolichopodidae ^a . Hyriidae ^a	6
Glossiphoniidae. Hirudinidae. Ampullaridae. Lymnaeidae. Planorbidae. Cyclosteriidae ^a	5
Tubificidae. Physidae	4
Polymitarcyidae. Hydrobiidae. Thiaridae. Chironomidae. Syrphidae	3
	2
	1

^a Macroinvertebrate's families. founded in other lowland lentic systems.

no index is final since the index for each system can be improved with use (Gonçalves and De Menezes, 2011). Finally, the application of BMWP can be extended to applied research because it is already covered by the current regulations in many countries, where the identification of upstream and downstream impacts on civil engineering works with effects on aquatic systems are a priority (Gualdoni and Oberto, 2012).

4. Conclusion

Water quality in lentic systems of lowlands (in Colombia) showed more variations subject to the temporal than the spatial distribution, since when the stations are characterized they are seen to be similar within the same period of the year. Over time, the aquatic system undergoes variations that depend on rainfall,

Table 7
Result of final evaluation by overall value of lowland lentic system.

Family	E1	E2	E3	E4	E5	General
Aeshnidae			5	5	5	5
Ampullariidae	3	3	3	3	3	3
Ancylidae	6	6	6	6	6	6
Baetidae	6	6	6	6	6	6
Belostomatidae	4	4	4	4	4	4
Caenidae	6	6	6	6	6	6
Cantharidae	8					8
Ceratopogonidae	3	3	3	3	3	3
Chilinnidae	7					7
Chironomidae	1	1	1	1	1	1
Coenagrionidae	6	6	6	6	6	6
Corixidae	7		7		7	7
Culicidae		2		2	2	2
Curculionidae	6	6	6	6	6	6
Dytiscidae	5	5	5	5	5	5
Elmidae	5	5	5	5	5	5
Glossiphoniidae	2	2	2	2	2	2
Hirudinidae	2	2	2	2	2	2
Hydrachnidae	7	7	7	7	7	7
Hydrobiidae	1	1	1	1	1	1
Hydrometridae			5			5
Hydrophilidae	4	4	4	4	4	4
Lampyridae	7	7	7	7	7	7
Leptoceridae	7	7	7	7	7	7
Libellulidae	6	6	6	6	6	6
Lymnaeidae	3	3	3	3	3	3
Mesoveliidae	5		5		5	5
Muscidae				3		3
Naucoridae	5	5		5	5	5
Nepidae					5	5
Noteridae	5	5	5	5	5	5
Notonectidae	5	5	5	5	5	5
Physidae	2	2	2	2	2	2
Planorbidae	3	3	3	3	3	3
Pleidae	7	7	7	7	7	7
Polycentropodidae	6	6	6	6	6	6
Polymitarcyidae	1	1	1	1	1	1
Pyrilidae	6	6	6	6	6	6
Scirtidae	6	6	6	6	6	6
Staphilynidae	6	6			6	6
Stratiomyidae	7	7		7		7
Syrphidae		1		1		1
Tabanidae	4	4	4	4	4	4
Thiaridae	1	1	1	1	1	1
Tipulidae			3		3	3
Tubificidae	2	2	2	2	2	2
Score	183	159	163	156	171	207

Table 8
Adjusted scale for the classification of water quality in Neotropical lentic systems in lowland.

Class	Score	Meaning	Color scale
I	>300231–300	Clean WaterUnpolluted waters or altered insensitive manner	BLUE
II	160–231	Water that has some effects of pollution	GREEN
III	101–160	Wáter pollution	YELLOW
IV	46–101	Highly contaminated water	ORANGE
V	<45	Heavily polluted water	RED

making it a homogeneous aquatic system during rainy periods and differential in dry seasons. This differentiation by zone is due to the gradients of concentration, conductivity, alkalinity, hardness and, indirectly, depth. So the ecosystem presents both behaviors: mesotrophic during rainy periods (dilution effect) and moderately eutrophic in dry periods.

The composition of the macroinvertebrate population showed a similar relative abundance for both biotopes. However, the diversity makes them significantly different, since the AM biotope is more diverse throughout the system compared to biotope B, which has little variability in this index during the annual cycle.

The value assigned to the macroinvertebrates in the aquatic system was determined from variation ranges in the physical and chemical factors where they were collected. Coefficients of deviation in the physicochemical variables and the dependency of the organisms on these variations, as well as the importance of the correlations classified them as euri or stenotolerant species. This part of the protocol allowed a novel valuation to be established as an alternative to the one recommended in the BMWP index, which has been adapted by studies carried out in both lotic and lentic ecosystems from other latitudes. The results are an adjusted proposal for imple-

Table 10
Comparative result of final evaluation by overall value of lowland lentic system.

Families	Guájaro					La Bahía			Malambo			Convento		
	E1	E2	E3	E4	E5	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
Aeshnidae			5	5	5									
Ampullariidae	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Ancyliidae	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Calibaetidae	6	6	6	6	6									
Belostomatidae	4	4	4	4	4				4		4			
Caenidae	6	6	6	6	6									
Cantharidae	8													
Ceratopogonidae	3	3	3	3	3					3				
Chilinnidae	7													
Chironomidae	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Coenagrionidae	6	6	6	6	6									6
Corixidae	7		7		7							7		
Culicidae		2		2	2									
Curculionidae	6	6	6	6	6	6	6	6	6			6	6	
Cyclotheriidae						3	3	3	3	3	3			
Dolichopodidae													4	
Dytiscidae	5	5	5	5		5	5		5		5		5	
Elmidae	5	5	5	5	5	5								
Glossiphoniidae	2	2	2	2	2	2		2	2					
Hirudinidae	2	2	2	2	2	2			2	2				2
Hyriidae						4	4	4	4	4	4	4	4	4
Hydrachnidae	7	7	7	7	7						7		7	7
Hydrobiidae	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hydrometridae			5											
Hydrophilidae	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Lampyridae	7	7	7	7	7	7	7				7	7	7	
Leptoceridae	7	7	7	7	7	7								
Libellulidae	6	6	6	6	6		6						6	
Lymnaeidae	3	3	3	3	3									
Mesoveliidae	5		5		5									
Muscidae				3										
Naucoridae	5	5		5	5	5	5					5	5	
Nepidae					5							5		
Noteridae	5	5	5	5	5	5			5		5		5	
Notonectidae	5	5	5	5	5									
Physidae	2	2	2	2	2	2	2		2	2		2	2	2
Planorbidae	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3
Pleidae	7	7	7	7	7	7	7		7	7	7		7	7
Polycentropodidae	6	6	6	6	6		6							
Polymitarcyidae	1	1	1	1	1									
Pyrallidae	6	6	6	6	6	6		6	6	6				
Saldidae							6							
Scirtidae	6	6	6	6	6									
Staphilynidae	6	6		6	6	6								
Stratiomyidae	7	7		7				7		7		7		
Syrphidae		1		1										
Tabanidae	4	4	4	4	4			4						
Thiaridae	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1
Tipulidae			3		3	3		3	3	3			3	
Tricorythidae										8		8		
Tubificidae	2	2	2	2	2	2	2		2	2			2	2
Xhiphocentronidae						8								
Score	183	159	163	156	171	101	78	54	70	66	61	69	82	43

mentation in lowland neotropical lentic systems, named $BMWP_L$ (Biological monitoring working party for lentic systems). The application of $BMWP_L$ allows the system to be classified as class II (with quality score of 207), ie., water with evident polluting effects.

Finally, the evaluation of water quality in lentic systems should be carried out from two kinds of maps (Fig. 6); first by zone and afterwards by dry or rainy period, through benthic macroinvertebrates and associated macrophytes, respectively.

Disclosure

This manuscript and its authors are not involved in any potential conflicts of interest, including financial interests, relationships and affiliations.

Acknowledgements

The authors thank Osman Roa Melgarejo and Roger Valle Molineros from the Universidad del Atlántico for providing additional mapping support.

References

- APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation.
- Abarca, H., 2007. El uso de macroinvertebrados como bioindicadores de la Calidad del Agua. *Rev. Biocenosis* 20, 10.
- Alba-Tercedor, J., 1996. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. *IV Simp. Agua Andalucía* 2, 203–213.
- Alta, S., Río, D.E.L., 2012. Water quality and composition of aquatic macroinvertebrates in the subwatershed of river Chinchiná. *Caldasia* 34, 443–456.

- Arango, M., Álvarez, L., Arango, G., Torres, O., Monsalve, A., 2008. *Calidad Del Agua De Las Quebradas La Cristalina Y La Risaralda, San Luis, Antioquia. Esc. Ing. Antioquia*, 121–141.
- Barchi, M., 2012. O Tipo de mesohabitat (corredeira e remanso) e a complexidade do substrato afetam a fauna de macroinvertebrados aquáticos de riacho? Universidade Estadual Paulista, SP 2012, 12–33.
- Colpo, K., Brasil, M., Camargo, B., 2009. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores do impacto ambiental promovido pelos efluentes de áreas orizícolas e pelos de origem urbana/industrial. *Ciência Rural* 39, 2087–2092, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000161>.
- Czerniawska-Kusza, I., 2005. Comparing modified biological monitoring working party score system and several biological indices based on macroinvertebrates for water-quality assessment. *Limnologica* 35, 169–176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2005.05.003>.
- da Silva, F.H., Favero, S., Sabino, J., dos Anjos Garnés, S.J., 2011. Índices bióticos para avaliação da qualidade ambiental em trechos do rio Correntoso, Pantanal do Negro, Estado do Mato Grosso do Sul. *Bras. Acta Sci. – Biol. Sci.* 33, 289–299, <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiols.v33i3.1478>.
- Duran, M., Suicmez, M.S.U., 2007. Utilization of both benthic macroinvertebrates and physicochemical parameters for evaluating water quality of the Stream Çekerek (Tokat, N Turkey). *J. Environ. Biol.* 28, 1–10.
- Fierro, P., Bertrán, C., Mercado, M., Peña-Cortés, F., Tapia, J., Hauenstein, E., Vargas-Chacoff, L., 2012. Benthic macroinvertebrate assemblages as indicators of water quality applying a modified biotic index in a spatio-seasonal context in a coastal basin of Southern Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 47, 23–33, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000100003>.
- Gonçalves, F.B., De Menezes, M.S., 2011. A comparative analysis of biotic indices that use macroinvertebrates to assess water quality in a coastal river of Paraná state, southern Brazil. *Biota Neotrop.* 11, 27–36.
- Gualdoni, C.M., Oberto, A.M., 2012. Estructura de la comunidad de macroinvertebrados del arroyo Achiras (Córdoba, Argentina): análisis previo a la construcción de una presa. *Iheringia Sér. Zool.* 102, 177–186, <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212012000200010>.
- Guimarães, R.M., Fature, K.G., Pavanin, L.A., Jacobucci, G.B., 2009. Water quality characterization of urban streams using benthic macroinvertebrate community metrics. *Acta Limnol. Bras.* 21, 217–226.
- Gutiérrez, C., 2010. Géneros de ninfas del orden Ephemeroptera (Insecta) del departamento del Tolima, Colombia: listado preliminar. *Biota Colomb.* 11, 23–32.
- Hanson, P., Springer, M., Ramirez, A., 2010. Introducción a los grupos de macroinvertebrados acuáticos. *Rev. Biol. Trop.* 58, 3–37.
- Hawkes, A.H., 1998. Origin and development of the biological monitoring working party score system. *Water Res.* 32, 964–968.
- Królak, E., Korycińska, M., 2008. Taxonomic composition of macroinvertebrates in the Liwiec River and its tributaries (Central and Eastern Poland) on the basis of chosen physical and chemical parameters of water and season. *Polish J. Environ. Stud.* 17, 39–50.
- MacNeil, C., Briffa, M., Leuven, R.S.E.W., Gell, F.R., Selman, R., 2010. An appraisal of a biocontamination assessment method for freshwater macroinvertebrate assemblages: a practical way to measure a significant biological pressure? *Hydrobiologia* 638, 151–159, <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-009-0037-x>.
- Maroñas, M., Marzoratti, G., Vilches, A., Legarralde, T., Darrigran, G., 2010. Guía para el estudio de macroinvertebrados. *ProBiota*.
- Molina, C.I., Gibo, F.-M., Pinto, J., Rosales, C., 2008. Estructura de Macroinvertebrados Acuáticos en un Río Altoandino de la Cordillera Real, Bolivia: Variación Anual y Longitudinal en relación a Factores Ambientales. *Ecol. Apl.* 7, 105–116.
- Mustow, S.E., 2002. Biological monitoring of rivers in Thailand: use and adaptation of the BMWP score. *Hydrobiologia* 479, 191–229, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021055926316>.
- Nubia, V., Caicedo, O., Aguirre, N.J., 2009. Análisis de calidad de agua de la quebrada La Ayurá con base en variables fisicoquímicas y macroinvertebrados acuáticos. *Prod. Limpia* 4, 44–60.
- Oliveira, A., Callisto, M., 2010. Benthic macroinvertebrates as bioindicators of water quality in an Atlantic forest fragment. *Iheringia Sér. Zool.* 100, 291–300, <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212010000400003>.
- Oyanedel, A., Valdovinos, C., Azocar, M., Moya, C., Mancilla, G., Pedreros, P., Figueroa, R., 2008. Patrones de distribución espacial de los macroinvertebrados bentónicos de La Cuenca del Río Aysen (Patagonia Chilena). *Gayana (Concepción)*.
- Pinilla, G., 2010. An index of limnological conditions for urban wetlands of Bogotá city, Colombia. *Ecol. Indic.* 10, 848–856, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.01.006>.
- Prat, N., Ríos, B., Acosta, R., Rieradevall, M., 2006. Los Macroinvertebrados como Indicadores de Calidad de las Aguas, Macroinvertebrados Bentónicos Sudamericanos. p. 645.
- Ríos-Touma, B., Acosta, R., Prat, N., 2014. The Andean Biotic Index (ABI): revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation. *Rev. Biol. Trop.* 62, 249–273.
- Ramírez, A., Gutiérrez-Fonseca, P.E., 2014. Estudios sobre macroinvertebrados acuáticos en América Latina: avances recientes y direcciones futuras. *Rev. Bio. Trop.* 62, 9–20.
- Roche, K.F., Queiroz, E.P., Righi, K.O., De Souza, G.M., 2010. Use of the BMWP and ASPT indexes for monitoring environmental quality in a neotropical stream. *Acta Limnol. Bras.* 22, 105–108, <http://dx.doi.org/10.4322/actalb.02201010>.
- Roldán, G.P., 1999. Los Macroinvertebrados y su Valor como Indicadores de la Calidad del Agua. *Rev. Acad. Colomb. Ciencias Exactas Fis. Nat.*, 0370–3908.
- Saulino, H.H.L., Trivinho-Strixino, S., 2014. Macroinvertebrados acuáticos asociados às raízes de Eichhornia azuera (Swartz) Kunth (Pontederiaceae) em uma lagoa marginal no Pantanal, MS. *Biotemas* di, 65–72.
- Slavevska-stamenković, V., Paunović, M., Miljanović, B., Kostov, V., Ristovska, M., Donka, M., 2015. Water quality assessment based on the macroinvertebrate fauna – the Pcinja River case study. *Water Res. Manage.* 1, 63–69.
- Sniffer, 2007. Revision and testing of BMWP scores – Final report, Project WFD72A.
- Suleiman, K., Abdullahi, I., 2012. Biological assessment of water quality: a study of Challawa River Water Kano, Nigeria. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 4, 121–127, <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v4i2.24>.
- Uherek, C.B., Pinto Gouveia, F.B., 2014. Biological monitoring using macroinvertebrates as bioindicators of water quality of maroaga stream in the maroaga cave system, presidente figueiredo, amazon, Brazil. *Int. J. Ecol.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308149>.
- Varnosfaderany, M.N., Ebrahimi, E., Mirghaffary, N., Safyanian, A., 2010. Biological assessment of the Zayandeh Rud River Iran, using benthic macroinvertebrates. *Limnologica* 40, 226–232, <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2009.10.002>.
- Wing, C.K., 2008. *Spatial and Seasonal Variations of Freshwater Macroinvertebrates, Odonata and Waterbirds in Luk Keng Maeshland, Hong Kong, The University of Hong Kong (Pokfulam, Hong Kong)*.
- Zamora-Muñoz, C., Sáinz-Cantero, C.E., Sánchez-Ortega, A., Alba-Tercedor, J., 1995. Are biological indices BMPW' and ASPT' and their significance regarding water quality seasonally dependent? Factors explaining their variations. *Water Res.* 29, 285–290, [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)E0125-P](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(94)E0125-P).
- Zeybek, M., Kalyoncu, H., Karakaş, B., Özgül, S., 2014. The use of BMWP and ASPT indices for evaluation of water quality according to macroinvertebrates in Deşirmendere Stream (Isparta, Turkey). *Turkish J. Zool.* 38, 603–613, <http://dx.doi.org/10.3906/zoo-1310-9>.

APÊNDICE B - Artigo submetido pelo autor como resultado da tese

Manuscript Details

Manuscript number	MPE_2019_426
Title	TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF THE EPITHELIUM OF FRESHWATER STINGRAY <i>Potamotrygon magdalenae</i>
Article type	Research Paper

Abstract

The study of the stingray's transcriptome is a challenge, due to the lack of information published about these organisms and the unexplored status of the freshwater species of the family Potamotrygonidae. Freshwater stingrays belong to the order Myliobatiformes (family of stingrays), family Potamotrygonidae, represented by three genera named *Paratrygon*, *Plesiotrygon* and *Potamotrygon*. For this research, the stingray epithelium was obtained from three species of the genus *Potamotrygon*. Two species of Brazilian stingrays with many similarities in their transcriptome were compared: *P. amandae* and *P. falkneri*, and a previously unexplored species: *P. magdalenae* (endemic to Colombia), to characterize their similarities and particularities through these transcriptomic records. The analysis of the transcripts presented high exclusiveness of *P. magdalenae* in comparison with the other species, which have high similarity between them. A number of specific transcriptions were obtained, and these are common to two or shared among all. In addition, *in silico* analyses, including a learning machine, were performed as a strategy to identify genes responsible for molecules of biotechnological interest produced by these stingrays. These results represent an excellent opportunity to evaluate not only the genetic resource, but also the molecular potential of these venoms from the analysis of the transcriptome. Finally, a comparison of different species of the genus was carried out, including an initial approximation of the activity of the extract from the glandular epithelium producing poison, and the species' relationship with the conditions of the aquatic system which they inhabit.

Keywords	New Transcriptome; Epithelium; comparative; <i>Potamotrygon magdalenae</i> ; Genus
Corresponding Author	Karina Castellanos Romero
Corresponding Author's Institution	Pós Graduação em Ciências Biológicas-Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia, Universidade Federal de Juiz de Fora MG - Brazil; Laboratorio de Bioecnología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia
Order of Authors	Karina Castellanos Romero, Luis Rivera, Jorge W Arboleda Valencia, Valencia Arnubio, Octavio Franco
Suggested reviewers	Elisabeth Schwartz, Priscila Faria-Pinto, Marta Martins

ANEXO A - VALORES DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS

Representados pelas medias de 5 réplicas ± desvio padrão para cada ponto de coleta no embalse del guájaro (e1, e2, e3, e4, e5), durante o tempo das coletas.

Estação E1	Mês	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Prof	178±9,5	176±5,0	175±4,5	113±2,5	93±3,5	109±4,5	109±4,5	93±3,5	126±4,0	118±2,5	136±7,5	94±5,0	140±3,5
Tran	32±2,5	29±4,0	20±2,0	16±3,0	15±2,5	15±2,5	19±5,0	18±1,0	19±1,0	19±2,0	24±3,5	23±2,0	18±4,5
pH	8,2±1,2	7,3±0,8	8±0,2	8,03±0,2	8,7±0,3	8,7±0,3	8,8±0,5	9,6±0,8	8,3±0,6	8,3±0,5	8,5±0,3	8,5±0,2	7,7±0,2
OD	9,4±1,6	7,7±3,3	5,3±2,7	4,3±2,9	4,7±1,3	4,7±1,3	4,7±3,4	9,±3,5	5,4±1,4	4,7±2,6	6,5±2,1	4,5±1,5	4,7±0,8
T	29±0,2	34±0,8	33±0,4	32±0,4	31±0,3	31±0,3	29±0,6	32±0,5	34±0,8	36±0,4	30±0,6	32±0,4	32±0,5
Cdv	670±6,0	420±8,0	770±5,0	1060±6,0	750±6,5	750±6,5	810±6,0	1180±3,0	1060±4,5	880±8,0	1220±5,0	720±6,5	840±6,0

Estação E2	Mês	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Prof	230±10,3	190±9,8	155±9,2	130±11,2	107±7,3	107±7,3	104±9,4	142±11,2	160±13,2	125±9,0	196±12,3	123±11,9	173±10,0
Tran	31±3,0	35±2,5	30±3,0	26±4,0	23±2,0	23±2,0	20±2,5	25±2,5	51±3,5	31±5,0	26±7,0	19±5,5	34±4,5
pH	8,1±0,5	7,3±0,8	7,8±0,8	8,5±1,0	9±0,9	9±0,9	8,8±0,7	9,3±1,3	8,9±1,4	8,9±0,9	9,2±0,6	10±0,3	8,3±0,5
OD	7,6±0,2	3,1±0,3	4,7±0,2	5,4±0,7	5±0,5	5±0,5	5,3±0,5	6,4±0,7	6±0,9	5,5±0,7	8,1±0,9	5,3±0,9	7±0,5
T	29±0,5	32±0,3	30±0,2	33±0,4	32±0,5	32±0,5	34±0,5	33±0,7	33±0,7	35±0,6	33±0,5	35±0,4	33±0,5
Cdv	590±12,0	1900±16,0	600±12,0	1560±16,0	860±15,0	860±15,0	1020±10,0	1040±12,0	1520±13,0	1380±16,0	1700±16,0	2500±16,0	1500±15,0

Fonte: Próprio autor

Profundidade, prof; transparência, tran; pH; oxigênio dissolvido, OD; temperatura da água, t; condutividade, cdv.

Estação E3												
Mês	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Prof	260±3,0	197±7,0	146±13,0	129±12,0	102±12,5	164±7,5	130±10,0	165±5,0	142±6,0	150±4,0	186±5,0	207±6,0
Tran	38±2,5	36±2,0	22±2,5	36±2,0	19±3,0	23±3,5	39±3,5	24±1,5	18±1,0	24±2,0	29±4,0	28±2,0
pH	9,3±0,7	8,8±0,4	8,5±0,5	8,6±0,3	9,1±0,1	9±0,1	9,3±0,6	8,9±0,9	9,3±0,5	9±0,6	9±0,3	8±0,4
OD	5,1±0,3	2,2±0,2	6,1±1,6	4,8±0,8	4,8±0,6	5,1±0,5	5±0,5	5,2±0,5	5,1±0,9	4,8±1,2	4,4±0,8	4,6±0,9
T	29±0,2	34±0,4	31±0,4	31±0,3	30,5±0,4	33±0,1	31±0,2	32±0,5	31±0,5	30±0,4	32±0,3	32±0,3
Cdv	1150±12,5	1190±10,0	970±4,0	170±2,5	950±7,5	1260±9,5	2140±15,0	1520±8,0	1840±10,0	1680±6,5	1520±5,0	680±2,0

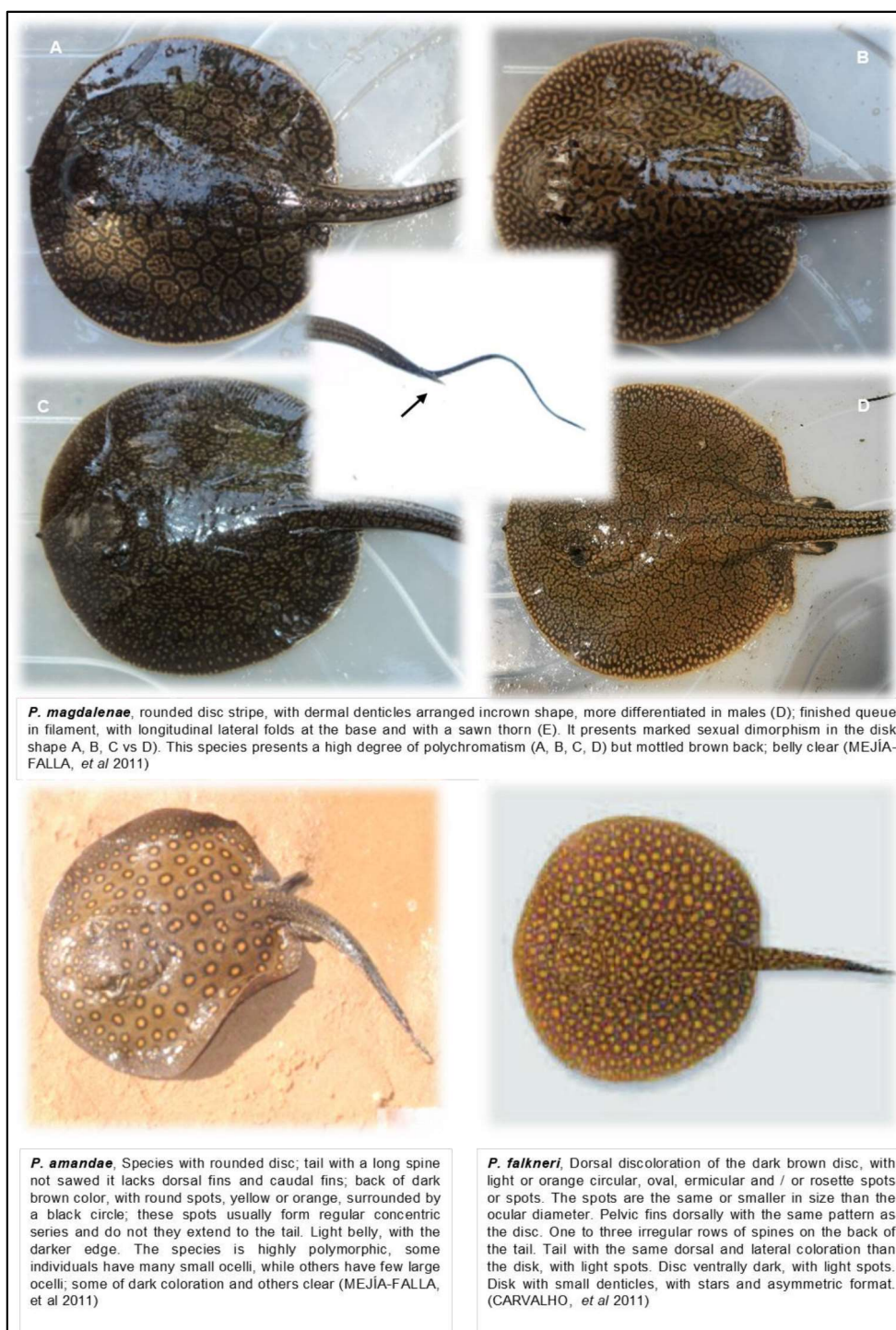
Estação E4												
Mês	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Prof	250±5,0	240±7,0	175±12,0	122±10,0	112±8,0	157±8,0	145±10,0	164±11,0	143±7,0	155±6,0	148±5,0	163±6,0
Tran	28±2,0	28±3,0	28±2,0	28±1,0	28±2,0	28±3,0	28±1,0	28±2,0	28±2,0	28±4,0	28±2,0	28±3,0
pH	9,4±0,3	9,4±0,3	8,9±0,1	9,1±0,1	9,5±0,1	9,4±0,2	9,5±0,1	9,4±0,1	9,5±0,1	9,1±0,1	9,2±0,1	8,2±0,1
OD	6,7±0,5	10,6±0,8	5,2±0,4	5,1±0,3	5,6±0,2	5,5±0,6	5,4±0,1	6,5±0,3	6±0,3	5,3±0,5	3,4±0,5	4,2±0,4
T	26±0,6	34±0,4	30±0,3	30±0,3	31±0,4	32±0,5	31±0,5	32±0,3	34±0,2	30±0,1	32±0,2	32±0,5
Cdv	1210±14,3	1220±18,8	790±7,3	2220±10,2	1160±14,2	2100±11,6	2260±1,8	2080±9,9	2100±7,8	1680±10,5	1620±8,1	1420±7,9

Estação E5												
Mês	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov
Prof	205±9,0	202±7,0	153±4,0	140±7,0	110±5,0	123±12,0	118±10,0	144±9,0	145±7,0	121±10,0	110±8,0	137±8,0
Tran	28±2,0	28±1,0	28±1,0	28±2,0	28±1,0	28±2,0	28±3,0	28±2,0	28±1,0	28±2,0	28±2,0	28±2,0
pH	8,9±0,1	8,7±0,3	8,3±0,2	9,3±0,5	9,4±0,4	9,4±0,2	9,1±0,2	9,2±0,4	9,4±0,3	8,8±0,2	9±0,2	8,2±0,1
OD	5,4±0,4	6,6±0,6	4,1±0,7	7,6±0,9	4,6±0,5	4,9±0,5	5,4±0,8	5,4±1,2	4,5±0,8	3,1±0,6	2,9±0,5	4,7±0,4
T	31±0,3	31±0,5	29±0,6	29±1,0	30±0,8	32±0,5	30±1,0	31±0,6	32±0,8	29,5±0,6	31±0,5	31±0,5
Cdv	1990±10,0	1870±12,0	1960±10,5	2600±12,3	1090±11,0	2240±21,0	1840±17,0	1840±15,0	1960±10,0	1440±12,0	1440±11,0	1380±11,0

Fonte: próprio autor

Profundidade, prof; transparência, tran; pH; oxigênio dissolvido, OD; temperatura da água, t; condutividade, cdv.

ANEXO B - Description of the specie *Potamotrygon magdalenae*



Fonte: MEJÍA-FALLA, P. A. *et al.* 2013

ANEXO C - Teste de ANOVA

Comparação de medias para as variaveis fisico-químicas.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparação de medias (LSD) para profundidade

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard deviation
Prof1	12	129,25	93,0	1045,3	32,331
Prof2	12	152,917		1495,54	38,6722
Prof3	12	164,833		1805,42	42,4903
Prof4	12	164,5		1722,45	41,5025
Prof5	12	142,333	110,0	1014,24	31,8472
Total	60	150,767		1508,72	38,8423
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
Prof1	9,33316	93,0	178,0	25,0143%	
Prof2	11,1637	104,0	230,0	25,2897%	
Prof3	12,2659	102,0	260,0	25,7777%	
Prof4	11,9807	112,0	250,0	25,2295%	
Prof5	9,19349	110,0	205,0	22,3751%	
Total	5,01452	93,0	260,0	25,7632%	

ANOVA Table

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11102,2	4	2775,56	1,96	0,113
Within groups	77912,5	55	1416,59		
Total (Corr.)	89014,7	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
Prof1	12	129,25	X
Prof5	12	142,333	XX
Prof2	12	152,917	XX
Prof4	12	164,5	X
Prof3	12	164,833	X

Contrast	Difference
Prof1 - Prof2	-23,6667
Prof1 - Prof3	*-35,5833
Prof1 - Prof4	*-35,25
Prof1 - Prof5	-13,0833
Prof2 - Prof3	-11,9167
Prof2 - Prof4	-11,5833
Prof2 - Prof5	10,5833
Prof3 - Prof4	0,333333
Prof3 - Prof5	22,5
Prof4 - Prof5	22,1667

* denotes a statistically significant difference.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparación de medias (LSD) para transparência (Secchi)

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard d
TranS1	12	21,0	19,0	26,3636	5,13455
TranS2	12	29,25		73,1136	8,55065
TranS3	12	28,0		56,7273	7,53175
TranS4	12	34,25		35,6591	5,97152
TranS5	12	38,5833		252,083	15,8771
Total	60	30,2167	19,0	118,783	10,8988
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
TranS1	1,48222	15,0	32,0	24,4503%	
TranS2	2,46836	19,0	51,0	29,233%	
TranS3	2,17423	18,0	39,0	26,8991%	
TranS4	1,72383	25,0	46,0	17,4351%	
TranS5	4,58333	21,0	76,0	41,1502%	
Total	1,40702	15,0	76,0	36,0687%	

ANOVA Table

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-
Between groups	2124,77	4	531,192	5,98	0
Within groups	4883,42	55	88,7894		
Total (Corr.)	7008,18	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
TranS1	12	21,0	X
TranS3	12	28,0	XX
TranS2	12	29,25	X
TranS4	12	34,25	XX
TranS5	12	38,5833	X
Contrast			Difference +/
TranS1 - TranS2			*-8,25 7,
TranS1 - TranS3			-7,0 7,
TranS1 - TranS4			*-13,25 7,
TranS1 - TranS5			*-17,5833 7,
TranS2 - TranS3			1,25 7,
TranS2 - TranS4			-5,0 7,
TranS2 - TranS5			*-9,33333 7,
TranS3 - TranS4			-6,25 7,
TranS3 - TranS5			*-10,5833 7,
TranS4 - TranS5			-4,33333 7,

* denotes a statistically significant difference.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparación de medias (LSD) para pH

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard deviation
pH1	12	8,33333	8,3	0,354442	0,595351
pH2	12	8,68333		0,544933	0,738196
pH3	12	8,91167		0,123906	0,352003
pH4	12	9,22333	9,41	0,144606	0,380271
pH5	12	8,9675		0,16022	0,400275
Total	60	8,82383	8,3	0,33879	0,582057
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
pH1	0,171863	7,3	9,62	7,14421%	
pH2	0,213099	7,3	10,03	8,5013%	
pH3	0,101614	8,13	9,28	3,94991%	
pH4	0,109775	8,19	9,54	4,12292%	
pH5	0,11555	8,22	9,39	4,46362%	
Total	0,0751432	7,3	10,03	6,59642%	

ANOVA Table

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Va
Between groups	5,37943	4	1,34486	5,06	0,0
Within groups	14,6092	55	0,265622		
Total (Corr.)	19,9886	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
pH1	12	8,33333	X
pH2	12	8,68333	XX
pH3	12	8,91167	XX
pH5	12	8,9675	XX
pH4	12	9,22333	X

Contrast	Difference
pH1 - pH2	-0,35
pH1 - pH3	*-0,578333
pH1 - pH4	*-0,89
pH1 - pH5	*-0,634167
pH2 - pH3	-0,228333
pH2 - pH4	*-0,54
pH2 - pH5	-0,284167
pH3 - pH4	-0,311667
pH3 - pH5	-0,0558333
pH4 - pH5	0,255833

* denotes a statistically significant difference.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparação de médias (LSD) do oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹)

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard deviation
OD1	12	5,92667	4,7	3,29881	1,81626
OD2	12	6,3625		5,3396	2,31076
OD3	12	4,76917	4,8	0,839045	0,915994
OD4	12	5,8025		3,0978	1,76006
OD5	12	4,9375	5,4	1,7596	1,3265
Total	60	5,55967		3,04891	1,74611
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
OD1	0,52431	4,35	9,4	30,6456%	
OD2	0,667058	3,05	12,3	36,3184%	
OD3	0,264425	2,2	6,15	19,2066%	
OD4	0,508085	3,4	10,6	30,3327%	
OD5	0,382928	2,9	7,65	26,8658%	
Total	0,225422	2,2	12,3	31,4068%	

ANOVA Table

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22,2022	4	5,55054	1,94	0,1174
Within groups	157,683	55	2,86697		
Total (Corr.)	179,886	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
OD3	12	4,76917	X
OD5	12	4,9375	X
OD4	12	5,8025	XX
OD1	12	5,92667	XX
OD2	12	6,3625	X

Contrast	Difference
OD1 - OD2	-0,435833
OD1 - OD3	1,1575
OD1 - OD4	0,124167
OD1 - OD5	0,989167
OD2 - OD3	*1,59333
OD2 - OD4	0,56
OD2 - OD5	*1,425
OD3 - OD4	-1,03333
OD3 - OD5	-0,168333
OD4 - OD5	0,865

* denotes a statistically significant difference.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparação de medias (LSD) temperatura (°C) da água

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard deviation
Tm1	12	32,0	32,0	4,36364	2,08893
Tm2	12	32,6667	33,0	3,15152	1,77525
Tm3	12	31,375	31,0	1,77841	1,33357
Tm4	12	31,1667	32,0	4,51515	2,12489
Tm5	12	30,5417	31,0	1,06629	1,03261
Total	60	31,55	32,0	3,31102	1,81962
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
Tm1	0,603023	29,0	36,0	6,52791%	
Tm2	0,512471	29,0	35,0	5,43444%	
Tm3	0,384969	29,0	34,0	4,25042%	
Tm4	0,613402	26,0	34,0	6,81782%	
Tm5	0,298089	29,0	32,0	3,38099%	
Total	0,234912	26,0	36,0	5,76742%	

ANOVA Table

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	31,725	4	7,93125	2,67	0,041
Within groups	163,625	55	2,975		
Total (Corr.)	195,35	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
Tm5	12	30,5417	X
Tm4	12	31,1667	XX
Tm3	12	31,375	XXX
Tm1	12	32,0	XX
Tm2	12	32,6667	X

Contrast	Difference	+/-
Tm1 - Tm2	-0,666667	1,
Tm1 - Tm3	0,625	1,
Tm1 - Tm4	0,833333	1,
Tm1 - Tm5	*1,45833	1,
Tm2 - Tm3	1,29167	1,
Tm2 - Tm4	*1,5	1,
Tm2 - Tm5	*2,125	1,
Tm3 - Tm4	0,208333	1,
Tm3 - Tm5	0,833333	1,
Tm4 - Tm5	0,625	1,

* denotes a statistically significant difference.

Resultados obtidos com STATGRAPHIC PLUS 10, da ANOVA e comparação de médias (LSD) da condutividade ($\mu\text{S.mL}^{-1}$)

Summary Statistics

	Count	Average	Mode	Variance	Standard deviation
Cdv1	12	86,5	106,0	531,364	23,0513
Cdv2	12	134,75		3117,3	55,8327
Cdv3	12	138,333	152,0	1788,24	42,2876
Cdv4	12	165,5	210,0	2454,09	49,5388
Cdv5	12	180,417		1698,63	41,2144
Total	60	141,1		2839,48	53,2868
	Standard error	Minimum	Maximum	Coeff. of variation	
Cdv1	6,65434	42,0	122,0	26,6489%	
Cdv2	16,1175	59,0	250,0	41,4343%	
Cdv3	12,2074	68,0	214,0	30,5694%	
Cdv4	14,3006	79,0	226,0	29,9328%	
Cdv5	11,8976	109,0	260,0	22,844%	
Total	6,87929	42,0	260,0	37,7653%	

ANOVA Table

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	62043,6	4	15510,9	8,09	0,000
Within groups	105486,0	55	1917,92		
Total (Corr.)	167529,0	59			

Multiple Range Tests

Method: 95,0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous Groups
Cdv1	12	86,5	X
Cdv2	12	134,75	X
Cdv3	12	138,333	X
Cdv4	12	165,5	XX
Cdv5	12	180,417	X

Contrast	Difference
Cdv1 - Cdv2	*-48,25
Cdv1 - Cdv3	*-51,8333
Cdv1 - Cdv4	*-79,0
Cdv1 - Cdv5	*-93,9167
Cdv2 - Cdv3	-3,58333
Cdv2 - Cdv4	-30,75
Cdv2 - Cdv5	*-45,6667
Cdv3 - Cdv4	-27,1667
Cdv3 - Cdv5	*-42,0833
Cdv4 - Cdv5	-14,9167

* denotes a statistically significant difference.

