



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



**PERFIS PROTEICOS, ENZIMÁTICOS E MIOTOXICIDADE INDUZIDOS PELOS
VENENOS DAS ARRAIAS AMAZÔNICAS *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello &
Thorson, 1987 E *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes –
Potamotrygonidae)**

Juliana Luiza Varjão Lameiras

Orientador: Professor Doutor Wallice Luiz Paxiúba Duncan

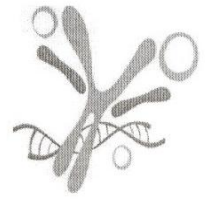
Coorientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Manaus-AM

2013




UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA




Ata da defesa de Dissertação da aluna
Juliana Luiza Varjão Lameiras, em 24
de maio de 2013.

Aos vinte e quatro dias do mês de maio do ano de dois mil e treze, as quatorze horas, no auditório Paulo Buhmheim, a discente deste Programa, **Juliana Luiza Varjão Lameiras**, orientada pelo Professor Doutor Wallice Luiz Paxiuba Duncan (UFAM) e co-orientada pela Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (UFAM) apresentou à banca examinadora sua dissertação intitulada, "**Perfis protéicos, enzimáticos e miotoxicidade induzidos pelos venenos das Arraias Amazônicas *Plesiotygon iwamae* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae)**". A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Professor Doutor Wallice Luiz Paxiuba Duncan (UFAM) (Orientador e Presidente), Professor Doutor Luiz Carlos de Lima Ferreira (FMT-AM) e a Professora Doutora Maria Lúcia Góes de Araújo (UFRPE), decidiu, após a apresentação e arguição, pela aprovação (X) ou não aprovação () de sua dissertação.


Professor Doutor Wallice Luiz Paxiuba Duncan (Orientador e Presidente)


Professor Doutor Luiz Carlos de Lima Ferreira (Membro)


Professora Doutora Maria Lúcia Góes de Araújo (Membro)

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

L228p Lameiras, Juliana Luiza Varjão
 Perfis protéicos, enzimáticos e miotoxicidade induzidos pelos
venenos das arraias amazônicas *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello
& Thorson, 1987 e *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841
(Chondrichthyes – Potamotrygonidae) / Juliana Luiza Varjão
Lameiras. - Manaus: UFAM, 2013.
88 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Imunologia básica e aplicada) —
Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Luiz Paxiúba Duncan
Co-orientadora: Prof^a Dra. Maria Cristina dos Santos

1. Arraia (Peixe) – Ferrão - Veneno 2. Chondrichthyes 3.
Potamotrygonidae 4. Elasmobrânquios I. Duncan, Wallace Luiz
Paxiúba (Orient.) II. Santos, Maria Cristina dos III. Universidade
Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 597.317.7(043.2)

*Aos meus pais, Bernardo e Rosanei, ao meu esposo, Oscar,
à minha avó, Lídia, e às minhas tias, Lídia e Ana Maria,
com muito carinho. Amo vocês.*



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor Wallace Luiz Paxiúba Duncan e Professora Doutora Maria Cristina dos Santos, que tiveram um papel fundamental na minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelos esclarecimentos nos meus momentos de dúvida e por terem confiado a mim a realização deste projeto. Obrigada pela valiosa aprendizagem ao longo desta jornada.

Agradeço ao PPGIBA/UFAM pelo apoio e oportunidade que me foram dados.

Agradeço à FAPEAM pela concessão de Bolsa do Programa de Apoio à Pós-graduação Stricto Sensu (POSGRAD – Resolução nº 014/2010). Também agradeço à FAPEAM e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido ao Doutor Wallace Duncan, os quais foram importantes para a execução deste trabalho.

Agradeço ao Biotério do Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz/Manaus) e aos técnicos da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado/AM, Sandra Caranhas e Carlos Melquiades, pelas contribuições ao projeto.

Agradeço especialmente ao Professor José de Ribamar Araújo, que tanto me ajudou na histopatologia, e, ainda, ao Professor Doutor Fábio Tonissi Moroni pela valiosa ajuda que recebi.

Agradeço aos amigos Allyson Guimarães, Andrea Tarragô, Helaine Virgolino, Maria Edilene Martins, Luciana Vieira e Paula Taquita, pelas noites de estudo na casa da Andrea, pelo carinho e pelo apoio nos momentos de dificuldade ao longo do mestrado. É bom fazer parte desta turma!

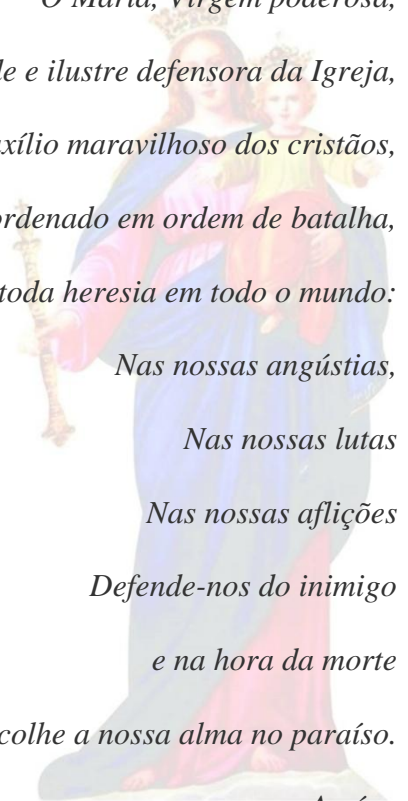
Agradeço aos amigos do Laboratório de Imunologia, Valéria Mourão, Rafael Sousa, Rafael Oliveira, José Dantas e Camilo Dias pela ajuda em todos os momentos.

Agradeço a toda minha família, principalmente aos meus pais, Bernardo e Rosanei, por todo o amor, apoio e carinho. Agradeço às minhas tias, Lúcia e Ana Maria, que sempre me incentivaram a estudar e que nunca me deixaram desistir.

E, finalmente, agradeço ao meu esposo, Professor Doutor Oscar Costa, pela compreensão, pelo carinho, pela dedicação, pelo apoio, pela atenção, pela paciência, enfim, por tudo. Agradeço a ele, que tantas vezes discutiu meus experimentos comigo, que ouviu minhas indagações e que me ajudou tanto. Meu amor, você me dá sorte na vida!

Oração à Nossa Senhora Auxiliadora

*Ó Maria, Virgem poderosa,
Tu, grande e ilustre defensora da Igreja,
Tu, Auxílio maravilhoso dos cristãos,
Tu, terrível como exército ordenado em ordem de batalha,
Tu, que só destruístes toda heresia em todo o mundo:
Nas nossas angústias,
Nas nossas lutas
Nas nossas aflições
Defende-nos do inimigo
e na hora da morte
acolhe a nossa alma no paraíso.
Amém.*



RESUMO

Acidentes por arraias de água doce são caracterizados por dor intensa e alterações patológicas no local da lesão, que incluem edema, eritema e, na maioria dos casos, necrose. Nesta pesquisa, os extratos de muco e tecido do dorso e do ferrão das arraias *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro* foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE e por zimografia. A atividade miotóxica (local e sistêmica) induzida pelos extratos, em modelo murino, foi avaliada por histopatologia e a atividade da enzima fosfolipase A₂ (hemólise indireta), em gel de agarose. O extrato do ferrão de *P. motoro* apresentou uma banda difusa de 10 kDa, várias entre 58 e 27 kDa e componentes proteolíticos acima de 58 kDa, enquanto que o extrato do dorso apresentou uma banda forte difusa com cerca de 41 kDa e um componente proteolítico de 6 kDa. Em *P. iwamae*, todas as amostras apresentaram uma banda intensa e difusa de 15 kDa e componentes proteolíticos de 6 e 40 kDa. As doses de 140 µg de proteína dos extratos de *P. iwamae* induziram hemólise indireta nos intervalos de tempo de 24 e 48 horas, porém, não formaram o halo de 10 mm de diâmetro (valor mínimo definido para a técnica), demonstrando uma fraca atividade de fosfolipase A₂. Necrose coagulativa do tecido muscular, regeneração das fibras musculares e presença de infiltrados inflamatórios, incluindo neutrófilos, macrófagos, e um número reduzido de eosinófilos e linfócitos foram observados 24 horas após a injeção da dose de 400 µg dos extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias *P. motoro* e *P. iwamae* no músculo gastrocnêmio dos camundongos. Tais resultados também foram observados, em menor volume, nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais, demonstrando que os extratos das duas espécies foram capazes de induzir a uma rbdomiólise sistêmica quando testados em camundongos BALB/c.

Palavras-chave: Potamotrygonidae; *Potamotrygon*; *Plesiotrygon*; Arraias de água doce; Ferrão; Rbdomiólise.

ABSTRACT

Accidents caused by freshwater stingrays are characterized by intense pain and pathological changes at the lesion site, which include edema, erythema and, in most cases, necrosis. In this study, mucus and tissue extracts from the dorsal region and sting of freshwater stingrays *Potamotrygon motoro* and *Plesiotrygon iwamae* were analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE and zymography. The myotoxic activity (local and systemic) induced by extracts in murine model was evaluated by morphometric analysis and enzymatic activity of the phospholipase A₂ (indirect hemolysis) in agarose gel. *P. motoro* sting extract showed a diffuse band with 10 kDa, several between 58 and 27 kDa, and proteolytic components above 58 kDa, while the dorsal region extract showed a strong and diffuse band around 41 kDa and a proteolytic component with 6 kDa. *P. iwamae* showed, in all samples, a diffuse and intense band with 15 kDa and proteolytic components around 6 and 40 kDa. Doses of 140 µg of *P. iwamae* protein extracts (sting and dorsal region) induced indirect hemolysis after 24 and 48 hours, but the halo diameter was below 10 mm (minimum value set for the technical), showing a weak phospholipase A₂ activity. Coagulative necrosis of the muscle tissue, muscle fiber regeneration and inflammatory infiltrates, including neutrophils, macrophages and a reduced number of eosinophils and lymphocytes were observed 24 hours after injection of 400 µg of *P. motoro* and *P. iwamae* mucus extracts in mice gastrocnemius muscle. These results were also observed, in a lower proportion, in the gastrocnemius muscles of the contralateral legs, showing that extracts of both species were able to induce a systemic rhabdomyolysis when tested in BALB/c mice.

Key-words: Potamotrygonidae; *Potamotrygon*; *Plesiotrygon*; Freshwater stingrays; Sting, Rhabdomyolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplar de *Paratrygon aiereba*, fêmea, com a parte ventral exposta, exibindo os cinco pares de fendas branquiais e as nadadeiras pélvicas. Foto: Juliana Lameiras. 3
- Figura 2. Exemplos de arraias marinhas do gênero *Dasyatis*, presente no litoral brasileiro. Foto: Juliana Lameiras. 3
- Figura 3. Os potamotrigonídeos são vivíparos aplacentários. A – Momento do nascimento de uma arraia cururu (*Potamotrygon* sp.). B – Neonato de arraia cururu. Fotos: Wallace Duncan. 4
- Figura 4. Exemplos de arraias de água doce da Bacia Amazônica. A – *Plesiotrygon iwamae*. B – *Paratrygon aiereba*. C – *Heliotrygon gomesi*. Fotos: Wallace Duncan. 5
- Figura 5. Exemplos de arraias de água doce da Bacia Amazônica do gênero *Potamotrygon*. A – *Potamotrygon* sp. (arraia cururu); B – *P. schroederi*; C – *P. orbignyi*; D – *P. motoro*. Fotos: Wallace Duncan. 6
- Figura 6. O horário ideal para se capturar arraias de água doce é à noite, o que torna a tarefa muito arriscada para os pescadores, ainda mais no ambiente da Floresta Amazônica, onde, além das arraias, existem outros animais potencialmente perigosos, como serpentes e jacarés. Foto: Wallace Duncan. 7
- Figura 7. Ferrão de arraia de água doce (*Potamotrygon* sp.). Foto: Wallace Duncan. 7
- Figura 8. A – Marcas deixadas (“cama de arraia”) na areia por uma arraia durante o forrageamento noturno. B – Arraia *Paratrygon aiereba* focada com uma lanterna durante a noite. Ao se enterrar na areia, as arraias ficam camufladas, causando os acidentes. Fotos: Wallace Duncan. 9
- Figura 9. Ferimento na mão de um pescador durante a manipulação de uma arraia. A dor causada pelo veneno das arraias de água doce costuma ser desproporcional ao tamanho do ferimento. Mesma uma pequena lesão como esta causa uma dor insuportável. Foto: Wallace Duncan. 9
- Figura 10. A – Lesão com necrose e infecção causada por ferroadada de uma arraia de água doce da região Amazônica. B – Lesão após tratamento com antibióticos, ainda não cicatrizada. Vale ressaltar que as lesões causadas por arraias demoram a cicatrizar. Fotos cedidas gentilmente por Daniela Maia. 10

- Figura 11. Sistema teste contendo linhas sobrepostas a seção de músculo (aumento $\approx 8x$). A área de cada quadrante é equivalente a $800.000 \mu m^2$. No exemplo, 74 campos foram reconhecidos na seção e 12 campos foram selecionados ($74/12 = \sim 6$). Um número ao acaso foi escolhido entre 1-6 9, nesse caso 3 (equivalente ao campo 1). Os demais seguiram em sequência a esse campo em intervalos de 6 em 6 campos. Observe que a contagem dos campos começa a partir do quadrante superior esquerdo da seção (seta) e continua no sentido esquerda-direita e direita-esquerda a cada linha (setas curvas). 32
- Figura 12. Sistema teste de contagem de pontos sobreposto à imagem do tecido muscular. Cada sistema teste foi composto por 320 pontos no total (aumento $400x$). 32
- Figura 13. A – Perfis eletroforéticos dos mucos do dorso e do ferrão da arraia *Potamotrygon motoro*. B – Zimografia, confirmando a atividade proteolítica, com gelatina como substrato, dos extratos de muco do ferrão e do dorso das arraias *P. motoro* e *Plesiotrygon iwamae*. As bandas sem coloração no gel de zimografia indicam a atividade gelatinolítica dos venenos. F/SR = ferrão sem-redução. F/C = ferrão com redução. D/SR = dorso sem redução. D/CR = dorso com redução. 34
- Figura 14. Perfis eletroforéticos dos mucos do dorso e do ferrão de exemplares de *Plesiotrygon iwamae*. D/SR = dorso sem redução. D/CR = dorso com redução. F/SR = ferrão sem-redução. F/C = ferrão com redução. A linha clara indica a banda de 15 kDa presente em todas as amostras. 35
- Figura 15. Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* e pelos extratos de muco do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. A – poços aplicados com controle negativo (salina estéril), 70 e 140 μg de muco do ferrão e do dorso (diluídos em 15 e 30 μl de salina, respectivamente). B – veneno de *B. atrox*, aplicado nos poços, nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 μg . Observe que os halos de hemólise formados pelo veneno de *B. atrox* são bem maiores e estão em concentrações menores, quando comparados aos extratos de muco do dorso e do ferrão *P. iwamae*. 36
- Figura 16. Gráfico da atividade fosfolipásica mensurada dos extratos de muco do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. α indica diferença significativa quando o mesmo veneno fora testado nos intervalos de tempo de 24 e 48 horas, $p < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao controle negativo, $p < 0,05$. 36

Figuras inclusas no artigo enviado à Revista Toxicon:

Figura 1. Arraias de água doce usadas neste estudo, coletadas no Lago do Janauacá, Rio Solimões, próximo à cidade de Manaus. A: exemplar de *Potamotrygon motoro*. B: exemplar de *Plesiotrygon iwamae*.

57

Figura 2. Perfis eletroforéticos dos extratos de muco das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*. A: perfis eletroforéticos dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. motoro*. B: perfis eletroforéticos dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. iwamae*. C: zimografia dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. motoro*. D: zimografia dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. iwamae*.

57

Figura 3. Comparações histopatológicas dos efeitos induzidos pelos extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, coloração por H-E. A: Animal do grupo controle, sem evidência de necrose do tecido muscular. B: infiltrados inflamatórios presentes em gastrocnêmio diretamente injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. No quadrante, detalhe mostrando a aderência de infiltrados inflamatórios em vaso sanguíneo. C: vaso sanguíneo (V) mostrando novamente a aderência de infiltrados inflamatórios, desta vez, em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. D: necrose coagulativa do tecido muscular (*), caracterizada pela fragmentação e eosinofilia sarcoplasmática, perda da estriação transversal e presença de núcleos picnóticos (ou ausentes), em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do dorso de *P. iwamae*. E: regeneração muscular, caracterizada pela basofilia sarcoplasmática e proliferação das células satélites, presente em músculo diretamente injetado com o muco do dorso de *P. motoro*. F: em detalhe, presença de numerosos neutrófilos (seta) em músculo injetado diretamente com o muco do dorso de *P. iwamae*. Todas as imagens estão em aumento de 400x, exceto F (aumento de 1000x).

58

Figura 4: Comparações histopatológicas dos efeitos induzidos pelos extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, coloração de PTAH (em azul) e marcação imunohistoquímica para CD68. A: Animal do grupo controle, sem evidência de necrose coagulativa do tecido muscular, mostrando claramente a estriação transversal do músculo. B: necrose coagulativa do tecido muscular em gastrocnêmio injetado diretamente pelo muco do

ferrão de *P. motoro* (*). A fibra muscular necrosada, com perda da estriação transversal, não se cora pela hematoxilina fosfotúngstica. C: necrose coagulativa do tecido muscular (*), evidenciada pela coloração de PTAH, em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. D: animal do grupo controle, sem evidência de macrófagos. E: numerosos macrófagos (quadrante) presentes em tecido adiposo do músculo gastrocnêmio injetado diretamente com o muco do ferrão de *P. iwamae*. F: macrófagos retirando debris celulares em músculo injetado diretamente pelo muco do dorso de *P. iwamae*. Todas as imagens estão em aumento de 400x, exceto F (aumento de 1000x).

59

Figura 5: Resultados morfométricos (densidade de volume, %) do efeito dos venenos de arraias de água doce sobre o tecido muscular de camundongo (massa = 18 a 22g). A: porcentagem de músculo sem dano. B: porcentagem de rabdomiólise. C: porcentagem de regeneração muscular. D: porcentagem de infiltrados inflamatórios. E: porcentagem dos vasos sanguíneos. * indica diferença significativa entre o os gastrocnêmios inoculados (direitos) e o grupo controle, $p < 0,05$. ** indica diferença significativa entre os gastrocnêmios direitos e os esquerdos (não-inoculados), $p < 0,05$.

60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rotina histológica adotada para o processamento do músculo gastrocnêmio dos camundongos BALB/c.	31
Tabela inclusa no artigo enviado à Revista Toxicon – Tabela 1. Análise morfométrica (densidade de volume, %) do efeito dos venenos de araias de água doce sobre o tecido muscular de camundongo (massa = 18 a 22 g).	54

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO – Revisão da literatura na forma de artigo científico enviado para a revista <i>Scientia Amazonia</i> (ISSN: 2238.1910)	1
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	24
Geral	24
Específicos	24
METODOLOGIA	25
Obtenção e preparo dos venenos	25
Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	25
Zimografia	26
Atividade fosfolipásica	26
Animais do experimento	27
Indução da atividade miotóxica local e sistêmica	27
Análise histopatológica	27
Imunohistoquímica	28
Densidade de volume (volume relativo, Vv) – Esterelogia	28
Análises estatísticas	29
RESULTADOS – Parte I – Dados não colocados na publicação	33
Perfis eletroforéticos e zimografia	33
Atividade fosfolipásica	35
DISCUSSÃO	24
RESULTADOS – Parte II – anexo do trabalho na forma de artigo científico enviado para a revista <i>Toxicon</i> (ISSN: 0041-0101) – versão na língua Portuguesa	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade federal do Amazonas (CEEA/UFAM), protocolo nº 070/2012	71
ANEXO II – Aprovação para captura IBAMA/SISBIO nº 22055-2, de 08/12/2010	72
ANEXO III – Carta de aceite do artigo de revisão da literatura, intitulado “Arraias de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes”, a ser submetido à revista <i>Scientia Amazonia</i> , avaliado pelos membros da banca julgadora.	75

INTRODUÇÃO

REVISÃO DA LITERATURA NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO À REVISTA *Scientia Amazonia* (ISSN: 2238.1910)

ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): BIOLOGIA, VENENO E ACIDENTES[#]

Juliana Luiza Varjão Lameiras¹, Oscar Tadeu Ferreira da Costa², Maria Cristina dos Santos³ e
Wallice Luiz Paxiúba Duncan²

Resumo

Acidentes com arraias da família Potamotrygonidae são muito comuns no Brasil. São animais de água doce e possuem de 1 a 3 ferrões de dentina, localizados na base da cauda, usados na defesa do animal. O ferrão é coberto por uma bainha tegumentar contendo glândulas mucosas e de veneno. Os acidentes geralmente acontecem quando as pessoas pisam no dorso do animal, escondido sob a areia. Por consequência, a arraia introduz o ferrão no pé ou no calcanhar da vítima, causando um ferimento extremamente dolorido, que muitas vezes infecciona e leva à necrose do tecido. Na região Amazônica, a questão é ainda mais grave, pois os acidentes costumam ocorrer em lugares distantes e isolados, muitas vezes, sem atendimento médico. O tratamento é baseado no uso de anti-inflamatórios e antibióticos, pois ainda não existe antídoto específico para o veneno das arraias.

Palavras-chave: Potamotrygonidae; *Potamotrygon*; Arraias de água doce; Veneno; Ferrão.

Abstract

Accidents with stingrays of the Potamotrygonidae family are very common in Brazil. They are freshwater animals and have 1-3 dentin stingers, located at the base of the tail, used in protecting the animal. The stinger is covered by a cutaneous sheath containing mucous and poison cells. Accidents usually happen when people step on the back of the animal, hidden under the sand. Consequently, the ray enters the sting on the foot or the heel of the victim, causing an extremely painful injury, which infects and often leads to tissue necrosis. In the Amazon region, the issue is even more serious because accidents usually occur in distant and isolated localities, often without medical care. The treatment is based on the use of anti-inflammatories and antibiotics, as yet there is no specific antidote for the poison of stingrays.

Key-words: Potamotrygonidae; *Potamotrygon*; Freshwater stingrays; Venom; Sting.

[#] Parte de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

1. Aluna do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: julameiras@hotmail.com

2. Professores do Laboratório de Citologia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 6.200, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mails: oscarcosta@ufam.edu.br e wduncan@ufam.edu.br

4. Professora Associada, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 6.200, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: mcsantos@ufam.edu.br.

*autor para correspondência.

1. Introdução

Durante a evolução, os animais desenvolveram sofisticados mecanismos para capturar a presa ou intimidar o agressor. Uma dessas estratégias foi justamente a produção de venenos ou peçonhas, estudados ao longo dos anos para a obtenção de novos fármacos ou, ainda, para a produção de ferramentas para elucidar mecanismos fisiológicos (CONCEIÇÃO et al., 2006; KOZLOV et al., 2006). A produção de toxinas por animais aquáticos garante a sobrevivência em ecossistemas altamente competitivos. Estes animais produzem um vasto número de componentes tóxicos como alcaloides, esteroides, peptídeos e proteínas, com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das existentes em venenos de animais terrestres (RUSSELL, 1971; MAGALHÃES et al., 2006).

Os animais aquáticos de maior importância médica são os peixes e os acidentes provocados por esses animais são denominados de ictismo. O ictismo pode ser dividido em acidentes acantotóxicos (forma ativa) ou sarcotóxicos (forma passiva). Os acantotóxicos são causados por peixes peçonhentos, por exemplo, as arraias, sendo de caráter traumático ou necrosante, com dor predominante. Os peixes peçonhentos possuem ferrões ou espinhos, retrosserrilhados e pontiagudos, envolvidos por tegumento, capazes de causar ferimentos e introduzir a peçonha. Já os sarcotóxicos ocorrem pela ingestão de peixes venenosos (como baiacus, que podem conter toxinas na pele, músculos, vísceras ou gônadas) ou de peixes com a carne contaminada por produtos químicos ou bactérias (FUNASA, 2001).

Existem inúmeras espécies de peixes peçonhentos, principalmente, em áreas tropicais (HADDAD JR., 2008), incluindo as arraias (Elasmobrânquios), os bagres (Siluriformes), o peixe-escorpião e o peixe-pedra (Scorpaeniformes), o peixe-sapo (Batrachoidiformes), o peixe-zebra (Cypriniformes), o peixe-aranha e o peixe-

cirurgião (Perciformes) (CHURCH; HODGSON, 2002; HADDAD JR., 2003; SMITH; WHEELER, 2006). Os acidentes causados por peixes geram ferimentos com diversos sintomas, como dor intensa, necrose cutânea, bolhas, ulcerações e febre. Podem ocorrer mortes em casos de lesões que atingem órgãos vitais ou que estejam associadas com infecções bacterianas (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). Embora os acidentes com peixes sejam considerados severos, existem poucos relatos científicos a respeito (LOPES-FERREIRA et al., 2000; SIVAN et al., 2010). Enquanto há muitos trabalhos caracterizando as atividades biológicas de toxinas de animais terrestres, como serpentes, aranhas e escorpiões, há poucos dados sobre venenos de peixes, como as arraias (CONCEIÇÃO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2006; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

A presente revisão bibliográfica teve como objetivo verificar os principais avanços e estudos científicos relacionados aos acidentes com arraias de água doce.

2. Metodologia

Para a elaboração do presente artigo, foi feito levantamento bibliográfico nos portais de busca Periódicos CAPES (www.periodicos.capes.gov.br), Sciverse Hub (www.hub.sciverse.com), Sciverse Science Direct (www.sciencedirect.com), Sciverse Scopus (www.scopus.com), Scirus (www.scirus.com), Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) e Google Acadêmico (scholar.google.com.br), utilizando-se as seguintes palavras-chave: Potamotrygonidae, *Potamotrygon*, “stingray injuries”, “fresh water stingrays”, “stingray venom”, “stingray accidents” e ictismo. Foram encontradas 350 publicações, do período de 1952 a 2012, das quais 96 foram usadas como referência bibliográfica para compor este artigo de revisão.

3. Arraias: classificação e aspectos gerais

Dentre os principais peixes peçonhentos estão as arraias, que, apesar de não serem agressivas, causam um grande número de acidentes nas regiões que habitam (HALSTEAD, 1966; ERICSSON et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2008), e, assim, são consideradas um problema de saúde pública (ERICSSON et al., 2006). As arraias peçonhentas pertencem à Classe Chondrichthyes, (peixes cartilagosos), Subclasse Elasmobranchii, Subdivisão Batoidea, ordem Myliobatiformes (NELSON, 2006), chamadas de “*stingrays*” (do inglês, *sting*, ferrão, e *ray*, arraia), sendo a única ordem de arraias providas de ferrões na cauda (LOVEJOY, 1996; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004). As arraias têm o corpo achatado dorsoventralmente, com os olhos e os espiráculos situados na região dorsal, e as fendas branquiais (cinco pares) (Figura 1) situadas na parte ventral (HALSTEAD, 1988).

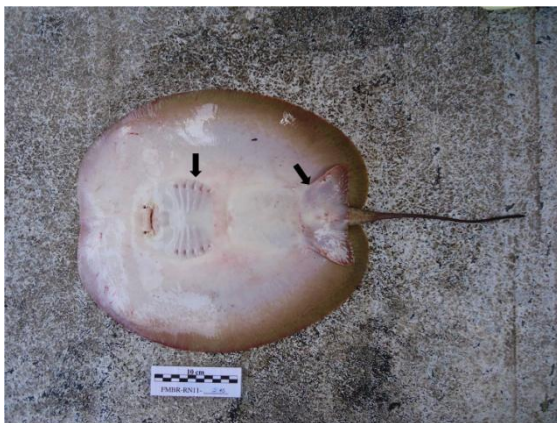


Figura 1. Exemplar de *Paratrygon aiereba*, fêmea, com a parte ventral exposta, exibindo os cinco pares de fendas branquiais e as nadadeiras pélvicas. Foto: Juliana Lameiras.

As arraias da Família Potamotrygonidae medem cerca de 40 cm. Algumas espécies dulcícolas da família *Dasyatidae* podem passar de um metro de diâmetro. As arraias marinhas podem atingir até cinco metros na idade adulta (família *Mobulidae*) (SANTOS, 1952; HALSTEAD, 1988).

As arraias apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em mares temperados e tropicais (UZEL et al., 2002; BARBARO et al., 2007) e, ainda, nos rios da América do Sul, África Equatorial e no Rio Mekong, no Sudeste asiático (MAGALHÃES et al., 2008). No Brasil, as arraias marinhas (Figura 2) estão distribuídas por toda a costa do Oceano Atlântico, e as espécies de água doce, da família *Potamotrygonidae*, estão presentes nos rios das regiões Norte, Centro-Oeste, Sul e Sudeste (CARVALHO et al., 2003). No Nordeste, ocorrem apenas duas espécies de potamotrygonídeos, no Rio Parnaíba, nos estados do Maranhão e Piauí: *Potamotrygon orbignyi* (MORO et al., 2012a) e *Potamotrygon signata*, que é uma espécie endêmica (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009; ROSA et al., 2010; MORO et al., 2012b).



Figura 2. Exemplares de arraias marinhas do gênero *Dasyatis*, presente no litoral brasileiro. Foto: Juliana Lameiras.

4. Família Potamotrygonidae: biologia, diversidade e distribuição geográfica

Espécies da família *Potamotrygonidae* são membros bem conhecidos da fauna de peixes neotropicais, mais pelos ferimentos que podem causar do que por suas propriedades biológicas ou pela história evolutiva intrigante (SILVA; CARVALHO, 2011). Essas arraias também são conhecidas por serem comercializadas como peixes ornamentais (DUNCAN et al., 2010). Diferente de

qualquer outra família viva de arraiais, os potamotrygonídeos se diversificaram no ambiente de água doce da América do Sul (THORSON et al., 1983; LOVEJOY, 1996; CARVALHO et al., 2004; SILVA; CARVALHO, 2011), a partir de um grupo irmão do gênero *Himantura* (família Dasyatidae), durante as incursões marinhas do Mioceno, há aproximadamente 20 milhões de anos atrás (LOVEJOY et al., 1998; LOVEJOY et al., 2006). Na Bacia Amazônica, estas arraiais são encontradas em todos os tipos de rio (SIOLI, 1967), incluindo rios de água branca (rica em sedimentos), água clara (pobre em sedimento), e água preta (rica em ácidos húmicos) (DUNCAN; FERNANDES, 2010; ROSA et al., 2010). Podem viver em habitats lênticos (como lagos e igapós), lóticos (incluindo fortes correntezas) (ALMEIDA et al., 2008; 2009) e até próximo de cachoeiras e corredeiras, nos mais diversos substratos, como fundos arenosos, lodosos e rochosos (ROSA et al., 2010). Alimentam-se principalmente de pequenos invertebrados, (incluindo insetos, anelídeos, moluscos, crustáceos), peixes ósseos e até mesmo de bagres (SHIBUYA et al., 2012).

Os potamotrygonídeos são um grupo claramente monofilético, compartilhando especializações morfológicas e fisiológicas únicas, incluindo a pélvis com um grande processo de expansão mediana anterior (processo pré-pélvico), sangue com baixas concentrações de ureia e redução da glândula retal (GERST; THORSON, 1977). São animais estenoalinos e hiperosmóticos em relação ao ambiente (TREBERG et al., 2006). A maioria das espécies tem arranjos dorsais coloridos, incluindo ocelos, padrões reticulares e marcas vermiformes, que, geralmente, são espécie-específica (THORSON et al., 1983). O tamanho pode do animal pode variar de 25 cm de comprimento do disco (*Potamotrygon* sp., arraia cururu) a 100 cm (*Paratrygon aiereba*) (ROSA et al., 2010). Além do ferrão, algumas espécies

apresentam dentículos na superfície dorsal do disco e numerosos tubérculos mineralizados ao longo da cauda. Tais estruturas também são capazes de causar envenenamento (CARVALHO et al., 2003).

Em alguns lugares do Brasil, o ferrão e a gordura de algumas espécies de arraiais de água doce são usados até mesmo no preparo de remédios caseiros para asma, reumatismo e artrite (ALVES; ROSA, 2007; ALVES; ALVES, 2011).

As arraiais de água doce são vivíparas aplacentárias (THORSON et al., 1983) (Figura 3). Os embriões são nutridos por uma secreção da mucosa viliforme do útero materno, chamada de trophonemata, o que caracteriza o modo reprodutivo dos potamotrygonídeos como viviparidade matrotrofica (WOURMS et al., 1988). A gestação pode variar de três a nove meses, dependendo da espécie. As fêmeas geralmente são maiores que os machos e o ciclo reprodutivo parece estar relacionado ao ciclo hidrológico (ARAÚJO et al., 2004; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005).



Figura 3. Os potamotrygonídeos são vivíparos aplacentários. A – Momento do nascimento de uma arraia cururu (*Potamotrygon* sp.). B – Neonato de arraia cururu. Fotos: Wallace Duncan.

Assim como as espécies marinhas, as arraias de água doce apresentam baixa fecundidade, maturação sexual tardia e crescimento lento, características que tornam os potamotrigonídeos sejam mais susceptíveis a impactos ambientais (CARRIER et al., 2004).

O histórico taxonômico da família Potamotrygonidae é repleto de equívocos e incertezas devido ao policromatismo do grupo, que, no passado, levou à descrição de espécies em sinonímia e, até hoje, gera dúvidas durante a identificação de espécimes coletados ou guardados em coleções (CARVALHO et al., 2003; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009; ROSA et al., 2010). Quatro gêneros estão reconhecidos atualmente: *Potamotrygon*, *Paratrygon* (monotípico), *Plesiotrygon*, descrito por ROSA et al. (1987), com uma segunda espécie, *P. nana*, descrita por CARVALHO; RAGNO (2011), e *Heliotrygon*, descrito recentemente por CARVALHO; LOVEJOY (2011), com duas espécies reconhecidas.

Potamotrygon é o gênero mais diverso, com aproximadamente 20 espécies válidas (ROSA et al., 2010; SILVA; CARVALHO, 2011). Apresenta cauda moderadamente robusta e curta, geralmente mais curta que o comprimento do disco, com ferrões na porção mediodistal (CARVALHO et al., 2003). Ocorre em todos os países da América do Sul (exceto o Chile), nas drenagens dos rios Atrato e Magdalena (Colômbia), Orinoco e Maracaibo (Venezuela), rios costeiros das Guianas, Suriname, Rio Amazonas e seus afluentes (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela), Rio Tocantins (Brasil), e na bacia do Paraná-Paraguai (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) (ROSA et al., 2010).

Plesiotrygon (Figura 4A) é popularmente conhecida como “arraia-chicote”, devido à longa cauda, com ferrões em posição mediana (ROSA et al., 1987). O gênero é endêmico para a drenagem Amazônica, do Rio Napo, no Equador, até a foz do Rio Amazonas, no

Pará, inclusive do Baixo Rio Tocantins (ROSA et al., 2010).

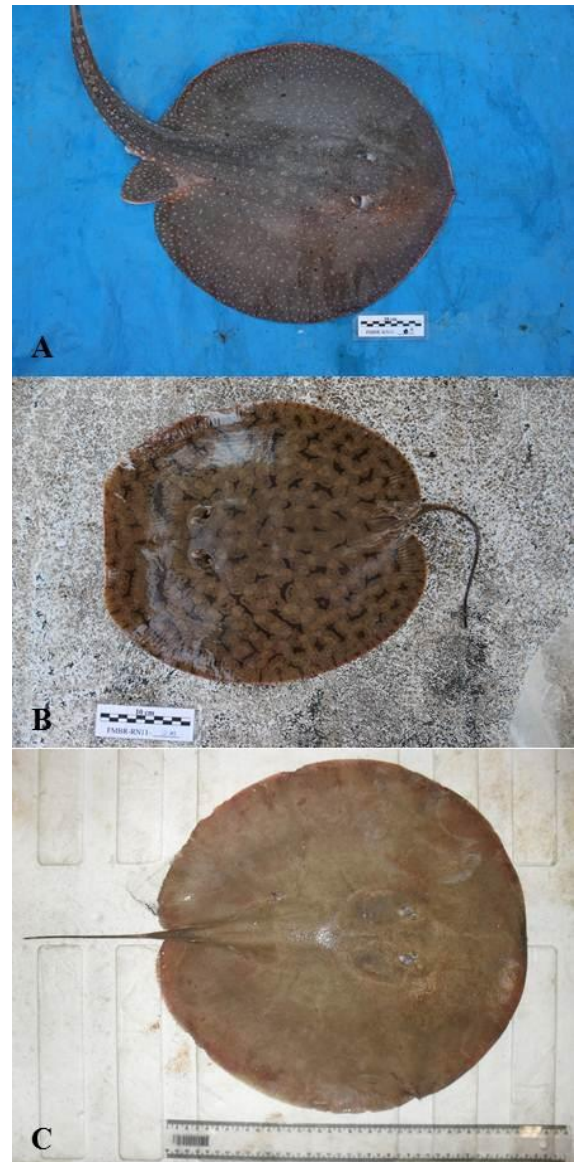


Figura 4. Exemplos de arraias de água doce da Bacia Amazônica. A – *Plesiotrygon iwamae*. B – *Paratrygon aiereba*. C – *Heliotrygon gomesi*. Fotos: Wallace Duncan.

Em *Paratrygon*, (Figura 4B) a cauda é longa, nos juvenis, e geralmente reduzida e afilada nos adultos, com os ferrões posicionados na base. É conhecida pelos ribeirinhos da região Amazônica como “arraia-maçã”, devido ao formato peculiar de seu disco corporal (ROSA, 1990). Ocorre no norte da Bolívia, Leste do Peru e Equador, Norte do Brasil (Amazonas e Pará), no Rio Amazonas e seus afluentes, Baixo Rio Tocantins, e

Venezuela, na bacia do Rio Orinoco (ROSA et al., 2010).

Heliostrongylus (Figura 4C) é chamada de “arraia redonda”, pois possui o corpo bem circular em comparação aos outros gêneros, que apresentam o corpo mais oval. Seu ferrão é extremamente reduzido. A distribuição é semelhante à de *Plesiostrongylus iwamae*, ocorrendo no Rio Amazonas e seus tributários. (CARVALHO; LOVEJOY, 2011).

Espécies como a arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) (Figura 5A) e *P. schroederi* (Figura 5B) são endêmicas do Rio Negro, enquanto *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi* (Figura 5C) e *Potamotrygon motoro* (Figura 5D) têm ampla distribuição geográfica e podem ser encontradas nas águas do Rio Amazonas, na foz do Rio Tocantins e no Rio Negro (DUNCAN; FERNANDES, 2010; ROSA et al., 2010).

Recentemente, foram descritas as espécies *Potamotrygon marinae*, que ocorre na Guiana Francesa, nos rios Oiapoque e Maroni (DEYNAT, 2006), *Potamotrygon boesemani*, descrita da bacia do rio Corantijn, no Suriname, (ROSA et al., 2008) *Potamotrygon tatiane*, que foi descrita do Río Madre de Díos, Peru, Alto Rio Madeira, ocorrendo em simpatria com outras espécies de *Potamotrygon* (*Potamotrygon falkneri*, *P. orbignyi* e *P. motoro*) (SILVA; CARVALHO, 2011) e *Potamotrygon tigrina*, descrita do Rio Nanay, no Alto Rio Amazonas, Peru (CARVALHO et al., 2011).

Em São Paulo e nos municípios paranaenses e sul-matogossenses, localizados às margens do Rio Paraná, à montante das Sete-Quedas de Guaíra/PR, arraias não faziam parte da fauna aquática nativa até o final da década de 1970. No entanto, com a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em 1982, a barreira geográfica representada pelas Sete-Quedas foi submersa, possibilitando a colonização do trecho situado à montante de Guaíra por espécies como *Potamotrygon schuhmacheri*, *P. falkneri* e *P. motoro*, que

vem se aproveitando dos canais artificiais nas barragens da Hidrovia Tietê-Paraná para ampliar sua área de distribuição, despertando interesse de pesquisadores e da comunidade médica, pois já existem acidentes com arraias nestes locais (GARRONE NETO et al., 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010).

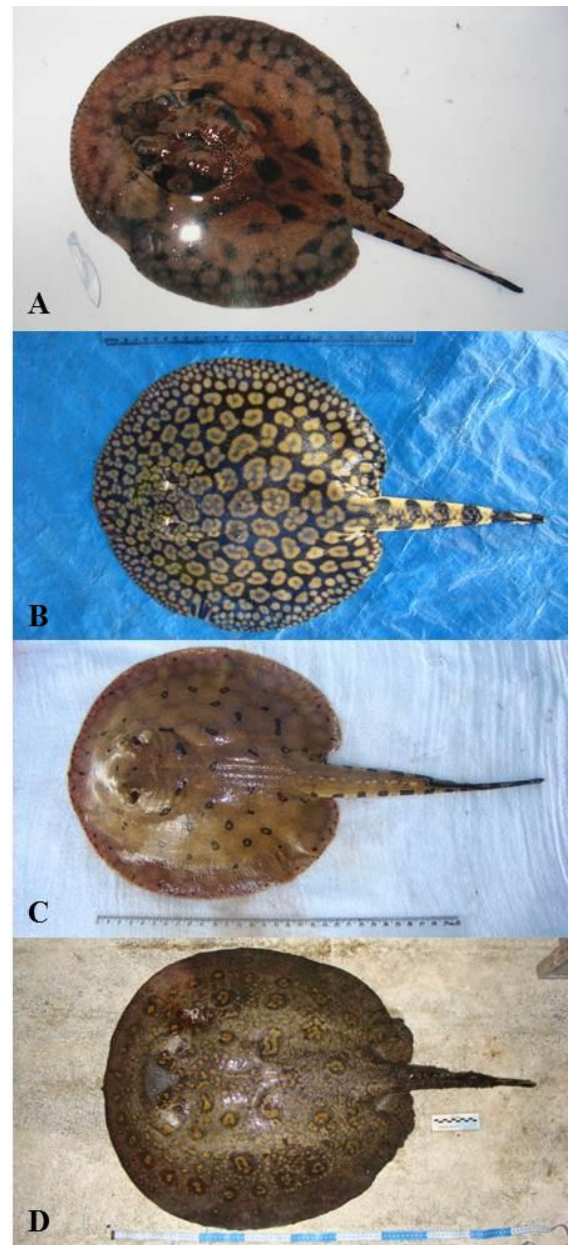


Figura 5. Exemplos de arraias de água doce da Bacia Amazônica do gênero *Potamotrygon*. A – *Potamotrygon* sp. (arraia cururu); B – *P. schroederi*; C – *P. orbignyi*; D – *P. motoro*. Fotos: Wallace Duncan.

Recentemente, a espécie *P. motoro* foi registrada no Alto do Reservatório

Seletar, em Cingapura. Esta espécie foi introduzida neste local devido ao comércio de arraias para aquariofilia. Por ser um predador de topo de cadeia, de se alimentar de uma grande variedade de animais e de ser uma das espécies mais fecundas de potamotrigonídeos, a *P. motoro* tem potencial para ser uma espécie invasora (NG et al., 2010).

Devido ao grande tamanho corporal, ao endemismo de algumas espécies, à dificuldade de captura e aos riscos com o manuseio (Figura 6), os potamotrigonídeos têm sido pouco estudados, constituindo uma parcela pouco conhecida da fauna água doce, quando comparados a outros grupos de animais aquáticos (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009).



Figura 6. O horário ideal para se capturar arraias de água doce é à noite, o que torna a tarefa muito arriscada para os pescadores, ainda mais no ambiente da Floresta Amazônica, onde, além das arraias, existem outros animais potencialmente perigosos, como serpentes e jacarés. Foto: Wallace Duncan.

5. Ferrão, veneno e muco

As arraias possuem de um a três ferrões na base da cauda que, quando usada na defesa do animal, funciona como um chicote, causando uma lesão severa (THORSON et al., 1988; BARBARO et al., 2007; DEHGHANI et al., 2009). Os ferrões (Figura 7) são estruturas afiadas, alongadas e mineralizadas, derivados de denticulos dérmicos modificados (GARRONE NETO; HADDAD JR.,

2009), retroserrados bilateralmente e cobertos por uma bainha tegumentar com um sulco glandular ventrolateral, contendo glândulas de veneno ao longo de cada borda (HALSTEAD, 1988; DEHGHANI et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). A distribuição dessas células secretoras, ou glândulas de veneno, pode diferir de acordo com a espécie, e o ferrão pode chegar até 37 cm em algumas espécies (WEISS; WOLFENDEN, 2001; CAMPBELL et al., 2003). Os ferrões costumam ser proporcionais ao tamanho do animal e são regenerados à medida que são perdidos (SANTOS, 1952). A quantidade, o tamanho e a posição deles diferem entre as famílias da ordem Myliobatiformes (HALSTEAD, 1988), características que, aliadas aos hábitos das arraias, podem influenciar na ocorrência e na gravidade dos acidentes (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009).

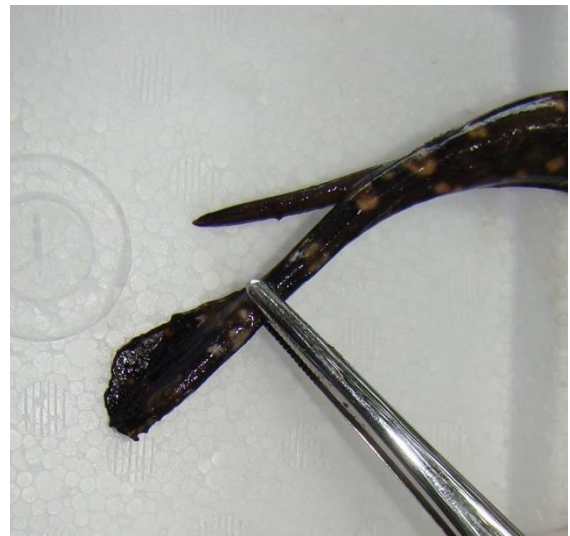


Figura 7. Ferrão de arraia de água doce (*Potamotrygon* sp.). Foto: Wallace Duncan.

Em um estudo histológico dos ferrões das arraias de água doce *Potamotrygon leopoldi*, *P. falkneri*, *P. orbignyi*, e das arraias marinhas *Dasyatis guttata* e *Aetobatus narinari*, PEDROSO et al. (2007) mostraram que no ferrão das espécies de água doce existe um maior número de células secretoras de proteína, de dois tipos diferentes, distribuídos por toda a epiderme, enquanto nas espécies

marinhas, estas células secretoras estão apenas ao redor ou dentro dos sulcos ventrolaterais do ferrão. Segundo os autores, estas diferenças poderiam influenciar nos envenenamentos por arraias de água doce, que são, geralmente, mais graves e apresentam maior porcentagem de necrose que os acidentes causados por arraias marinhas.

DEGHANI et al. (2010), em análise histológica dos ferrões das espécies marinhas *Himantura walga*, *Himantura* sp., *Pastinachus sephen* (Dasyatidae), *Aetobatus flagellum* (Myliobatidae) e *Gymnura poecilura* (Gymnuridae), do Golfo Pérsico e do Mar Oman, também verificaram a presença de células produtoras de muco, mas, somente os ferrões das arraias da família Dasyatidae apresentaram células secretoras de veneno ao redor ou dentro dos sulcos ventrolaterais do ferrão, como no estudo citado anteriormente. Tal fato poderia explicar a gravidade dos envenenamentos causados pelas arraias da família Dasyatidae, que originou as arraias de água doce.

Em adição ao veneno, as arraias produzem um muco espesso, que recobre todo o corpo do animal. O muco, secretado por células mucosas localizadas na epiderme, é considerado a primeira linha de defesa (ZHAO et al., 2008), e, como observado em espécies marinhas, pode conter aminoácidos, peptídeos, carboidratos, glicopeptídeos, glicolipídeos, (KLESZIUS et al., 2008) serotonina, fosfodiesterase, 5'- nucleotidase, agentes vasoconstritores (AUERBACH, 1991; EVANS; DAVIES, 1996; WEISS; WOLFENDEN, 2001) componentes imunes, como lisozimas, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento, lectinas, proteína C-reativa, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos (ALEXANDER; INGRAM, 1992).

VENNILA et al. (2011) mostraram que o muco das arraias marinhas *Dasyatis sephen* e *Himantura gerrardi* possui atividade antimicrobiana contra as

bactérias *Salmonellatyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*, e atividade antifúngica contra os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Alternaria alternaria*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. Outros estudos também mostram que o muco da arraia de água doce *Potamotrygon* cf. *henlei* possui peptídeos antimicrobianos contra as bactérias *Micrococcus luteus* e *E.coli*, e contra os fungos *Candida albicans* e *C. tropicalis* (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2012). Estes estudos ressaltam a importância do muco das arraias na imunidade inata. Peptídeos, como orpotrina e porflan, também foram isolados do epitélio do ferrão de *Potamotrygon* gr. *orbigny* (CONCEIÇÃO et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2009). Tais peptídeos foram capazes de induzir vasoconstrição e inflamação, respectivamente.

MAGALHÃES et al. (2008) isolaram e caracterizaram uma hialuronidase do epitélio do ferrão de *P. motoro* do Rio Crixás-Açu, Goiás. A presença de vários componentes no muco, juntamente com o veneno, poderia aumentar a gravidade dos ferimentos causados por arraias de água doce. Além disso, os estudos fornecem informações fundamentais para o diagnóstico clínico e o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de acidente por arraias. (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

6. Acidentes por arraias: mecanismos de intoxicação e manifestações clínicas

As arraias de água doce são animais de hábito bentônico, costumando ficar escondidas sob a areia, no fundo dos rios (Figura 8). São criaturas dóceis e não costumam atacar os humanos (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). No entanto, se são acidentalmente pisadas ou têm suas nadadeiras tocadas, a arraia gira o corpo em comportamento defensivo,

movimentando a cauda rapidamente e, assim, introduzindo, o ferrão na vítima, causando um ferimento ou laceração irregular, (MAGALHÃES et al., 2006).

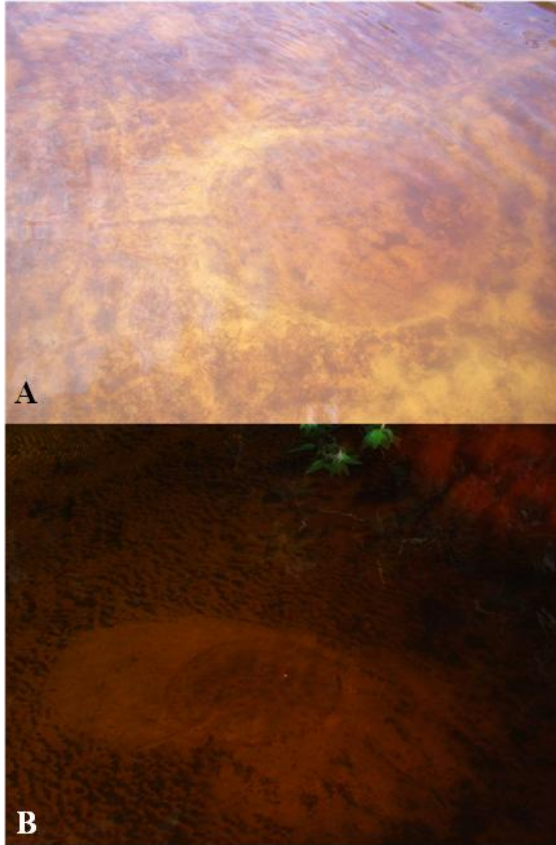


Figura 8. A –Marcas deixadas (“cama de arraia”) na areia por uma arraia durante o forrageamento noturno. B – Arraia *Paratrygon aiereba* focada com uma lanterna durante a noite. Ao se enterrar na areia, as arraias ficam camufladas, causando os acidentes. Fotos: Wallace Duncan.

As regiões anatômicas mais afetadas são os pés e os calcanhares, no caso dos banhistas, e as mãos, no caso dos pescadores (BRISSET et al., 2006; LIM; KUMARASINGHE, 2007), que se acidentam ao manipular o animal (Figura 9). Os acidentes se caracterizam por sua intensa ação inflamatória (ANTONIAZZI et al., 2011). A vítima se queixa de dor intensa, desproporcional ao tamanho da lesão (PARDAL; GADELHA, 2010). Em torno da ferida aparecem eritema e edema, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Em seguida, surge uma necrose central, causando, na área afetada, flacidez do tecido e formação de uma

úlceras profundas, que evoluem lentamente, comum neste tipo de envenenamento (COOK et al., 2006; CLARK et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008). Os pacientes também podem apresentar complicações sistêmicas, como náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular e convulsões (HADDAD JR. et al., 2004; FORRESTER, 2005). Lesões letais raramente ocorrem, exceto em casos onde o ferrão atinge órgãos vitais (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). É muito provável que o delicado tegumento que envolve o ferrão seja dilacerado durante sua penetração na pele da vítima, liberando, assim, o veneno. Como um fator agravante, o ferrão pode quebrar e provocar a retenção de fragmentos de dentina na ferida (HADDAD JR. et al., 2004).



Figura 9. Ferimento na mão de um pescador durante a manipulação de uma arraia. A dor causada pelo veneno das arraias de água doce costuma ser desproporcional ao tamanho do ferimento. Mesma uma pequena lesão como esta causa uma dor insuportável. Foto: Wallace Duncan.

Além do veneno, o ferrão causa uma laceração que, frequentemente, leva à infecção secundária, frequentemente causadas por *Pseudomonas* spp., e *Staphylococcus* spp., (HADDAD JR., 2008) e necrose (Figura 10), especialmente em locais de clima quente e úmido, como a floresta Amazônica, onde os acidentes com arraias são relativamente comuns, principalmente com a população ribeirinha (PIERINI et al., 1996).



Figura 10. A – Lesão com necrose e infecção causada por ferroadada de uma arraia de água doce da região Amazônica. B – Lesão após tratamento com antibióticos, ainda não cicatrizada. Vale ressaltar que as lesões causadas por arraias demoram a cicatrizar. Fotos cedidas gentilmente por Daniela Maia.

Recentemente, DOMINGOS et al. (2011) isolaram Bactérias Gram-negativas do muco de *Potamotrygon motoro* do Alto Rio Paraná, capazes de hemolisar eritrócitos humanos e resistentes a, pelo menos, um antibiótico, o que poderia influenciar na evolução da infecção secundária. Ao analisar as mudanças histopatológicas induzidas pelo veneno de *P. falkneri*, (ANTONIAZZI et al., 2011) mostraram que, seis horas após a injeção, surgem infiltrados inflamatórios, focos de necrose em células epidérmicas basais e, que em 24 horas, já é possível observar necrose da pele, do tecido subcutâneo e do músculo esquelético. Este estudo mostra a capacidade do veneno de uma arraia de água doce de induzir necrose em tão pouco tempo. A gravidade da lesão também se dá pela ação mecânica do ferrão, que, além de

introduzir o veneno, possibilita que bactérias do muco e da água onde o animal vive adentrem no ferimento, podendo causar infecções secundárias (DOMINGOS et al., 2011).

No Brasil, até o momento, não há relatos de morte em consequência de acidentes com arraias de água doce. Mas, na literatura internacional, existem relatos de casos (envolvendo espécies marinhas) com perfurações abdominais (CROSS, 1976), e morte, em decorrência de perfurações cardíacas (FENNER et al., 1989; WEISS; WOLFENDEN, 2001), perfurações torácicas e até mesmo tétano (RATHJEN; HALSTEAD, 1969; MEYER, 1997). O caso de maior repercussão mundial até hoje foi o acidente ocorrido com o famoso apresentador e biólogo Steve Irwin, conhecido como “caçador de crocodilos”, que morreu em consequência de uma lesão no tórax causada por uma arraia marinha durante o seu trabalho (RODRÍGUEZ et al., 2008).

Problemas adicionais para a questão dos ferimentos causados por arraias de água doce são os aquaristas, responsáveis pela importação maciça dessas espécies para a Europa, Japão e Estados Unidos. A falta de informações sobre os riscos de como manter estes animais em um aquário pode resultar em lesões, às vezes com consequências graves (SCHIERA et al., 2002). Já existem relatos de casos na Bélgica (VAN OFFEL; STEVENS, 2000) e na Alemanha (MEBS, 1980).

HADDAD JR. (2003) comenta que os acidentes merecem maior atenção das autoridades, uma vez que a vítima fica incapacitada e se afasta do trabalho por semanas ou mesmo meses, além de poder ficar com sequelas. Os acidentes também são importantes pelo fato de não existir um tratamento específico e de muitos profissionais de saúde não receberem treinamento adequado para cuidar das vítimas (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009).

7. Estudos com veneno de arraia

O primeiro estudo sobre as propriedades bioquímicas e farmacológicas de veneno de arraia, realizado por RUSSELL; HARREVELD (1954), demonstrou os efeitos cardiovasculares causados pelo veneno da espécie marinha *Urobatis helleri*. RUSSELL (1953) mostrou a presença de polipeptídeos de alto peso molecular, serotonina e a atividade enzimática da fosfodiesterase e 5'-nucleotidase no veneno. Ainda, em relação às espécies marinhas, LALWANI (1995) afirma que o veneno pode causar espasmo das artérias coronárias, dor torácica e alterações na atividade elétrica do coração.

BARBARO et al. (2007), comparando os extratos de tecido e muco da pele da arraia marinha *Dasyatis guttata* e da arraia de água doce *Potamotrygon falkneri*, observou atividade edematogênica, gelatinolítica, caseinolítica e fibrinogenolítica para ambos os extratos, porém, somente o extrato de *P. falkneri* apresentou atividade da hialuronidase, necrose, atividade miotóxica e letalidade, além de ter maior nociceptividade que o extrato de *D. guttata*. RODRIGUES (1972) mostrou que o veneno de *P. motoro* (do Rio Araguaia) possui um princípio ativo com atividade colinérgica em íleo de cobaias e atividade hipotensora quando administrado por via intravenosa, em ratos. Em um estudo comparativo, MAGALHÃES et al. (2006) mostraram que os extratos de muco dos ferrões de *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi*, foram capazes de induzir dor, edema e necrose em camundongos. MONTEIRO-DOS-SANTOS et al. (2011) também mostraram que os extratos de muco de ferrão e dorso de *Potamotrygon cf. henlei* também foram capazes de induzir dor e edema, além de possuírem atividade proteolítica. Este estudo também mostrou que ambos os extratos induziram o influxo de infiltrados inflamatórios quando testados em modelo murino. HADDAD JR. et al. (2004)

mostrou que o veneno de *P. falkneri* tem atividade caseinolítica, gelatinolítica e da hialuronidase.

Ainda existem poucos estudos sobre as atividades biológicas dos venenos de arraias de água doce. A falta de dados é principalmente devido à dificuldade de se extrair o veneno, pois a captura destes animais é perigosa e muito difícil. Além disso, a quantidade de veneno que se consegue extrair é mínima, e o veneno é termolábil, o que dificulta o seu transporte e conservação (HADDAD JR. et al., 2004).

8. Epidemiologia

No Brasil, ainda existem poucos estudos epidemiológicos sobre os acidentes causados por arraias de água doce (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). Existem registros de acidentes nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Araguaia (HADDAD JR., 2003), porém, são mais comuns na floresta Amazônica (CHARVET-ALMEIDA et al., 2002), onde constituem um importante problema de saúde pública, embora não recebam a mesma atenção dispensada para os casos de ofidismo e acidentes envolvendo artrópodes peçonhentos (SÁ-OLIVEIRA et al., 2011). PIERINI et al. (1996) afirmam que, no Acre, Região do Juruá, os acidentes são frequentes entre índios e seringueiros.

SÁ-OLIVEIRA et al. (2011) ao investigar 22 vítimas de acidentes por arraias em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental do Rio Curiaú, Macapá, Estado do Amapá, em 2009, mostrou que a maioria das vítimas tinha mais de 15 anos, era do sexo masculino e foi atingida nos membros inferiores (86%). Nenhuma das vítimas soube identificar as espécies de arraias que causaram os acidentes. A maioria dos acidentes ocorreu no período da tarde, durante o verão. Os principais sintomas clínicos relatados foram dor intensa no local da lesão, febre, cicatrizes e houve até mesmo um caso de amputação.

Outros estudos epidemiológicos sobre acidentes com arraias de água doce ocorridos no Pará (PARDAL et al., 1992; PARDAL et al., 1993) e nos rios Paraná, Paraguai, Araguaia e Tocantins (HADDAD JR. et al., 2004) também relatam características semelhantes: a maioria dos acidentes ocorreu à tarde, no verão, e a maioria das vítimas era de adultos do sexo masculino que estavam praticando atividades à beira da praia. As vítimas reportaram dor intensa e o local da ferida apresentou, inicialmente, edema e eritema, seguido de necrose isquêmica. Nos últimos 20 anos, a ocorrência de espécies de arraias na região do Alto Rio Paraná (divisa entre Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná) e na foz do Rio Tietê (São Paulo), despertou o interesse de médicos e pesquisadores (HADDAD JR., 2005; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2007; GARRONE NETO et al., 2007), pois estes locais não eram colonizados por arraias antes e, atualmente, já existem registros de acidentes nestas regiões.

9. Tratamento

Em relação ao tratamento destinado às vítimas de acidente por arraias, GARRONE NETO; HADDAD JR. (2009) ponderam que, embora seja possível obter o controle do quadro com medidas clínicas, a inativação das toxinas é a forma ideal de neutralizar os sintomas dos acidentes. Não há um antiveneno específico para o tratamento das lesões e a abordagem terapêutica é baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios, água morna para aliviar a dor intensa e uso de antibióticos para prevenir infecção secundária (HADDAD JR. et al., 2004; BARBARO et al., 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010).

Nos acidentes por arraia, recomenda-se que, inicialmente, o ferimento seja lavado em água corrente ou solução salina, a fim de remover a maior quantidade possível de toxina. Em seguida, pode-se imergir o membro ferido em água

morna (aproximadamente 45°C). Com isso, espera-se que haja um alívio da dor entre 30 e 90 minutos, pois se acredita que a toxina das arraias seja termolábil. Pode-se utilizar lidocaína a 2% (sem adrenalina) para a exploração cirúrgica do ferimento, visando-se retirar restos de tecido e possíveis fragmentos do ferrão, visíveis em exame de raios-X. A adrenalina não é recomendada por causar vasoconstrição cutânea, o que prejudicaria a resposta do organismo ao veneno e aumentaria ainda mais o risco de necrose. Se necessário, realiza-se uma sutura, deixando-se um dreno no local da lesão. Antibióticos de amplo espectro são usados em casos de pacientes com lesões profundas e muito necrosadas (por exemplo, 100 mg de doxiciclina por dia ou 500 mg de ciprofloxacina duas vezes ao dia, ou conforme determinado por culturas bacterianas do ferimento). É recomendado também que a vítima receba imunização antitetânica. Pacientes com perfurações abdominais ou torácicas devem receber atendimento médico imediatamente, pois há risco de morte nestes casos (FENNER et al., 1989; WEISS; WOLFENDEN, 2001; SCHARF, 2002; PARDAL, 2009)

O fato de não haver terapia específica e eficaz para os acidentes com arraias induz a população ribeirinha da Região Amazônica a buscar terapias alternativas para minimização do quadro clínico derivado do acidente, como uso de urina, ervas, óleos fitoterápicos (SÁ-OLIVEIRA et al., 2011), sebo-de-holanda, borra de café, e, nos casos mais bizarros, diesel ou querosene. Estes tratamentos não são recomendados, pois podem agravar o quadro clínico.

10. Considerações finais

Acidentes por arraias são geralmente subnotificados nos programas de epidemiologia das Unidades Municipais de Saúde do país como se esses animais não fossem peçonhentos. (SÁ-OLIVEIRA et al., 2011). Como em outros lugares do

Brasil, os acidentes são temidos pela população, pois estão geralmente associados a casos de incapacidade física temporária ou permanente. A documentação detalhada desses acidentes é rara, pois, na maioria das vezes, ocorrem em lugares distantes e isolados, como na floresta Amazônica, contribuindo para a falta de conhecimento sobre o assunto (HADDAD JR. et al., 2004).

Devido ao pequeno número reportado de casos, não existe uma justificativa estatística para a produção de um antiveneno específico. Daí a importância dos estudos epidemiológicos, da notificação dos casos e da divulgação de medidas profiláticas e de programas educativos junto às populações de risco que possam prevenir e reduzir o número de acidentes por arraias no Brasil (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). Além disso, as autoridades de Saúde Pública devem adotar medidas que estimulem a qualificação adequada aos profissionais de saúde para o atendimento e tratamento de acidentados por arraias e estudos que viabilizem a produção de imunobiológicos que neutralizem os venenos das arraias existentes no país (SÁ-OLIVEIRA et al., 2011).

Até o momento, existem poucos dados publicados sobre os efeitos e as propriedades biológicas dos venenos das arraias da família Potamotrygonidae encontradas na Bacia Amazônica, apesar dos benefícios farmacêuticos que podem ser gerados a partir da pesquisa com venenos dessas espécies (SMITH; WHEELER, 2006).

Agradecimentos

À FAPEAM pela concessão de Bolsa do Programa de Apoio à Pós-Graduação *Stricto Sensu* – POSGRAD, Resolução nº. 014/2010, à Juliana Luiza Varjão Lameiras.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade (No. 302615/2010-5) à Maria Cristina dos Santos.

Divulgação

Este artigo é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação do artigo por meio eletrônico.

Referências bibliográficas

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. **Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish**. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 2, n. 0, p. 249-279, 1992.

ALMEIDA, M. P.; BARTHEM, R. B.; VIANA, A. S.; CHARVET-ALMEIDA, P. **Diversidade de raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no estuário amazônico**. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 41, n. 2, p. 82-89, 2008.

ALMEIDA, M. P.; BARTHEM, R. B.; VIANA, A. S.; CHARVET-ALMEIDA, P. **Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó island, mouth of the Amazon River**. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences (PANAMJAS)*, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.

ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. **The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America**. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 7, n. 9, 2011.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. **Zootherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, n. 3, p. 541-555, 2007.

ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L. A.; LIRA, M. S.; JARED, S. G.; NETO, D.

- G.; JARED, C.; BARBARO, K. C. **Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays.** *Toxicon*, v. 57, n. 2, p. 297-303, 2011.
- ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. **Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges.** Information document AC, v. 20, p. 1-6, 2004.
- AUERBACH, P. S. **Marine Envenomations.** *New England Journal of Medicine*, v. 325, n. 7, p. 486-493, 1991.
- BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; MALTA, M. B.; SOARES, S. L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J. L.; SANTORO, M. L.; HADDAD JR., V. **Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays.** *Toxicon*, v. 50, n. 5, p. 676-87, 2007.
- BRISSET, I. B.; SCHAPER, A.; POMMIER, P.; DE HARO, L. **Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe.** *Toxicon*, v. 47, n. 1, p. 32-4, 2006.
- CAMPBELL, J.; GRENON, M.; YOU, C. K. **Psuedoaneurysm of the superficial femoral artery resulting from stingray envenomation.** *Annals of Vascular Surgery*, v. 17, n. 2, p. 217-220, 2003.
- CARRIER, J. C.; PRATT, H. L.; CASTRO, J. I. **Reproductive biology of elasmobranchs.** In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Biology of sharks and their relatives.* Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 10, p.269-286.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R. **Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** *Zootaxa*, v. 48, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. **Family potamotrygonidae.** In: REIS, R. E.; FERARIS JR., C. J.; KULLANDER, S. O. (Ed.). *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA).* 1^a Ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.22-29.
- CARVALHO, M. R.; MAISEY, J. G.; GRANDE, L. **Freshwater stingrays of the green river formation of wyoming (early eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes, Myliobatiformes).** *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p. 1-136, 2004/06/01 2004.
- CARVALHO, M. R.; PEREZ, M. H. S.; LOVEJOY, N. R. ***Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** *Zootaxa*, n. 2827, p. 1-30, 2011.
- CARVALHO, M. R.; RAGNO, M. P. **An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, v. 51, p. 101-138, 2011.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P. **Reproductive aspects of freshwater stingrays**

- (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165–171, 2005.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCÓN, G. **Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status.** *Shark News*, v. 14, p. 1-20, March 2002.
- CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. **The pharmacological activity of fish venoms.** *Toxicon*, v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.
- CLARK, R. F.; GIRARD, R. H.; RAO, D.; LY, B. T.; DAVIS, D. P. **Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases.** *The Journal of Emergency Medicine*, v. 33, n. 1, p. 33-37, 2007.
- CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; HIRUMALIMA, C. A.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; LOPES-FERREIRA, M. **Orpotrin: A novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*.** *Peptides*, v. 27, n. 12, p. 3039-3046, 2006.
- CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; ISMAEL SILVA JR., P.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. ***Potamotrygon cf. henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein.** *Toxicon*, v. 60, n. 5, p. 821-829, 2012.
- CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. **Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* freshwater stingray venom.** *Peptides*, v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.
- COOK, M. D.; MATTEUCCI, M. J.; LALL, R.; LY, B. T. **Stingray envenomation.** *The Journal of Emergency Medicine*, v. 30, n. 3, p. 345-347, 2006.
- CROSS, T. B. **An unusual stingray injury - the skindiver at risk.** *Medical Journal of Australia*, v. 2, n. 25-26, p. 947-948, 1976.
- DEHGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. **Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea.** *Toxicon*, v. 55, n. 6, p. 1188-94, Jun 1 2010.
- DEHGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; RAJAIAN, H.; SAJEDIANFARD, J.; PARTO, P. **Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom.** *Toxicon*, v. 54, n. 6, p. 881-886, 2009.
- DEYNAT, P. ***Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae).** *Comptes Rendus Biologies*, v. 329, n. 7, p. 483-493, 2006.
- DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M. P.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J. L.; BARBARO, K. C. **The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing.** *Toxicon*, v. 58, n. 2, p. 147-153, 2011.
- DUNCAN, W. L. P.; FERNANDES, M. N. **Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae).** *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 5, n. 3, p. 454-464, 2010.

- DUNCAN, W. L. P.; INOMATA, S. O.; FERNADES, M. N. **Comércio de arraias de água doce na região do Médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil.** Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010.
- ERICSSON, C. D.; HATZ, C.; JUNGHANSS, T.; BODIO, M. **Medically Important Venomous Animals: Biology, Prevention, First Aid, and Clinical Management.** Clinical Infectious Diseases, v. 43, n. 10, p. 1309-1317, November 15, 2006 2006.
- EVANS, R. J.; DAVIES, R. S. **Stingray injury.** Journal of Accident & Emergency Medicine, v. 13, n. 3, p. 224-225, 1996.
- FENNER, P. J.; WILLIAMSON, J. A.; SKINNER, R. A. **Fatal and non-fatal stingray envenomation.** Medical journal of Australia, v. 151, n. 11-12, p. 621-625, 1989.
- FORRESTER, M. B. **Pattern of stingray injuries reported to Texas poison centers from 1998 to 2004.** Human & Experimental Toxicology, v. 24, n. 12, p. 639-642, December 1, 2005 2005.
- FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília: Ministério da Saúde: 81-85 p. 2001.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. **Ocorrência de arraias fluviais (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do baixo Paranapanema, Sudeste do Brasil.** Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia, n. 88, p. 10-11, 2007.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. **Acidentes por raias.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2^a Ed. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2009. cap. 30, p.295-313.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. **Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n. 1, p. 82-88, 2010.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V.; VILELA, M. J. A.; UIEDA, V. S. **Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia.** Biota Neotropica, v. 7, p. 0-0, 2007.
- GERST, J. W.; THORSON, T. B. **Effects of saline acclimation on plasma electrolytes, urea excretion, and hepatic urea biosynthesis in a freshwater stingray, *Potamotrygon* sp. Garman, 1877.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 56, n. 1, p. 87-93, 1977.
- HADDAD JR., V. **Animais aquáticos de importância médica no Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, p. 591-597, 2003.
- HADDAD JR., V. **Ocorrência de arraias da família Potamotrygonidae no rio Paraná e relato da presença no rio Tietê: resultados preliminares.** Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia, n. 78, p. 3, 2005.
- HADDAD JR., V. **Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico.** 2^a Ed. São Paulo: 2008.
- HADDAD JR., V.; GARRONE NETO, D.; PAULA NETO, J. B.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. **Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some**

- enzymatic activities of the venom.** *Toxicon*, v. 43, n. 3, p. 287-94, Mar 1 2004.
- HALSTEAD, B. W. **Venomous marine animals of Brazil.** *Memórias do Instituto Butantan*, v. 33, p. 1-25, 1966.
- HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world.** 2nd Rev Sub Edition. Princeton, New Jersey: The Darwin Press, 1988. 1168
- KLESZIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. **Flavobacterium columnare chemotaxis to channel catfish mucus.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 288, n. 2, p. 216-220, 2008.
- KOZLOV, S. A.; VASSILEVSKI, A. A.; FEOFANOV, A. V.; SUROVOY, A. Y.; KARPUNIN, D. V.; GRISHIN, E. V. **Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 30, p. 20983-20992, July 28, 2006 2006.
- LALWANI, K. **Animal toxins: Scorpaenidae and stingrays.** *British Journal of Anaesthesia*, v. 75, n. 2, p. 247, 1995.
- LIM, Y. L.; KUMARASINGHE, S. P. **Cutaneous injuries from marine animals.** *Singapore Medical Journal*, v. 48, n. 1, p. e25, 2007.
- LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DASILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. **Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom.** *Toxicon*, v. 38, n. 8, p. 1149-1156, 2000.
- LOVEJOY, N. R. **Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes).** *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 117, n. 3, p. 207-257, 1996.
- LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. **Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes.** *Journal of South American Earth Sciences*, v. 21, n. 1-2, p. 5-13, 2006.
- LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. **Marine incursion into South America.** *nature*, v. 396, n. 6710, p. 421-422, 1998.
- 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*, v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006.
- MAGALHÃES, M. R.; DA SILVA JR, N. J.; ULHOA, C. J. **A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization.** *Toxicon*, v. 51, n. 6, p. 1060-1067, 2008.
- MCEACHRAN, J. D.; ASCHLIMAN, N. **Phylogeny of Batoidea.** In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Biology of sharks and their relatives.* 2nd editon. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 3, p.79-113.
- MEBS, D. **Stechrochen-Vergiftungen Sting-ray injuries.** *Dtsch Med Wochenschr*, v. 105, n. 37, p. 1289-1291, 1980.
- MEYER, P. K. **Stingray injuries.** *Wilderness & Environmental Medicine*, v. 8, n. 1, p. 24-28, 1997.

- MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; ISMAEL SILVA JR, P.; SOARES, A. B.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. **Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei***. International Immunopharmacology, v. 11, n. 9, p. 1368-1377, 2011.
- MORO, G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R. S. **Aspectos da alimentação da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da bacia do rio Parnaíba, Nordeste do Brasil.** Revista Nordestina de Biologia, v. 20, n. 2, p. 47-57, 2012a.
- MORO, G.; CHARVET-ALMEIDA, 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, v. 72, n. 4, p. 885-891, 2012b.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World.** 4th Edition. New Jersey, USA: 2006. 601
- NG, H. H.; TAN, H. H.; YEO, D. C. J.; NG, P. K. L. **Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore.** Biological Invasions, v. 12, n. 8, p. 2385-2388, 2010/08/01 2010.
- PARDAL, P. P. O. **Ictismo por arraia.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. D. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. A.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2^a. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 47, p.523-529.
- PARDAL, P. P. O.; CARVALHO, L. O. S.; GOMES, F. P.; PEDROSA, G. J. **Estudo de 246 acidentes por peixes entre os habitantes do município de Peixe-boi, Pará, Brasil.** Pará Médico, v. 2, p. 6-10, 1993.
- PARDAL, P. P. O.; GADELHA, M. A. C. **Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas.** 2^a Edição. Belém, Pará: 2010. 48
- PARDAL, P. P. O.; LOBO, M. H. L.; MENDES, C. W. C.; VIEIRA, V. F. **Ictismo entre os pescadores de Icoaraci, Pará.** Resumos do XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1992. Belém, Pará. p.117.
- PEDROSO, C. M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M. S.; HADDAD, V., JR.; BARBARO, K. C.; ANTONIAZZI, M. M. **Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays.** Toxicon, v. 50, n. 5, p. 688-97, Oct 2007.
- PIERINI, S. V.; WARRELL, D. A.; DE PAULO, A.; THEAKSTON, R. D. G. **High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and amazonian indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil.** Toxicon, v. 34, n. 2, p. 225-236, 1996.
- RATHJEN, W. F.; HALSTEAD, B. W. **Report on two fatalities due to stingrays.** Toxicon, v. 6, n. 4, p. 301-302, 1969.
- RODRIGUES, R. J. **Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*).** Transactions of the New York Academy of Sciences, v. 34, n. 8, p. 677, 1972.
- RODRÍGUEZ, H. G. R.; SÁNCHEZ, E. C.; MÉNDEZ, J. D. **Stingray poisoning, a careless aspect in México.** Advances in Environmental Biology, v. 2, n. 2, p. 54-62, 2008.

- ROSA, R. S. *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 7, p. 425-437, 1990.
- ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R.; WANDERLEY, C. A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 1-8, 2008.
- ROSA, R. S.; CASTELLO, H. P.; THORSON, T. B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, p. 447-458, 1987.
- ROSA, R. S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C. C. D. **Biology of the South American Potamotrygonid stingrays.** In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptative physiology and conservation.* 1st Edition. United States: CRC Press, 2010. cap. 5, p.241-286.
- RUSSELL, F. E. **Stingray injuries: a review and discussion of their treatment.** *The American journal of the medical sciences*, v. 226, n. 6, p. 611, 1953.
- RUSSELL, F. E. **Venom Poisoning.** *Rational drug therapy*, v. 5, n. 8, p. 1-7, August 1971.
- RUSSELL, F. E.; HARREVELD, V. A. **Cardiovascular effects of the venom of the round stingray, *Urobatis halleri*.** *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, v. 62, n. 3, p. 322, 1954.
- SÁ-OLIVEIRA, J. C.; COSTA, E. A.; PENA, F. P. S. **Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP.** *Biota Amazônia*, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2011.
- SANTOS, E. **Nossos peixes marinhos: vida e costume dos peixes do Brasil.** 1ª Ed. Rio de Janeiro: 1952.
- SCHARF, M. J. **Cutaneous injuries and envenomations from fish, sharks and rays.** *Dermatologic Therapy*, v. 15, n. 1, p. 47-57, 2002.
- SCHIERA, A.; BATTIFOGLIO, M. L.; SCARABELLI, G.; CRIPPA, D. **Stingray injury in a domestic aquarium.** *International journal of dermatology*, v. 41, n. 1, p. 50-51, 2002.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J.; TANAKA, S. **Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae).** *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 1, p. 189-196, 2012.
- SILVA, J. P. C. B.; CARVALHO, M. R. **A new species of Neotropical freshwater stingray of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 from the Río Madre de Dios, Peru (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, v. 51, p. 139-154, 2011.
- SIOLI, H. **Studies in Amazonian waters.** In: (Ed.). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica.* Belém: CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, v.3, 1967. p.9-50.
- SIVAN, G.; VENKETASVARAN, K.; RADHAKRISHNAN, C. K. **Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom.** *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 914-925, 2010.
- SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. **Venom evolution widespread in fishes: a**

phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. Journal of Heredity, v. 97, n. 3, p. 206-217, 2006.

THORSON, T. B.; BROOKS, D. R.; MAYES, M. A. **The evolution of freshwater adaptation in stingrays.** National Geographic Society Research Reports, v. 15, p. 663-694, 1983.

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

TREBERG, J. R.; SPEERS-ROESCH, B.; PIERMARINI, P. M.; IP, Y. K.; BALLANTYNE, J. S.; DRIEDZIC, W. R. **The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species.** Journal of Experimental Biology, v. 209, n. 5, p. 860-870, March 1, 2006

UZEL, A. P.; MASSICOT, R.; JEAN, M. **Stingray injury to the ankle.** European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, v. 12, n. 2, p. 115-116, 2002.

VAN OFFEL, J. F.; STEVENS, W. J. **A stingray injury in a devotee of aquarium fishes.** Acta Clinica Belgica, v. 55, n. 3, p. 174-175, 2000.

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

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

WOURMS, J. P.; GROVE, B. D.; LOMBARDI, J. **The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes.** In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). Fish Physiology. San Diego: Academic Press, v.11B, 1988. p.1-134.

ZHAO, X.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. **Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish.** Developmental & Comparative Immunology, v. 32, n. 5, p. 500-508, 2008.

JUSTIFICATIVA

As arraias de água doce são animais de hábito bentônico, costumando ficar escondidas sob a areia, no fundo dos rios. São criaturas dóceis e não costumam atacar os humanos (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). No entanto, se são acidentalmente pisadas ou têm suas nadadeiras tocadas, a arraia gira o corpo em comportamento defensivo, movimentando a cauda rapidamente e, assim, introduzindo, o ferrão na vítima, causando um ferimento ou laceração irregular (MAGALHÃES et al., 2006). Os ferrões são estruturas afiadas, alongadas e mineralizadas, derivados de dentículos dérmicos modificados (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009), retroserrados bilateralmente e cobertos por uma bainha tegumentar com um sulco glandular ventrolateral, contendo glândulas de veneno ao longo de cada borda (HALSTEAD, 1988; DEGHANI et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). As regiões anatômicas mais afetadas são os pés e os calcanhares, no caso dos banhistas, e as mãos, no caso dos pescadores (BRISSET et al., 2006; LIM; KUMARASINGHE, 2007), que se acidentam ao manipular o animal. Os acidentes se caracterizam por sua intensa ação inflamatória (ANTONIAZZI et al., 2011). A vítima se queixa de dor intensa, desproporcional ao tamanho da lesão (PARDAL; GADELHA, 2010). Em torno da ferida aparecem eritema e edema, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Em seguida, surge uma necrose central, causando, na área afetada, flacidez do tecido e formação de uma úlcera profunda, que evolui lentamente, comum neste tipo de envenenamento (COOK et al., 2006; CLARK et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008). Os pacientes também podem apresentar complicações sistêmicas, como náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular e convulsões (HADDAD JR. et al., 2004; FORRESTER, 2005). É muito provável que o delicado tegumento que envolve o ferrão seja dilacerado durante sua penetração na pele da vítima, liberando, assim, o veneno. O ferrão também pode quebrar, provocando retenção de fragmentos de dentina na ferida (HADDAD JR. et al., 2004). Lesões letais raramente ocorrem, exceto em casos onde o ferrão atinge órgãos vitais (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009).

Em adição ao veneno, as arraias produzem um muco espesso, que recobre todo o corpo do animal. O muco, secretado por células mucosas localizadas na epiderme, é considerado a primeira linha de defesa (ZHAO et al., 2008), e, como observado em espécies marinhas, pode conter aminoácidos, peptídeos, carboidratos, glicopeptídeos, glicolipídeos, (KLESZIUS et al., 2008) serotonina, fosfodiesterase, 5'- nucleotidase, agentes vasoconstritores (AUERBACH, 1991; EVANS; DAVIES, 1996; WEISS; WOLFENDEN, 2001) componentes

imunes, como lisozimas, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento, lectinas, proteína C-reativa, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos (ALEXANDER; INGRAM, 1992).

Estudos mostram que o muco da arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* possui peptídeos antimicrobianos contra as bactérias *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, e contra os fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2012). Tais pesquisas ressaltam a importância do muco das arraias na imunidade inata. Peptídeos, como orpotrina e porflan, também foram isolados do epitélio do ferrão de *Potamotrygon gr. orbignyi* e foram capazes de induzir vasoconstrição e inflamação, respectivamente (CONCEIÇÃO et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2009). MAGALHÃES et al. (2008), isolaram e caracterizaram uma hialuronidase do epitélio do ferrão de *Potamotrygon motoro* do Rio Crixás-Açu, Goiás. Os autores concluem que a presença de vários componentes no muco, juntamente com o veneno, poderia aumentar a gravidade dos ferimentos causados por arraias de água doce.

Ao analisar as mudanças histopatológicas induzidas pelo veneno de *Potamotrygon falkneri*, ANTONIAZZI et al. (2011) mostraram que, seis horas após a injeção, surgem infiltrados inflamatórios, focos de necrose em células epidérmicas basais e, que em 24 horas, já é possível observar necrose da pele, do tecido subcutâneo e do músculo esquelético. Este estudo mostra a capacidade do veneno de uma arraia de água doce de induzir necrose em tão pouco tempo. Outros estudos também apontam a capacidade dos extratos dos ferrões de *Potamotrygon scobina*, *P. orbignyi* e *Potamotrygon cf. henlei* em induzir dor, edema e necrose em camundongos (MAGALHÃES et al., 2006; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). Atividade proteolítica já foi detectada nos extratos dos ferrões de *P. falkneri* e *Potamotrygon cf. henlei* (HADDAD JR. et al., 2004; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

A gravidade da lesão também se dá pela ação mecânica do ferrão, que, além de introduzir o veneno, possibilita que bactérias do muco e da água onde o animal vive adentrem no ferimento, podendo gerar infecções secundárias, causadas geralmente por bactérias como *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.*, (HADDAD JR., 2008), especialmente em locais de clima quente e úmido como a floresta Amazônica, onde os acidentes com arraias são relativamente comuns entre a população ribeirinha (PIERINI et al., 1996). Recentemente, DOMINGOS et al. (2011) isolaram bactérias Gram-negativas do muco de *P. motoro* do Alto Rio Paraná, capazes de hemolisar eritrócitos humanos e resistentes a, pelo menos, um antibiótico, o que poderia influenciar na evolução da infecção secundária.

Em um estudo histológico dos ferrões das arraias de água doce *Potamotrygon leopoldi*, *P.falkneri*, *P.orbigny* e das arraias marinhas *Dasyatis guttata* e *Aetobatus narinari*, PEDROSO et al. (2007) mostraram que no ferrão das espécies de água doce existe um maior número de células secretoras de proteína, de dois tipos diferentes, distribuídos por toda a epiderme, enquanto nas espécies marinhas, estas células secretoras estão apenas ao redor ou dentro dos sulcos ventrolaterais do ferrão. Segundo os autores, estas diferenças poderiam influenciar nos envenenamentos por arraias de água doce, que são, geralmente, mais graves e apresentam maior porcentagem de necrose que os acidentes causados por arraias marinhas. BARBARO et al. (2007) compararam os extratos de tecido do ferrão das arraias *D. guttata* e *P. falkneri*, e constataram que ambos os extratos induziram edema e apresentaram atividades proteolíticas, mas, somente o extrato de *P. falkneri* apresentou miotoxicidade, letalidade, hialuronidase, além de induzir necrose e ter maior nociceptividade que o extrato de *D. guttata*.

Em relação aos acidentes causados por arraias de água doce, não há antiveneno específico para o tratamento das lesões e a abordagem terapêutica é baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios, água morna para aliviar a dor intensa e uso de antibióticos para prevenir infecção secundária (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). Os acidentes merecem maior atenção das autoridades, uma vez que a vítima fica incapacitada e se afasta do trabalho por semanas ou meses, além de poder ficar com sequelas (HADDAD JR., 2003).

Além disso, até o momento, existem poucos dados publicados sobre os efeitos e as propriedades biológicas dos venenos das arraias da família Potamotrygonidae encontradas na Bacia Amazônica. Será que existem diferenças entre a composição química dos venenos das arraias de água doce da nossa região? Será que uma espécie pode possuir um veneno mais potente que a outra? Para tentar responder a estas perguntas, foram analisados os perfis proteicos, as atividades enzimáticas e a miotoxicidade induzidos pelos venenos das arraias amazônicas *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro*.

OBJETIVOS

Geral:

Analisar os perfis proteicos, as atividades enzimáticas e a miotoxicidade induzidas pelos extratos obtidos dos ferrões e dos dorsos das arraias *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) da Bacia Amazônica.

Específicos:

- Analisar o perfil eletroforético das proteínas presentes nos venenos pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE);
- Detectar a presença de enzimas com atividade gelatinolítica pelo método de zimografia;
- Quantificar e avaliar a atividade fosfolipásica indireta induzida pelos venenos *P. iwamae* e *P. motoro*;
- Verificar se os venenos das arraias *P. iwamae* e *P. motoro* induzem miotoxicidade local e sistêmica em camundongos BALB/c, pela análise histopatológica dos músculos gastrocnêmios.
- Utilizar o método estereológico para quantificar a porcentagem de dano muscular causado pelos venenos em camundongos BALB/c.

METODOLOGIA

Obtenção e preparo dos venenos

Espécimes de *Plesiotrygon iwamae* (n=4) e *Potamotrygon motoro* (n=1) foram capturados no Lago do Janauacá, município de Manaquiri, a cerca de 60 km a sudoeste da cidade de Manaus, na margem direita do Rio Solimões (S03°51'/W55°59'). O ferrão e do dorso das arraias foram raspados com auxílio de bisturi e o material coletado foi armazenado em nitrogênio líquido durante o transporte até Manaus, para o Laboratório de Imunologia, localizado na Universidade Federal do Amazonas. As amostras foram misturadas a tampão fosfato-salina p.H. 7.4, (8g de cloreto de sódio, 0,2g de cloreto de potássio, 1,4g de fosfato de sódio dibásico, 0,24g de fosfato de potássio monobásico e 100ml de água destilada), na proporção de 1:1 e centrifugadas a 6000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore® 0,45 µm, e, em seguida, estocado em freezer -20°C até o uso. A concentração de proteínas presentes nas amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), usando BSA (albumina de soro bovino) como padrão.

Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A análise das proteínas presentes nos extratos de muco e tecido do dorso e do ferrão das arraias foi feita pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme protocolo adaptado de LAEMMLI (1970), com o gel de corrida na concentração de 15% (4,17 ml de acrilamida 36%, 3 ml de Tris-HCl pH 8.8, 30 µl de Temed, 300 µl de persulfato de amônio e 2,5 ml de água destilada) e o gel do pente a 5% (1,04 ml de acrilamida 36%, 940 µl de Tris-HCl pH 8.8, 15 µl de Temed, 150 µl de persulfato de amônio e 5,36 ml de água destilada). Foram usados 30 µg de proteína, na proporção de 1:1 (v/v) com tampão de amostra sob condições não-redutoras e redutoras (na presença de 2-mercaptoetanol). Como marcadores de peso molecular foram usados miosina (192 kDa), β-galactosidase (102,1 kDa), albumina de soro bovino (58,1 kDa), ovalbumina (41 kDa), anidrase carbônica (27,9 kDa), inibidor tripsina de soja (20,4 kDa), lisozima (15,1 kDa) e aprotinina (6,4 kDa) (BioRad® Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, USA, Catalog 161-0318), na quantidade de 15 µl. A corrida foi feita com 100V, por, aproximadamente, duas horas. Para a visualização das bandas proteicas, os géis foram

corados, após a corrida, durante 3 horas, com solução contendo 450 ml de álcool etílico P.A, 450 ml de água destilada, 100 ml de ácido acético glacial P.A e Coomassie-Blue R-250 (BioRad®). Para descoloração do gel, foi usada a mesma solução anterior, porém, sem o Coomassie-Blue R-250 (Solução descorante).

Zimografia

O método de Zimografia foi utilizado para verificar a presença de enzimas proteolíticas nos extratos de muco do ferrão e do dorso das arraiais, conforme MONTEIRO-DOS-SANTOS et al. (2011). Para isso, o SDS-PAGE foi preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, com gelatina a 2mg/ml incorporada ao gel. Ao final da corrida, os géis foram lavados com tampão contendo Tris-HCl 50 mM, cloreto de cálcio 5mM, e Triton X-100 2,5%, durante 30 minutos. Após a lavagem, o géis foram colocados em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, cloreto de cálcio 5mM, Triton X-100 2,5% e azida sódica 0,02%) a 37°C, durante 16 horas. Em seguida, o gel foi corado por 120 minutos com a mesma solução corante descrita anteriormente (com Coomassie-Blue) e levemente descorado, por 30 minutos. O surgimento de bandas sem coloração nos géis indicou a presença de atividade gelatinolítica.

Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi mensurada pela atividade hemolítica indireta em gel de agarose, protocolo de GUTIÉRREZ et al. (1988). Uma solução de agarose a 1% (1,5g diluídos em 150 ml de salina) foi preparada, a 100° C, para a total dissolução da agarose. À solução, foram adicionados os demais reagentes, de acordo com a temperatura ideal: 1,5 ml de cloreto de cálcio 0,01M (entre 70 e 75° C); 30 µl de azida sódica 0,005% e 1,8 ml de gema de ovo, diluída na proporção de 1:3 em salina (entre 55 e 60° C); e 1,8 ml de eritrócitos (entre 45 e 50° C), lavados anteriormente três vezes com salina, por cinco minutos, a 4000 rpm. Após o preparo, a solução foi distribuída uniformemente em placas de Petri esterilizadas (aproximadamente 27 ml por placa), de modo a não formar bolhas. Quando a solução polimerizou, adquirindo uma consistência gelatinosa, foram feitos furos de 3 mm de diâmetro/2mm de profundidade, nos quais foram aplicadas alíquotas de 15 µL (70 µg de proteína) e 30 µl (140 µg de proteína) dos extratos do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae* (exemplar nº 3). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C, por 24 e 48 horas. A

medida dos halos hemolíticos foi feita com o auxílio de um paquímetro. As amostras foram analisadas em triplicata. Como controle positivo, foi usado veneno da jararaca Amazônica, *Bothrops atrox* (10 µg) e, para o controle negativo, salina estéril.

Animais do experimento

Para a análise histopatológica dos efeitos dos extratos de muco de dorso e ferrão das arraias, foram usados 21 camundongos BALB/c, fêmeas, pesando entre 18 a 22 g, provenientes do Biotério do Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz/Manaus), alojados com livre acesso à água e alimento, com temperatura controlada em 25° C. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFAM (nº 070/2012) e os procedimentos envolvendo os camundongos foram feitos conforme a legislação nacional e princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratórios (SBCAL) e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Indução da atividade miotóxica local e sistêmica

Foram injetados 400 µg de proteína [(dose mínima capaz de induzir reação inflamatória intensa e necrose, conforme BARBARO et al. (2007)] dos extratos de dorso e ferrão das arraias *P. iwamae* e *P. motoro* no músculo gastrocnêmio direito dos camundongos, que foram sacrificados após 24 horas de experimento, por deslocamento cervical. Os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo de todos os camundongos foram cuidadosamente retirados e fixados em formol tamponado 10% (100 ml de formaldeído 37 a 40%, 900 ml de água destilada, 4 g de fostato de sódio monobásico e 6,5 g fostato de sódio dibásico) por 5 dias, a temperatura ambiente. Os camundongos do grupo controle receberam salina estéril.

Análise histopatológica

Após o período de fixação, o material foi colocado em álcool 70%, até ser processado, conforme as etapas histológicas descritas na Tabela 1. As lâminas foram coradas com H.E (hematoxilina e eosina) e PTAH (hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory), para auxiliar na observação dos danos teciduais causados pelos extratos. Para a coloração de PTAH, cortes histológicos 5 µm foram oxidados com solução aquosa de permanganato de

potássio a 0,25%, durante 5 minutos e lavados, em seguida, com água destilada, para, depois, serem enxaguados em solução aquosa de ácido oxálico a 5%, com o objetivo de retirar a coloração dada ao tecido pelo permanganato de potássio. Após este processo, os cortes histológicos foram deixados em hematoxilina ácida fosfotúngstica (1g de hematoxilina, 20 g de ácido fosfotúngstico e 1000 ml de água destilada, q.s.p.) durante toda a noite, a temperatura ambiente, para, no dia seguinte, serem desidratados conforme a 3ª etapa da Tabela 1. O processo de desidratação e montagem da lâmina deve ser feito cuidadosamente, pois a água destilada e o álcool podem descorar o tecido. Todos os procedimentos adotados para o processamento histológico do material foram adaptados de KIERNAN (2008).

Imunohistoquímica

Para evidenciar a presença de macrófagos, foi feita imunohistoquímica para marcar CD68. As seções histológicas foram desparafinizadas e lavadas em PBS – Tween 20 (0.1M PBS, 0.5% Tween 20, pH 7.4), duas vezes, por dois minutos. Para a recuperação do antígeno, Epitope Retrieval Steamer Set (IHC-Tek™, USA) foi usado. Para reduzir a coloração inespecífica de fundo, foi usado PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) contendo 5% de soro de cabra e peróxido de hidrogênio a 3%, em PBS, por 10 minutos, para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Anticorpo primário monoclonal de rato anticamundongo CD68 (MCA1957; Serotec, USA) foi usado numa diluição de 1:100 e incubado com as seções histológicas, por uma hora, a temperatura ambiente. Para a detecção imunohistoquímica, as seções foram incubadas com anticorpo secundário de cabra antirrato conjugado com HRP (Bio-Rad, USA), por 30 minutos, a temperatura ambiente. Ao final, as seções foram incubadas com DAB Peroxidase Substrate Kit (IHC-Tek™, USA), lavadas em PBS – Tween 20, três vezes, por dois minutos e coradas com hematoxilina para auxiliar na visualização do tecido.

Densidade de volume (volume relativo, V_v) – Esterologia

A densidade de volume (%) dos componentes no tecido muscular foi obtida pelo sistema de contagem de pontos de HOWARD; REED (2010). Para tal, em uma primeira etapa, cada seção foi visualizada em sua totalidade e fotografada em baixo aumento (Leica EZ4D Estereomicroscópio Digital System, 8x). Em seguida, um sistema teste de contagem contendo linhas horizontais e verticais (quadrantes) foi sobreposto às imagens individuais

para a seleção do campo de vista a ser analisado posteriormente (Figura 11). O programa de análise de imagens ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado nesta etapa por meio da técnica de amostragem sistemática uniforme ao acaso, SURS (systematic uniforme random sampling), para a seleção dos campos de vista. Brevemente, o número total de quadrantes contendo tecido muscular foi contado e em seguida esse valor foi dividido pelo número de campos de vista a ser analisado nessa seção histológica. No presente estudo, de 10 a 12 campos/seção foram selecionados para análise. Essa abordagem permite a seleção de campos de vista de forma aleatória, evita a interferência do observador, é eficiente e minimiza o viés nos resultados (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981). Os campos amostrados foram fotografados em maior aumento (objetiva PLAN 20x/0,4; ocular GSWH 10x/22) para posterior análise por meio de um fotomicroscópio Olympus BX-41. Na etapa seguinte, cada imagem (10 a 12 por seção) foi quantificada quanto à porcentagem de: músculo sem dano (Vvms), mionecrose (Vvmmio), regeneração muscular (Vvmrec), perda da estriação (Vvmestria), infiltrados leucocitários (Vvmleuc) e vasos sanguíneos (Vvmv). O programa de análise de imagens (módulo estereologia) IMOD 4.5 (KREMER et al., 1996) foi utilizado nesta etapa. Para tal, um sistema teste de contagem contendo pontos foi sobreposto a cada imagem para permitir a quantificação das estruturas citadas anteriormente (Figura 12). A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (tecido muscular) foi calculado como:

$$Vv(\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Vv é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa) de determinado componente (Vvms, Vvmrabo, Vvmrec, Vvmestria e Vvmleuc e Vvmv), P_{comp} é a somatória de pontos que tocam determinado componente (músculo saudável, rabiomiólise, regeneração pós-dano, perda de estriação, infiltrados leucocitários e vasos sanguíneos), e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (tecido muscular).

Análises estatísticas

Para as análises dos dados, foram usados o programa estatístico SIGMASTAT 3.5 e o programa gráfico SIGMAPLOT 11.0 (Systat Software Inc. Alemanha). Para testar a variância resultante da aplicação da contagem de pontos sobre as seções foi calculado o *CE* (coeficiente de erro) sobre dados morfométricos brutos de acordo com HOWARD; REED (2010).

$$CE = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

Onde: *CE* indica o coeficiente de erro para a determinação da densidade de volume; *k* representa o número de imagens analisadas e *u* e *v* são as somatórias de pontos sobre cada campo de vista. Um $CE \leq 10\%$ foi considerado satisfatório (preciso). Todos os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre o grupo controle (salina) e os grupos injetados com os extratos foram analisadas por meio de ANOVA (análise de variância one-way), seguida do teste de múltiplas comparações de Dunnett. Para a comparação entre as variáveis dependentes (músculo gastrocnêmio esquerdo e direito), foi aplicado um teste *t* pareado. Em todos os cálculos, um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 1. Rotina histológica adotada para o processamento do músculo gastrocnêmio dos camundongos BALB/c:

Etapa	Processo	Tempo
1 ^a etapa: Desidratação do tecido	Álcool 80 %	45 minutos
	Álcool 90 %	45 minutos
	Álcool 96%	45 minutos
	Álcool 100% (duas vezes)	Uma hora
	Xilol (duas vezes)	45 minutos
	Inclusão em parafina (92g) com cera de abelha (8g) – 60°C, duas vezes	45 minutos
	Obtenção do corte histológico com o micrótomo (espessura de 5 µm)	
2 ^a etapa: Coloração (re-hidratação do tecido)	Xilol (duas vezes)	5 minutos
	Álcool 100% (duas vezes)	3 minutos
	Álcool 96%	3 minutos
	Álcool 80%	3 minutos
	Álcool 70%	3 minutos
	Álcool 60%	3 minutos
	Água destilada	3 minutos
Coloração dos cortes com H. E. e PTAH		
3 ^a etapa: Coloração (nova desidratação do tecido)	Água destilada	1 minuto
	Álcool 60%	1 minuto
	Álcool 70%	1 minuto
	Álcool 80%	1 minuto
	Álcool 96%	1 minuto
	Álcool 100% (duas vezes)	3 minutos
	Xilol (duas vezes)	5 minutos
Montagem da lâmina + lamínula (fixação com Entellan [®])		

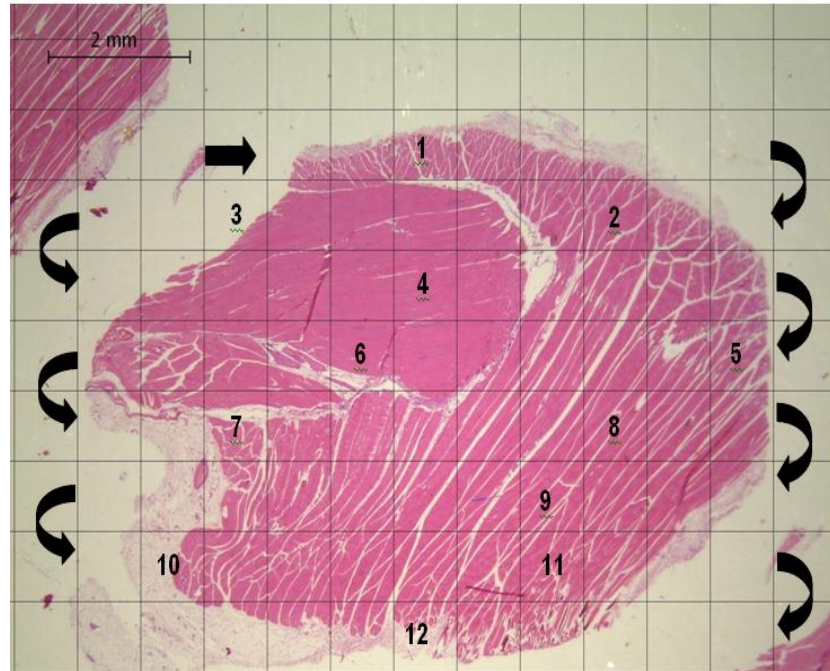


Figura 11. Sistema teste contendo linhas sobrepostas a seção de músculo (aumento $\approx 8x$). A área de cada quadrante é equivalente a $800.000 \mu\text{m}^2$. No exemplo, 74 campos foram reconhecidos na seção e 12 campos foram selecionados ($74/12 \approx 6$). Um número ao acaso foi escolhido entre 1-6 9, nesse caso 3 (equivalente ao campo 1). Os demais seguiram em sequência a esse campo em intervalos de 6 em 6 campos. Observe que a contagem dos campos começa a partir do quadrante superior esquerdo da seção (seta) e continua no sentido esquerda-direita e direita-esquerda a cada linha (setas curvas).

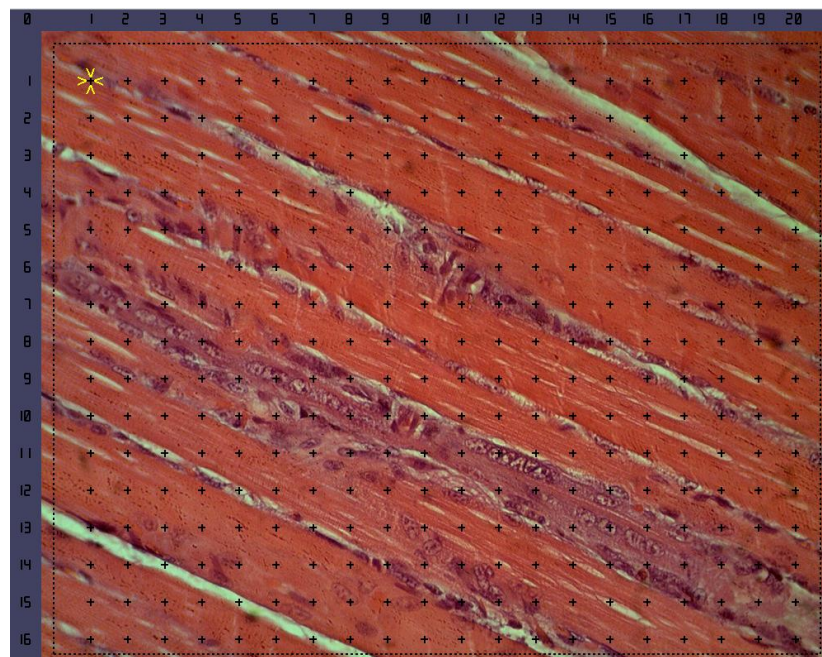


Figura 12. Sistema teste de contagem de pontos sobreposto à imagem do tecido muscular. Cada sistema teste foi composto por 320 pontos no total (aumento 400x).

RESULTADOS– Parte I – Dados não incluídos na publicação

Perfis eletroforéticos e zimografia

As Figuras 13 e 14 expressam os perfis eletroforéticos obtidos dos extratos obtidos do dorso e do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, respectivamente. Os perfis eletroforéticos obtidos a partir dos extratos de muco de dorso e ferrão da espécie *P. motoro* apresentaram diferenças (Figura 13). Enquanto que o extrato do dorso apresentou uma banda forte difusa com cerca de 40 kDa e componentes proteolíticos entre 58 e 41 kDa e outro com 6 kDa, o extrato do ferrão apresentou uma banda difusa de 10 kDa, várias bandas entre 58 e 27 kDa e componentes proteolíticos acima de 58 kDa.

Quanto à espécie *P. iwamae*, os exemplares nº 1 e 2 apresentaram perfil eletroforético semelhantes entre si, mas diferente dos demais exemplares, com cerca de 6 bandas sob condições não-redutoras (uma com 50 kDa) e 10 bandas sob condições redutoras (várias entre 41 e 55 kDa). Porém, as bandas do exemplar nº 2 surgiram com menor intensidade no gel. O exemplar nº 3 apresentou perfis eletroforéticos semelhantes entre os mucos do dorso e do ferrão, com cerca de 6 bandas nas condições não-redutoras e 8 bandas nas condições redutoras. Uma banda com aproximadamente 175 kDa apareceu nos mucos do dorso e do ferrão deste exemplar, sob as duas condições. O exemplar nº 4 apresentou cerca de 5 bandas sob condições redutoras e não-redutoras, com uma acima de 192 kDa (sem redução) e uma com cerca de 160 kDa (com redução). Uma banda de 40 kDa surgiu nos exemplares nº 1 e 2, sob condições redutoras e nos exemplares nº 3 e 4, nas duas condições. Todas as amostras apresentaram uma banda intensa e difusa de 15 kDa e bandas inferiores a 6 kDa, sob redução e não-redução (Figura 14).

Na zimografia, para verificar a atividade proteolítica usando gelatina como substrato, o muco do dorso de *P. motoro* apresentou duas bandas proteolíticas, uma com massa molecular de 10 kDa e uma banda fraca e difusa entre 41 e 58 kDa. Esta banda difusa também foi observada no muco do ferrão, além de outra de massa molecular de aproximadamente 180 kDa. *P. iwamae* apresentou duas bandas proteolíticas, uma de 6 e a outra de 40 kDa, tanto para o extrato de muco do dorso quanto para o ferrão (Figura 13).

As duas espécies estudadas, quando comparadas, apresentaram perfis eletroforéticos e bandas proteolíticas diferentes tanto nos extratos dos ferrões quanto nos dos dorsos (Figuras 13 e 14). As diferenças entre os perfis eletroforéticos dos extratos de muco do dorso dos quatro exemplares da espécie *P. iwamae*, indica uma variação intrapopulacional.

No caso da arraia *P. motoro*, as proteínas expressas no corpo do animal não foram, necessariamente, as mesmas expressas pelo tecido do ferrão, como visto em MONTEIRO-DOS-SANTOS et al. (2011).

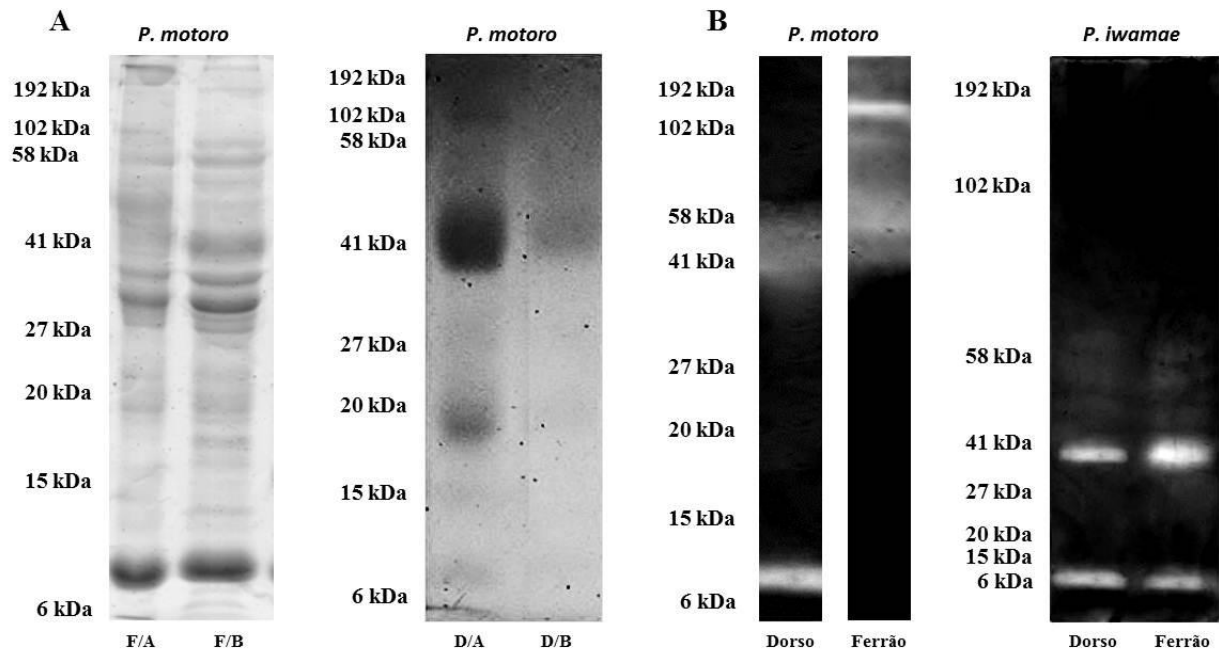


Figura 13. A – Perfis eletroforéticos dos mucos do dorso e do ferrão da arraia *Potamotrygon motoro*. B – Zimografia, confirmando a atividade proteolítica, com gelatina como substrato, dos extratos de muco do ferrão e do dorso das arraias *P. motoro* e *Plesiotrygon iwamae*. As bandas sem coloração no gel de zimografia indicam a atividade gelatinolítica dos venenos. F/SR= ferrão sem-redução. F/C = ferrão com redução. D/SR = dorso sem redução. D/CR = dorso com redução.

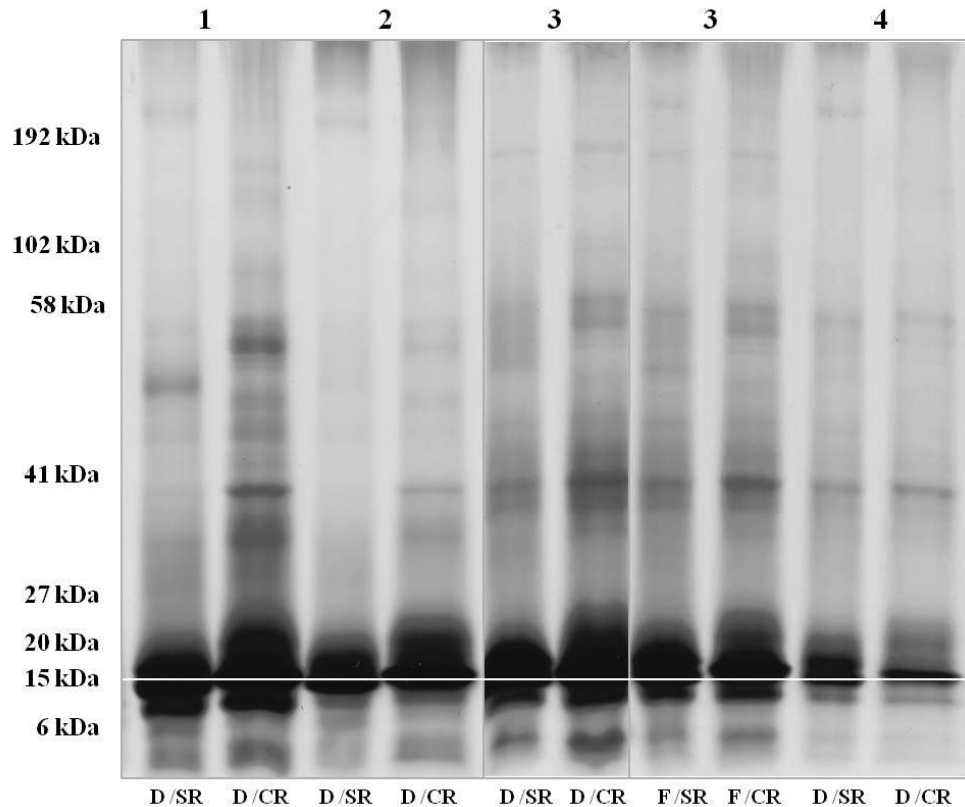


Figura 14. Perfis eletroforéticos dos mucos do dorso e do ferrão de exemplares de *Plesiotrygon iwamae*. D/SR = dorso sem redução. D/CR = dorso com redução. F/SR= ferrão sem-redução. F/C = ferrão com redução. A linha clara indica a banda de 15 kDa presente em todas as amostras.

Atividade fosfolipásica

Para a análise da atividade fosfolipásica foram usados somente os extratos de dorso e ferrão da arraia *P. iwamae* (exemplar n^o 3). Somente as dosagens de 30 µl (contendo 140 µg de proteína) de extrato de muco do dorso e do ferrão foram capazes de induzir hemólise indireta nos devidos intervalos de tempo de 24 e 48 horas. Não houve diferença significativa quando comparados os halos formados pelos extratos de dorso e ferrão. Porém, os halos formados pela hemólise dos eritrócitos tanto para o dorso quanto para o ferrão tiveram um aumento significativo do intervalo de 24 para 48 horas. Os halos formados pelos extratos de muco foram significativamente menores em relação ao controle positivo e todas as amostras foram diferentes em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). A dosagem mínima fosfolipásica deve formar um halo 10 mm como proposto por (GUTIÉRREZ et al., 1988). Neste estudo, a dosagem de 140 µg não foi capaz de formar um halo neste valor.

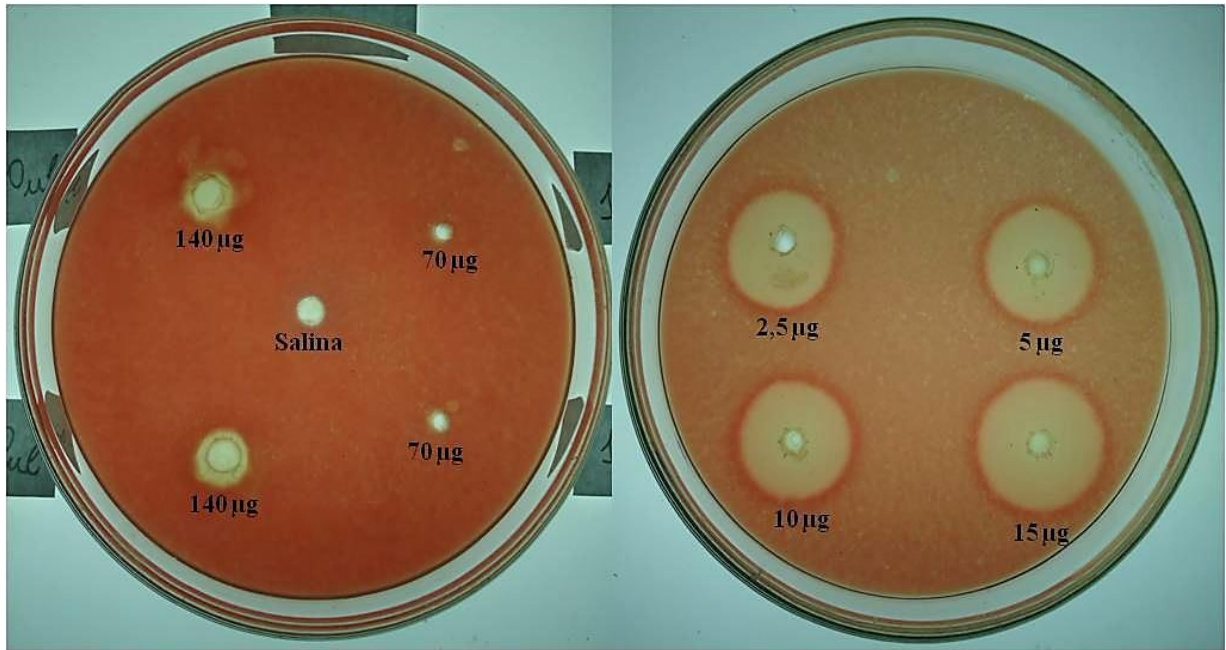


Figura 15. Atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* e pelos extratos de muco do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. A – Poços aplicados com controle negativo (salina estéril), 70 e 140 µg de muco do ferrão e do dorso (diluídos em 15 e 30 µl de salina, respectivamente). B – Veneno de *B. atrox*, aplicado nos poços, nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 µg. Observe que os halos de hemólise formados pelo veneno de *B. atrox* são bem maiores e estão em concentrações menores, quando comparados aos extratos de muco do dorso e do ferrão *P. iwamae*.

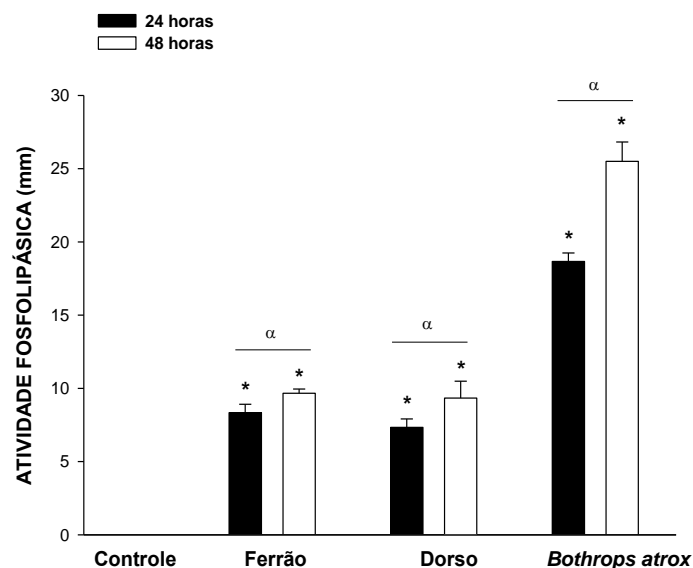


Figura 16. Gráfico da atividade fosfolipásica mensurada dos extratos de muco do dorso e do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. α indica diferença significativa quando o mesmo veneno fora testado nos intervalos de tempo de 24 e 48 horas, $p < 0,05$. * indica diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

As arraias possuem de um a três ferrões na base da cauda que, quando usada na defesa do animal, funciona como um chicote, causando uma lesão severa (THORSON et al., 1988; BARBARO et al., 2007; DEHGHANI et al., 2009). Os ferrões são estruturas afiadas, alongadas e mineralizadas, derivados de denticulos dérmicos modificados (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009), retroserrados bilateralmente e cobertos por uma bainha tegumentar com um sulco glandular ventrolateral, contendo glândulas de veneno ao longo de cada borda (HALSTEAD, 1988; DEHGHANI et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

Em adição ao veneno, as arraias produzem um muco espesso, que recobre todo o corpo do animal. O muco, secretado por células mucosas localizadas na epiderme, é considerado a primeira linha de defesa (ZHAO et al., 2008), e, como observado em diversas espécies de peixes, pode conter aminoácidos, peptídeos, carboidratos, glicopeptídeos, glicolipídeos, (KLESIUS et al., 2008) serotonina, fosfodiesterase, 5'- nucleotidase, agentes vasoconstritores (AUERBACH, 1991; EVANS; DAVIES, 1996; WEISS; WOLFENDEN, 2001) componentes imunes, como lisozimas, imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento, lectinas, proteína C-reativa, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos (ALEXANDER; INGRAM, 1992). De fato, as arraias de água doce não possuem glândulas de veneno individualizadas (BARBARO et al., 2007). E, ainda não existem estudos mostrando que as arraias possuem um “veneno” propriamente dito. Mas já existem estudos onde foram isolados compostos do muco das arraias de água doce. Peptídeos, como orpotrina e porflan, foram isolados do epitélio do ferrão de *Potamotrygon* sp. *orbignyi* (CONCEIÇÃO et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2009). Tais peptídeos foram capazes de induzir vasoconstrição e inflamação, respectivamente. MAGALHÃES et al. (2008), isolaram e caracterizaram uma hialuronidase do epitélio do ferrão de *Potamotrygon motoro* do Rio Crixás-Açu, Goiás.

Neste estudo, foi mostrado que o muco das arraias *P. motoro* e *Plesiotrygon iwamae* contém uma série de componentes, com massas moleculares diferentes, como observados no SDS-PAGE.

A reação inflamatória intensa observada em acidentes com arraias em humanos sugere possíveis distúrbios na matriz extracelular, causados pelo veneno (HADDAD JR. et al., 2004). Por análise de zimografia, foi mostrado que os extratos de muco do ferrão das arraias de água doce *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon* cf. *henlei* possuem enzimas que podem degradar gelatina, caseína, fibrinogênio e ácido hialurônico (HADDAD JR. et al., 2004;

BARBARO et al., 2007; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). Neste, ambos os extratos de muco do ferrão das arraias *P. motoro* e *P. iwamae* apresentaram componentes capazes de degradar gelatina, sugerindo que as proteases presentes nos extratos, podem, de fato, contribuir para a destruição da matriz extracelular, favorecendo, assim, a lesão local causada pelo veneno. Porém, é necessário que se façam outras análises de zimografia, desta vez, utilizando-se caseína, fibrinogênio e ácido hialurônico como substratos. Os resultados mostram, ainda, que o muco do dorso das arraias também possui componentes proteolíticos, demonstrando, mais uma vez, a importância do muco na imunidade inata das arraias.

Em relação à atividade fosfolipásica, foi mostrado que os extratos de muco e dorso da arraia *P. iwamae* induziram hemólise indireta quando colocados em agarose 1%, com gema de ovo e eritrócitos como substrato. As fosfolipases A₂ clivam a lecitina, presente na gema do ovo, tornando-a em lisolecitina, que atua sobre a membrana dos eritrócitos, lisando-os e, conseqüentemente, formando um halo de coloração clara em torno do ponto de aplicação da amostra. Apesar da dose de 140 µg de proteína (das alíquotas de 30 µl de muco) ter apresentado fraca hemólise indireta e não atingir os 10 mm de diâmetro do halo propostos por GUTIÉRREZ et al. (1988), a dose de 400 µg de proteína (≈ 2,8x mais concentrada – usada para o estudo histopatológico do dano causado pelo veneno), induziu a uma rabdomiólise sistêmica nos camundongos BALB/c. Tal miotoxicidade talvez tenha sido causada ou pela maior quantidade de fosfolipases A₂ presentes nesta dose ou por outros componentes do veneno, incluindo miotoxinas ainda desconhecidas. Talvez, se a dosagem usada fosse superior a 140 µg, os halos teriam atingido os 10 mm de diâmetro. O veneno da serpente *Bothrops atrox* formou halo superior a 10 mm, com uma dosagem de apenas 10 µg (14x menos concentrada), mostrando que, o veneno das arraias, em comparação com os de serpentes, possui atividade fosfolipásica bem menos intensa. De fato, BARBARO et al. (2007) mostraram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem, em 6 µg, 50x mais atividade fosfolipásica quando comparado aos 120 µg de proteína do muco do ferrão de *Potamotrygon falkneri*.

Pescadores da região de Barcelos, Amazonas, já relataram que, durante a manipulação das arraias, permitiram, acidentalmente, que um ferimento recente qualquer entrasse em contato com o muco dos animais, e que apresentaram dor e edema no local do ferimento (dados não publicados de Wallace Duncan). O mecanismo de indução de dor, edema e necrose, nos acidentes com arraias, ainda é incerto, mas, certamente o muco contribui para o dano tecidual (MAGALHÃES et al., 2006). Além disso, a gravidade da lesão também é devida à ação mecânica do ferrão, que, além de introduzir o veneno, possibilita que bactérias

presentes no muco e na água onde o animal vive adentrem o ferimento, podendo causar infecções secundárias(DOMINGOS et al., 2011).

Em conclusão, nós acreditamos que a presença de componentes proteolíticos capazes de degradar a matriz extracelular e de fosfolipases nos mucos/venenos das arraias de água doce pode contribuir para a necrose local característica aos acidentes.

RESULTADOS – Parte II – anexo do trabalho na forma de artigo científico enviado para a revista *Toxicon* (ISSN: 0041-0101) – versão na língua Portuguesa

Rabdomiólise sistêmica induzida pelos venenos das arraias de água doce *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae), da Bacia Amazônica.

Juliana Luiza Varjão Lameiras^{a#}, Oscar Tadeu Ferreira da Costa^b, Fábio Tonissi Moroni^c, José de Ribamar Araújo^d, Sandra Maria Evangelista Caranhas^d, Carlos Melquiades de Almeida Marques^d, Maria Cristina dos Santos^{a*}, Wallice Luiz Paxiúba Duncan^b.

^aLaboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

^bLaboratório de Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

^c Biotério Central, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

^d Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Avenida Pedro Teixeira, 25, CEP 69040-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

#Parte de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

* Correspondência do autor: +55 92 3305-4276. E-mail: mcsantos@ufam.edu.br.

Resumo

Apesar da subnotificação na região Norte do Brasil, acidentes por arraias de água doce são caracterizados por dor intensa e alterações patológicas no local da lesão, que incluem edema, eritema e, na maioria dos casos, necrose. Neste estudo, foi analisada a atividade miotóxica sistêmica induzida pelos extratos de muco da região dorsal e do ferrão das arraias *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro*. Vinte e quatro horas após a injeção da dose de 400 µg dos extratos, nos músculos gastrocnêmios de camundongos, foi observado: necrose coagulativa do tecido muscular, regeneração das fibras musculares e presença de infiltrados inflamatórios, incluindo neutrófilos, macrófagos, e um número reduzido de eosinófilos e linfócitos. Tais danos também foram observados, em menor porcentagem, nos músculos gastrocnêmios das patas contralaterais, demonstrando que os extratos das duas espécies foram capazes de induzir rabdomiólise sistêmica. Por análise morfométrica, foi observado que o extrato do ferrão de *P. motoro* foi mais potente em induzir a atividade miotóxica. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a importância de se obter imunobiológicos específicos, para o tratamento dos acidentes por arraias de água doce, capazes de neutralizar a rabdomiólise sistêmica.

Palavras-chave: Potamotrygonídeos; Extrato do ferrão; Extrato do dorso; Veneno; Necrose; Infiltrados inflamatórios; Atividade miotóxica.

1. Introdução

Os animais aquáticos de maior importância médica são os peixes e causam acidentes que geram ferimentos com diversos sintomas, como dor intensa, necrose cutânea, bolhas, ulcerações e febre (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011). As arraias, apesar de não serem agressivas, causam um grande número de acidentes nas regiões que habitam (HALSTEAD, 1966; ERICSSON et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2008), sendo, assim, consideradas um problema de saúde pública (ERICSSON et al., 2006). As arraias pertencem à Classe Chondrichthyes, (peixes cartilagosos), Subclasse Elasmobranchii, Subdivisão Batoidea, ordem Myliobatiformes (NELSON, 2006) e apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em mares temperados e tropicais (UZEL et al., 2002; BARBARO et al., 2007) e, ainda, nos rios da América do Sul, África Equatorial e no Rio Mekong, no Sudeste asiático (MAGALHÃES et al., 2008). No Brasil, as espécies de água doce, da família Potamotrygonidae, estão presentes nos rios das regiões Norte, Centro-Oeste, Sul e Sudeste (CARVALHO et al., 2003). Na Bacia Amazônica, estas arraias são encontradas em todos os tipos de rios (SIOLI, 1967), incluindo rios de água branca (rica em sedimentos), água clara (pobre em sedimento), e água preta (rica em ácidos húmicos) (DUNCAN; FERNANDES, 2010; ROSA et al., 2010). Quatro gêneros de potamotrigonídeos estão reconhecidos atualmente: *Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Heliotrygon* (ROSA et al., 1987; CHARVET-ALMEIDA et al., 2002; CARVALHO; LOVEJOY, 2011).

As arraias de água doce são animais de hábito bentônico, costumando ficar escondidas sob a areia, no fundo dos rios (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). No entanto, se são acidentalmente pisadas ou têm suas nadadeiras tocadas, as arraias giram o corpo em comportamento defensivo, movimentando a cauda rapidamente e, assim, introduzindo o ferrão na vítima, causando um ferimento profundo e dolorido (MAGALHÃES et al., 2006). Os ferrões são afiados, alongados e mineralizados, derivados de dentículos dérmicos modificados (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009), retro serrados bilateralmente e cobertos por uma bainha tegumentar com um sulco glandular ventrolateral, contendo glândulas de veneno ao longo de cada borda (HALSTEAD, 1988; DEGHANI et al., 2009; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

As regiões anatômicas mais afetadas são os pés e os calcanhares, no caso dos banhistas, e as mãos, no caso dos pescadores (BRISSET et al., 2006; LIM; KUMARASINGHE, 2007), que se acidentam ao manipular o animal. Lesões letais raramente ocorrem, exceto em casos onde o ferrão atinge órgãos vitais (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). É muito provável que o delicado tegumento que envolve o ferrão seja dilacerado durante a penetração

na pele da vítima, liberando, assim, o veneno (HADDAD JR. et al., 2004). A gravidade da lesão também é devida à ação mecânica do ferrão, que possibilita a entrada de bactérias, presentes no muco e na água onde o animal vive, podendo causar infecções secundárias (DOMINGOS et al., 2011). Não há um antiveneno específico para o tratamento das lesões e a abordagem terapêutica é baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios, água morna para aliviar a dor intensa e uso de antibióticos para prevenir infecção secundária (HADDAD JR. et al., 2004; BARBARO et al., 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010).

Devido ao grande tamanho corporal, ao endemismo de algumas espécies, à dificuldade de captura e aos riscos com o manuseio, o veneno das arraias de água doce tem sido pouco estudado quando comparado aos venenos de outros grupos de animais aquáticos (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). Além disso, a quantidade de veneno que se consegue extrair é mínima, e o veneno é termolábil, o que dificulta o seu transporte e conservação (HADDAD JR. et al., 2004). Sendo assim, existem poucos dados publicados sobre os efeitos e as propriedades biológicas dos venenos das arraias da família Potamotrygonidae encontradas na Bacia Amazônica.

Considerando que os venenos de arraia induzem danos locais que levam à necrose tecidual (HADDAD JR. et al., 2004; BARBARO et al., 2007), o presente estudo teve por objetivo analisar a ação miotóxica local e sistêmica induzidas pelos extratos de muco do dorso e do ferrão de exemplares de *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, da Bacia Amazônica.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção e preparo dos venenos

Espécimes de *Plesiotrygon iwamae* e *Potamotrygon motoro* (Fig. 1) foram coletadas no Lago do Janauacá, município de Manaquiri, a cerca de 60 km a sudoeste da cidade de Manaus, na margem direita do Rio Solimões (S03°51'/W55°59'), sob licença do IBAMA/SISBIO (22055-2). O ferrão e o dorso das arraias foram raspados com auxílio de bisturi e o material coletado (muco, juntamente com o epitélio) foi armazenado em nitrogênio líquido durante o transporte. As amostras foram misturadas a PBS pH 7.4e centrifugadas a 6000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20°C até o momento do uso. A concentração de proteínas presentes nas amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), usando-se albumina de soro bovino como padrão.

2.2. SDS-PAGE e zimografia

A análise das proteínas presentes nos extratos de muco e tecido do dorso e do ferrão das arraias foi feita pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme protocolo adaptado de LAEMMLI (1970), com o gel de corrida na concentração de 15% e o gel do pente a 5%. Foram usados 30µg de proteína, na proporção de 1:1 (v/v) com tampão de amostra sob condições não-redutoras. Como marcadores de peso molecular foram usados miosina (192 kDa), β-galactosidase (102,1 kDa), albumina de soro bovino (58, 1kDa), ovalbumina (41 kDa), anidrase carbônica (27,9 kDa), inibidor tripsina de soja (20,4 kDa), lisozima (15,1 kDa) e aprotinina (6,4 kD) (BioRad® Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, USA), na quantidade de 15 µl. Para a visualização das bandas proteicas, os géis foram corados, após a corrida, com Coomassie-Blue R-250 (BioRad®). Zimografia foi utilizada para verificar a presença de enzimas proteolíticas nos extratos de muco do ferrão e do dorso das arraias, conforme protocolo de MONTEIRO-DOS-SANTOS et al. (2011). O SDS-PAGE foi preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, com gelatina a 2 mg/ml incorporada ao gel. O surgimento de bandas sem coloração nos géis indicou a presença de atividade gelatinolítica.

2.3. Animais

Neste estudo, foram usados 21 camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, pesando entre 18 a 22 g, provenientes do Biotério do Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz/Manaus). Os animais foram alojados em gaiolas, com temperatura ambiente controlada em 25° C e receberam água e alimento *ad libitum*. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), protocolo de Nº 070/2012. Todos os procedimentos envolvendo os camundongos foram feitos baseados na legislação nacional e princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratórios (SBCAL) e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.4. Indução da atividade miotóxica local e sistêmica

Para avaliação da atividade miotóxica, foram injetados 400 µg de proteína [(dose mínima capaz de induzir reação inflamatória intensa e necrose, conforme BARBARO et al. (2007)] dos extratos de muco (dorso e ferrão) das arraias *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon iwamae*, diluídos em 50 µl de salina estéril, no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos. Os animais foram sacrificados após 24 horas, por deslocamento

cervical. Os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo de todos os camundongos foram cuidadosamente retirados e fixados em formol tamponado 10%, por 5 dias, a temperatura ambiente. Os camundongos do grupo controle receberam salina estéril.

2.5. Processamento do tecido e análise histopatológica

Após a fixação, os músculos foram seccionados transversal e longitudinalmente e desidratados em uma série alcoólica crescente, clareados em xilol e incluídos em parafina histológica. Seções histológicas de 5 µm de espessura foram coradas com Hematoxilina e Eosina, e PTAH (hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory). Para a coloração de PTAH, as seções foram oxidadas com solução de permanganato de potássio 0,25%, durante 5 minutos e lavadas, primeiramente, com água destilada e, em seguida, com solução de ácido oxálico a 5%. Logo após, as seções histológicas foram deixadas em hematoxilina ácida fosfotúngstica (1g de hematoxilina, 20g de ácido fosfotúngstico e 1000 ml de água destilada q.s.p) durante toda a noite, a temperatura ambiente. Todos os procedimentos adotados para o processamento histológico foram feitos de acordo com KIERNAN (2008).

2.6. Imunohistoquímica

Para evidenciar a presença de macrófagos, foi feita imunohistoquímica para marcar CD68. As seções histológicas foram lavadas em PBS – Tween 20 (0.1M PBS, 0.5% Tween 20, pH 7.4), por dois minutos. Para a recuperação do antígeno, Epitope Retrieval Steamer Set (IHC-Tek™, USA) foi usado. Para reduzir a coloração inespecífica de fundo, foi usado PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) contendo 5% de soro de cabra e peróxido de hidrogênio a 3%, em PBS, por 10 minutos, para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Anticorpo primário monoclonal de rato anticamundongo CD68 (MCA1957; Serotec, USA) foi usado numa diluição de 1:100 e incubado com as seções histológicas, por uma hora, a temperatura ambiente. Para a detecção imunohistoquímica, as seções foram incubadas com anticorpo secundário de cabra antirrato conjugado com HRP (Bio-Rad, USA), por 30 minutos, a temperatura ambiente. Ao final, as seções foram incubadas com DAB Peroxidase Substrate Kit (IHC-Tek™, USA), lavadas em PBS – Tween 20, três vezes, por dois minutos e coradas com hematoxilina para auxiliar na visualização do tecido.

2.7. Densidade de volume (volume relativo, V_v) – Esterelogia

A densidade de volume (%) dos componentes no tecido muscular foi obtida pelo sistema de contagem de pontos de HOWARD; REED (2010). Para tal, em uma primeira etapa, cada seção histológica foi visualizada em sua totalidade e fotografada em baixo aumento (Leica EZ4D Estereomicroscópio Digital System, 8x). Em seguida, um sistema teste de contagem contendo linhas horizontais e verticais (quadrantes) foi sobreposto às imagens individuais para a seleção do campo de vista a ser analisado posteriormente. O programa de análise de imagens ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health) foi utilizado nesta etapa por meio da técnica de amostragem sistemática uniforme ao acaso, SURS (systematic uniform random sampling), para a seleção dos campos de vista. Brevemente, o número total de quadrantes contendo tecido muscular foi contado e em seguida esse valor foi dividido pelo número de campos de vista a ser analisado nessa seção histológica. No presente estudo, de 10 a 12 campos/seção foram selecionados para análise. Essa abordagem permite a seleção de campos de vista de forma aleatória e evita a interferência do observador, é eficiente e minimiza o viés nos resultados (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981). Os campos amostrados foram fotografados em maior aumento (objetiva Ach 40x/0,65; ocular GSWH 10x/22) para posterior análise por meio de um fotomicroscópio Olympus BX-41. Na etapa seguinte, cada imagem (de 10 a 12 por seção histológica) foi quantificada quanto à porcentagem de: músculo sem dano, rbdomiólise, regeneração muscular, infiltrados inflamatórios e vasos sanguíneos. Nesta etapa, o programa de análise de imagens (módulo estereologia) IMOD 4.5 (KREMER et al., 1996) foi utilizado. Para tal, um sistema teste de contagem contendo pontos foi sobreposto a cada imagem para permitir a quantificação das estruturas citadas anteriormente. A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (tecido muscular) foi calculado como:

$$V_v(\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

V_v é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa) de determinado componente tecidual (músculo saudável, rbdomiólise, regeneração muscular, infiltrados leucocitários e vasos sanguíneos), P_{comp} é a somatória de pontos que tocam determinado componente tecidual, e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (tecido muscular).

2.8. Análises estatísticas

Para as análises dos dados, foram usados o programa estatístico SIGMASTAT 3.5 e o programa gráfico SIGMAPLOT 11.0 (Systat Software Inc. Alemanha). Para testar a variância resultante da aplicação da contagem de pontos sobre as seções foi calculado o *CE* (coeficiente de erro) sobre dados morfométricos brutos de acordo com HOWARD; REED (2010):

$$CE = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

Onde: *CE* indica o coeficiente de erro para a determinação da densidade de volume; *k* representa o número de imagens analisadas e *u* e *v* são as somatórias de pontos sobre cada campo de vista. Um $CE \leq 10\%$ foi considerado satisfatório (preciso). Todos os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão da média. As comparações entre o grupo controle e os grupos injetados com os extratos foram analisadas por meio de ANOVA (análise de variância one-way), seguida do teste de múltiplas comparações de Dunnett. Para a comparação entre as variáveis dependentes (músculo gastrocnêmio esquerdo e direito), foi aplicado um teste *t* pareado. Em todos os cálculos, um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1. SDS-PAGE e zimografia

Os perfis eletroforéticos obtidos a partir dos extratos de muco do dorso e do ferrão da espécie *P. motoro* apresentaram diferenças (Fig. 2A). Enquanto o extrato do dorso apresentou uma banda forte difusa com cerca de 41 kDa e componentes proteolíticos entre 58 e 41 kDa e outro com 6 kDa (Fig. 2C), o extrato do ferrão apresentou uma banda difusa de 10 kDa, várias bandas entre 58 e 27 kDa e componentes proteolíticos acima de 58 kDa. Em *Plesiotrygon iwamae*, os perfis eletroforéticos do extrato do dorso e do ferrão foram semelhantes (Fig. 2B), apresentando uma banda intensa e difusa de 15 kDa e componentes proteolíticos de 6 e 40 kDa (Fig. 2D).

3.2. Análise qualitativa

Quanto às mudanças histopatológicas, após 24 horas da injeção dos extratos de muco (dorso ou ferrão) das arraiais *Potamotrygon motoro* ou *Plesiotrygon iwamae* nos camundongos, foi observada a presença de necrose coagulativa (Fig. 3D e Fig. 4B – C), regeneração da fibra muscular (Fig. 3E), recrutamento de infiltrados inflamatórios, incluindo neutrófilos (Fig. 3F), macrófagos (Fig. 4E – F), e um pequeno número de linfócitos e eosinófilos (dados não mostrados). Tais efeitos também foram observados nos músculos gastrocnêmios esquerdos, demonstrando que os extratos do ferrão e do dorso das duas espécies de arraiais foram capazes de induzir a uma rabdomiólise sistêmica em camundongos BALB/c.

3.3. Análise quantitativa

A injeção dos extratos de muco do dorso ou ferrão dos exemplares de *Potamotrygon motoro* ou *Plesiotrygon iwamae* resultaram em diferentes níveis de alterações morfológicas no músculo gastrocnêmio direito (local da injeção) e esquerdo (sem injeção). A Tabela 1 apresenta os valores de média \pm desvio padrão das densidades de volumes obtidas. A Fig. 5A-E apresenta os resultados morfométricos obtidos das comparações: 1) entre o músculo gastrocnêmio direito do grupo-controle e dos grupos-teste e 2) entre os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo de cada grupo-teste e controle.

Todos os gastrocnêmios injetados (lado direito) com os extratos de muco do ferrão ou do dorso de ambas as espécies apresentaram redução significativa na porcentagem de músculo sem dano quando comparados ao grupo controle ($p = 0,001$). Os gastrocnêmios injetados também apresentaram menor porcentagem de musculatura sem dano quando comparados aos gastrocnêmios esquerdos (sem injeção). Em relação à densidade de volume de necrose (Fig. 5B), todos os gastrocnêmios injetados (direitos) com os extratos de muco de ambas as espécies apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p = 0,005$), mas somente os grupos de camundongos injetados com os extratos de *Plesiotrygon iwamae* apresentaram diferença significativa quando comparados os gastrocnêmios direito com o esquerdo ($p = 0,039$ para o muco do ferrão e $p = 0,023$ para o muco do dorso). A Fig. 5C apresenta a proporção regeneração muscular observada. Somente nos gastrocnêmios injetados com o extrato do ferrão de *P. motoro* verificou-se aumento significativo na regeneração muscular em relação ao controle ($p = 0,002$). Não houve diferença significativa em relação à regeneração entre os gastrocnêmios direito e esquerdo de todos os grupos-teste. A Fig. 5D apresenta a porcentagem de infiltrados inflamatórios no tecido muscular. Em relação ao

controle, esta porcentagem foi significativamente maior nos músculos em que foram injetados os extratos ($p = 0,021$). Houve diferença na densidade de volume de infiltrados inflamatórios quando comparados os gastrocnêmios direito e esquerdo de todos os grupos-teste. A Fig. 5E apresenta os valores da densidade de vasos sanguíneos no tecido muscular. Não há diferença significativa entre os grupos-testes e o controle ($p = 0,065$) e entre os gastrocnêmios direito e esquerdo dos grupos-testes, indicando que não houve proliferação de vasos sanguíneos no período de 24 horas. Nos músculos gastrocnêmios das patas esquerdas do grupo-controle não foram observadas alterações morfológicas (dados não mostrados).

4. Discussão

Miotoxicidade tem sido atribuída a acidentes com arraias marinhas, como observado por MASSON et al. (2012), que constatou o aumento dos níveis de creatina quinase total (CK-MM, CK-MB e CK-BB) e de CK-MB (músculo cardíaco) de um indivíduo acidentado, provavelmente, por uma espécie do gênero *Dasyatis* sp. BARBARO et al. (2007), comparando os extratos de tecido e muco da arraia marinha *Dasyatis guttata* e da arraia de água doce *Potamotrygon falkneri*, observou que somente o extrato de *P. falkneri* apresentou miotoxicidade, pela dosagem de CK total e foi capaz de induzir necrose e letalidade quando testado em camundongos Swiss.

Sob nossas condições experimentais, as análises histopatológicas mostraram que os camundongos que receberam tanto o extrato do dorso quanto o extrato do ferrão de ambas as espécies de arraias apresentaram, após o período de 24 horas, necrose coagulativa do músculo esquelético, caracterizada pela fragmentação e eosinofilia sarcoplasmática, perda da estriação transversal e presença de núcleos picnóticos (ou ausentes) (LIMA et al., 2011), processo de regeneração da fibra muscular, caracterizada pela basofilia sarcoplasmática e proliferação das células satélites (TIDBALL, 2005) e infiltrados inflamatórios. Nossos dados corroboram com o estudo de ANTONIAZZI et al. (2011), que, ao caracterizar as mudanças histopatológicas induzidas pelos extratos de tecido do ferrão da arraia *P. falkneri*, constataram que, seis horas após a injeção intradérmica, surgem infiltrados inflamatórios, focos de necrose em células epidérmicas basais e que, no intervalo de 24 horas, já foi possível observar necrose da pele, do tecido subcutâneo e do músculo esquelético. No presente estudo, as alterações histopatológicas foram observadas não somente no local de injeção dos extratos (músculo gastrocnêmio direito), mas também no músculo gastrocnêmio esquerdo. Sendo assim, nosso estudo é o primeiro a relatar que o muco (veneno) que recobre o dorso e o ferrão das arraias de água doce é capaz de induzir à rbdomiólise sistêmica quando testado em modelo murino.

Os gastrocnêmios injetados com o extrato de muco do ferrão de *Potamotrygon motoro* apresentaram o menor volume de músculo sem dano, e, conseqüentemente, maior volume de rbdomiólise, maior volume de regeneração muscular e maior volume de infiltrados em relação ao controle ($p < 0,05$). Mesmo sem haver diferença significativa ($p = 0,427$ para o muco do ferrão e $p = 0,061$ para o muco do dorso), nossos dados histopatológicos mostram que os gastrocnêmios injetados diretamente com os extratos de *P. motoro* apresentaram um aumento na porcentagem de tecido necrosado quando comparados aos contralaterais. Os músculos injetados também mostraram um aumento significativo no volume de infiltrados inflamatórios. Quando comparados os grupos injetados com os extratos de *P. motoro*, os danos teciduais foram mais acentuados nos animais que receberam o muco do ferrão. Foram observadas diferenças nos perfis proteicos e nas massas moleculares dos componentes proteolíticos do muco do dorso e do ferrão de *P. motoro*. Tais diferenças nas composições proteicas dos mucos poderiam explicar a maior porcentagem de dano tecidual induzido pelo muco do ferrão de *P. motoro*.

Em relação à espécie *Plesiotrygon iwamae*, os extratos de muco do ferrão e do dorso induziram a uma porcentagem semelhante de alterações histopatológicas nos músculos injetados e nos músculos contralaterais. Os mucos do dorso e do ferrão apresentaram perfis proteicos e componentes proteolíticos semelhantes, o que pode justificar a semelhança na porcentagem de dano tecidual induzidos pelos extratos. A porcentagem de rbdomiólise e de infiltrados inflamatórios foi maior nos músculos diretamente injetados. O volume de regeneração do tecido muscular foi menor em comparação aos grupos injetados com os extratos de *P. motoro*. No geral, o dano local e sistêmico foi maior nos grupos injetados com os extratos de *P. motoro*.

Danos severos ao tecido muscular ativam uma sequência de interações entre as células musculares e as células inflamatórias. A resposta inflamatória inicial é caracterizada pela presença de neutrófilos e, posteriormente, por macrófagos CD68⁺. Macrófagos podem propagar a resposta Th1, liberando citocinas pró-inflamatórias e IL-12, causando danos adicionais ao tecido pela liberação de óxido nítrico (TIDBALL; VILLALTA, 2010). Em nosso estudo, o período de 24 após a injeção dos extratos evidenciou a presença de muitos neutrófilos e macrófagos, fazendo a retirada de debris celulares, como mostrado pela imunohistoquímica para CD68. Na figura 3B é possível observar a aderência de leucócitos em um vaso sanguíneo. Aumento no rolamento e aderência de leucócitos foi observado em estudo com o muco do ferrão de *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbignyi*

(MAGALHÃES et al., 2006) e com os mucos do dorso e do ferrão de *Potamotrygon cf. henlei* (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

Macrófagos promovem o reparo de tecidos lesionados estimulando o crescimento de novos vasos sanguíneos, uma vez que podem produzir várias citocinas angiogênicas, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de transformação do crescimento α (TGF- α) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (DUFFIELD, 2003). Porém, no nosso experimento, não houve aumento significativo no volume de vasos sanguíneos dos músculos gastrocnêmios injetados com extratos e nos contralaterais, no período de 24 horas.

Os acidentes com arraias de água doce se caracterizam, principalmente, por sua intensa ação inflamatória (ANTONIAZZI et al., 2011). A vítima se queixa de dor intensa, desproporcional ao tamanho da lesão (PARDAL; GADELHA, 2010). Em torno da ferida aparecem eritema e edema, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Em seguida, surge uma necrose central, causando, na área afetada, flacidez do tecido e formação de uma úlcera profunda, que evolui lentamente, comum neste tipo de envenenamento (COOK et al., 2006; CLARK et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008). Os pacientes também podem apresentar complicações sistêmicas, como náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular e convulsões (HADDAD JR. et al., 2004; FORRESTER, 2005). O mecanismo de indução de dor, edema e necrose, nos acidentes com arraias de água doce ainda é incerto, mas, certamente o muco contribui para o dano tecidual, como mostrado no presente estudo e por MAGALHÃES et al. (2006). Nosso estudo mostrou que os extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias de água doce *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae* foram capazes causar rabdomiólise sistêmica quando testados em camundongos. Esses resultados mostram a necessidade de estudos complementares que visem o desenvolvimento de imunobiológicos capazes de neutralizar a ação local e sistêmica induzidas pelos venenos das arraias de água doce.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Agradecimentos

JLVL was the recipient of a MSc. fellowship from Fapeam (ref. no. 014/2010). MCS is the recipient of a CNPq-PQ grant (ref. no. 302615/2010-5). This investigation was supported

by research grants CNPq (proc. N^o 480892/2012-1 and N^o 484374/2011-7) and Fapeam (PPP and Universal Amazonas).

Os autores agradecem, ainda, ao Biotério do Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz/Manaus), e à Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado/AM, pelas valiosas contribuições e por nos fornecer as condições necessárias para a realização deste estudo.

Referências

- Antoniazzi, M. M., Benvenuti, L. A., Lira, M. S., Jared, S. G., Neto, D. G., Jared, C., Barbaro, K. C., 2011. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. *Toxicon* 57: 297-303.
- Barbaro, K. C., Lira, M. S., Malta, M. B., Soares, S. L., Garrone Neto, D., Cardoso, J. L., Santoro, M. L., Haddad Jr., V., 2007. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon* 50: 676-687.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brisset, I. B., Schaper, A., Pommier, P., De Haro, L., 2006. Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe. *Toxicon* 47: 32-34.
- Carvalho, M. R., Lovejoy, N. R., 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 48: 13-48.
- Carvalho, M. R., Lovejoy, N. R., Rosa, R. S., 2003. Family potamotrygonidae, in: Reis, R. E., Ferraris Jr., C. J., Kullander, S. O. (Eds.), Checklist of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA), 1^a Ed ed. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 22-29.
- Charvet-Almeida, P., Araújo, M. L. G., Rosa, R. S., Rincón, G., 2002. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News* 14: 1-20.
- Clark, R. F., Girard, R. H., Rao, D., Ly, B. T., Davis, D. P., 2007. Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. *The Journal of Emergency Medicine* 33: 33-37.
- Cook, M. D., Matteucci, M. J., Lall, R., Ly, B. T., 2006. Stingray envenomation. *The Journal of Emergency Medicine* 30: 345-347.
- Dehghani, H., Sajjadi, M. M., Rajaian, H., Sajedianfard, J., Parto, P., 2009. Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom. *Toxicon* 54: 881-886.
- Domingos, M. O., Franzolin, M. R., Dos Anjos, M. T., Franzolin, T. M. P., Barbosa Albes, R. C., De Andrade, G. R., Lopes, R. J. L., Barbaro, K. C., 2011. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. *Toxicon* 58: 147-153.
- Duffield, J. S., 2003. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical science* 104: 27-38.
- Duncan, W. L. P., Fernandes, M. N., 2010. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5: 454-464.

- Ericsson, C. D., Hatz, C., Junghanss, T., Bodio, M., 2006. Medically Important Venomous Animals: Biology, Prevention, First Aid, and Clinical Management. *Clinical Infectious Diseases* 43: 1309-1317.
- Forrester, M. B., 2005. Pattern of stingray injuries reported to Texas poison centers from 1998 to 2004. *Human & Experimental Toxicology* 24: 639-642.
- Garrone Neto, D., Haddad Jr., V., 2009. Acidentes por raias, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2^a Ed ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, pp. 295-313.
- Garrone Neto, D., Haddad Jr., V., 2010. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43: 82-88.
- Gundersen, H. J. G., Østerby, R., 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well! *Journal of microscopy* 121: 65-73.
- Haddad Jr., V., Garrone Neto, D., Paula Neto, J. B., Marques, F. P. L., Barbaro, K. C., 2004. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon* 43: 287-294.
- Halstead, B. W., 1966. Venomous marine animals of Brazil. *Memórias do Instituto Butantan* 33: 1-25.
- Halstead, B. W., 1988. Poisonous and venomous marine animals of the world. Princeton, New Jersey, The Darwin Press.
- Howard, C. V., Reed, M. G., 2010. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Kiernan, J. A., 2008. Histological and histochemical methods: theory and practice. U. K., Scion - Bloxham.
- Kremer, J. R., Mastrorarde, D. N., Mcintosh, J. R., 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of structural biology* 116: 71-76.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227: 680-685.
- Lim, Y. L., Kumarasinghe, S. P., 2007. Cutaneous injuries from marine animals. *Singapore Medical Journal* 48: e25.
- Lima, J. M., Freitas, F. J. C., Amorim, R. N. L., Câmara, A. C. L., Batista, J. S., Soto-Blanco, B., 2011. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. *Toxicon* 57: 183-185.
- Magalhães, K. W., Lima, C., Piran-Soares, A. A., Marques, E. E., Hiruma-Lima, C. A., Lopes-Ferreira, M., 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Toxicon* 47: 575-583.
- Magalhães, M. R., Da Silva Jr, N. J., Ulhoa, C. J., 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 51: 1060-1067.
- Masson, A. A., Ormonde Do Carmo, P. H. A., Carvalho, J. L. V., 2012. Rhabdomyolysis secondary to an accident with marine stingray (*Dasyatis* family). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 18: 344-348.
- Monteiro-Dos-Santos, J., Conceição, K., Seibert, C. S., Marques, E. E., Ismael Silva Jr, P., Soares, A. B., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. *henlei*. *International Immunopharmacology* 11: 1368-1377.
- Nelson, J. S., 2006. *Fishes of the World*. New Jersey, USA.

- Pardal, P. P. O., Gadelha, M. a. C., 2010. Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas. Belém, Pará.
- Rosa, R. S., Castello, H. P., Thorson, T. B., 1987. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*: 447-458.
- Rosa, R. S., Charvet-Almeida, P., Quijada, C. C. D., 2010. Biology of the South American Potamotrygonid stingrays, in: Carrier, J. C., Musick, J. A., Heithaus, M. R. (Eds.), *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptative physiology and conservation*, 1st Edition ed. CRC Press, United States, pp. 241-286.
- Sioli, H., 1967. Studies in Amazonian waters, Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica. CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, pp. 9-50.
- Tidball, J. G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288: R345-R353.
- Tidball, J. G., Villalta, S. A., 2010. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298: R1173-R1187.
- Uzel, A. P., Massicot, R., Jean, M., 2002. Stingray injury to the ankle. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 12: 115-116.

Tabela 1. Análise morfométrica (densidade de volume, %) do efeito dos venenos de arraias de água doce sobre o tecido muscular de camundongo (massa = 18 a 22g).

DENSIDADE DE VOLUME (%)						
Grupo	Gastrocnêmio	Músculo sem dano	Rabdomiólise	Regeração muscular	Infiltrados inflamatórios	Vasos sanguíneos
Controle	Direito	97,71±1,18	0±0	0,43±0,15	0,03±0,01	1,82±0,62
Extrato de muco de <i>Potamotrygon motoro</i>						
Ferrão	Direito	79,65±7,18	8,88±4,26	3,47±0,94	6,38±3,39	1,62±0,74
	Esquerdo	92,14±2,66	4,81±2,84	1,98±0,21	0,34±0,32	0,71±0,17
Dorso	Direito	91,57±4,45	3,39±2,91	1,43±1,65	1,61±0,99	1,99±0,4
	Esquerdo	96,74±1,6	0,59±0,04	0,7±1,08	0,19±0,29	1,77±0,76
Extrato de muco de <i>Plesiotrygon iwamae</i>						
Ferrão	Direito	91,23±2,61	4,32±2,44	0,2±0,29	2,63±1,19	1,62±1,32
	Esquerdo	94,7±2,85	2,07±0,7	0,84±0,75	0,3±0,33	2,08±0,52
Dorso	Direito	89,39±2,42	4,17±1,27	0,26±0,22	3,73±3,23	2,44±0,33
	Esquerdo	96,05±3,02	1,51±0,31	0,12±0,26	0,34±0,05	1,98±0,72

Legendas das figuras:

Figura 1. Arraias de água doce usadas neste estudo, coletadas no Lago do Janauacá, Rio Solimões, próximo à cidade de Manaus. A: exemplar de *Potamotrygon motoro*. B: exemplar de *Plesiotrygon iwamae*.

Figura 2. Perfis eletroforéticos dos extratos de muco das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*. A: perfis eletroforéticos dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. motoro*. B: perfis eletroforéticos dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. iwamae*. C: zimografia dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. motoro*. D: zimografia dos extratos de muco do dorso e do ferrão de *P. iwamae*.

Figura 3. Comparações histopatológicas dos efeitos induzidos pelos extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, coloração por H-E. A: animal do grupo controle, sem evidência de necrose do tecido muscular. B: infiltrados inflamatórios presentes em gastrocnêmio diretamente injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. No quadrante, detalhe mostrando a aderência de infiltrados inflamatórios em vaso sanguíneo. C: vaso sanguíneo (V) mostrando novamente a aderência de infiltrados inflamatórios, desta vez, em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. D: necrose coagulativa do tecido muscular (*), caracterizada pela fragmentação e eosinofilia sarcoplasmática, perda da estriação transversal e presença de núcleos picnóticos (ou ausentes), em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do dorso de *P. iwamae*. E: regeneração muscular, caracterizada pela basofilia sarcoplasmática e proliferação das células satélites, presente em músculo diretamente injetado com o muco do dorso de *P. motoro*. F: em detalhe, a presença de numerosos neutrófilos (seta) em músculo injetado diretamente com o muco do dorso de *P. iwamae*. Todas as imagens estão em aumento de 400x, exceto F (aumento de 1000x).

Figura 4. Comparações histopatológicas dos efeitos induzidos pelos extratos de muco do dorso e do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, coloração de PTAH (em azul) e marcação imunohistoquímica para CD68. A: animal do grupo controle, sem evidência de necrose coagulativa do tecido muscular, mostrando claramente a estriação transversal do músculo. B: necrose coagulativa do tecido muscular em gastrocnêmio injetado diretamente pelo muco do ferrão de *P. motoro* (*). A fibra muscular necrosada, com perda da

estriação transversal, não se cora pela hematoxilina fosfotúngstica. C: necrose coagulativa do tecido muscular (*), evidenciada pela coloração de PTAH, em gastrocnêmio da pata contralateral de camundongo injetado com o muco do ferrão de *P. motoro*. D: animal do grupo controle, sem evidência de macrófagos. E: numerosos macrófagos (quadrante) presentes em tecido adiposo do músculo gastrocnêmio injetado diretamente com o muco do ferrão de *P. iwamae*. F: macrófagos retirando debris celulares em músculo injetado diretamente pelo muco do dorso de *P. iwamae*. Todas as imagens estão em aumento de 400x, exceto F (aumento de 1000x).

Figura 5. Resultados morfométricos (densidade de volume, %) do efeito dos venenos de araias de água doce sobre o tecido muscular de camundongo (massa = 18 a 22g). A: porcentagem de músculo sem dano. B: porcentagem de rabdomiólise. C: porcentagem de regeneração muscular. D: porcentagem de infiltrados inflamatórios. E: porcentagem dos vasos sanguíneos. * indica diferença significativa entre o os gastrocnêmios inoculados (direitos) e o grupo controle, $p < 0,05$. ** indica diferença significativa entre os gastrocnêmios direitos e os esquerdos (não-inoculados), $p < 0,05$.

Figura 1.

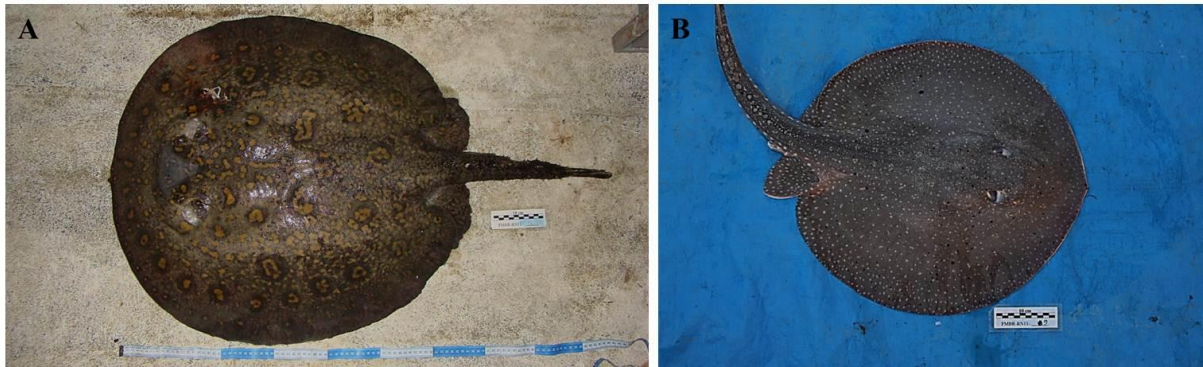


Figura 2.

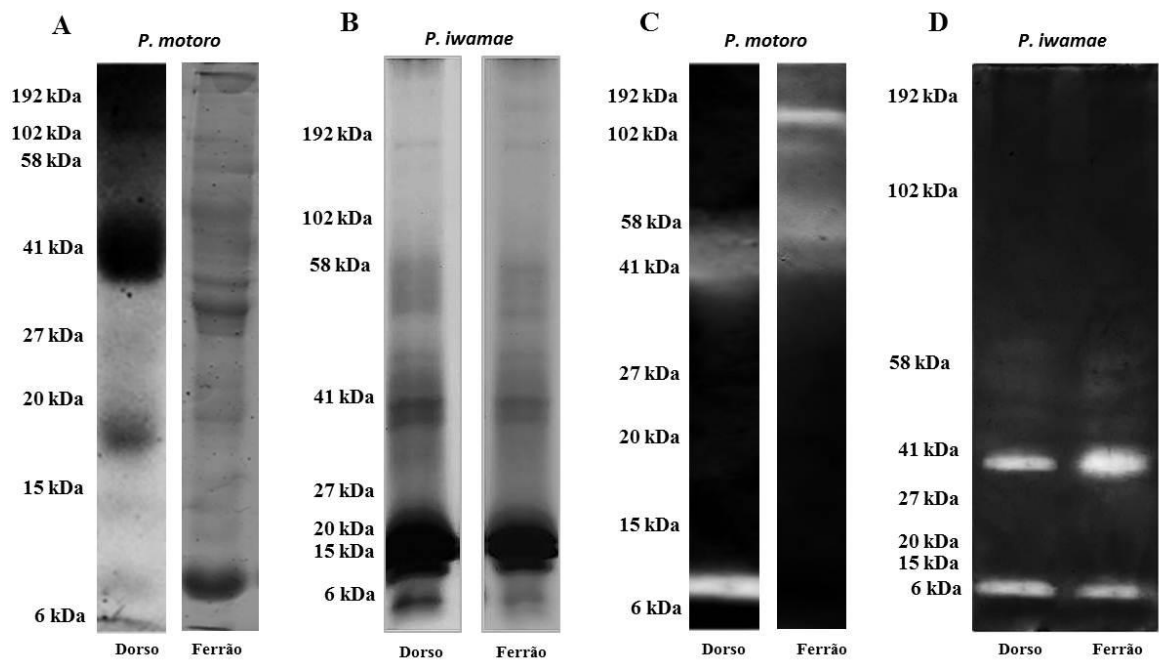


Figura 3.

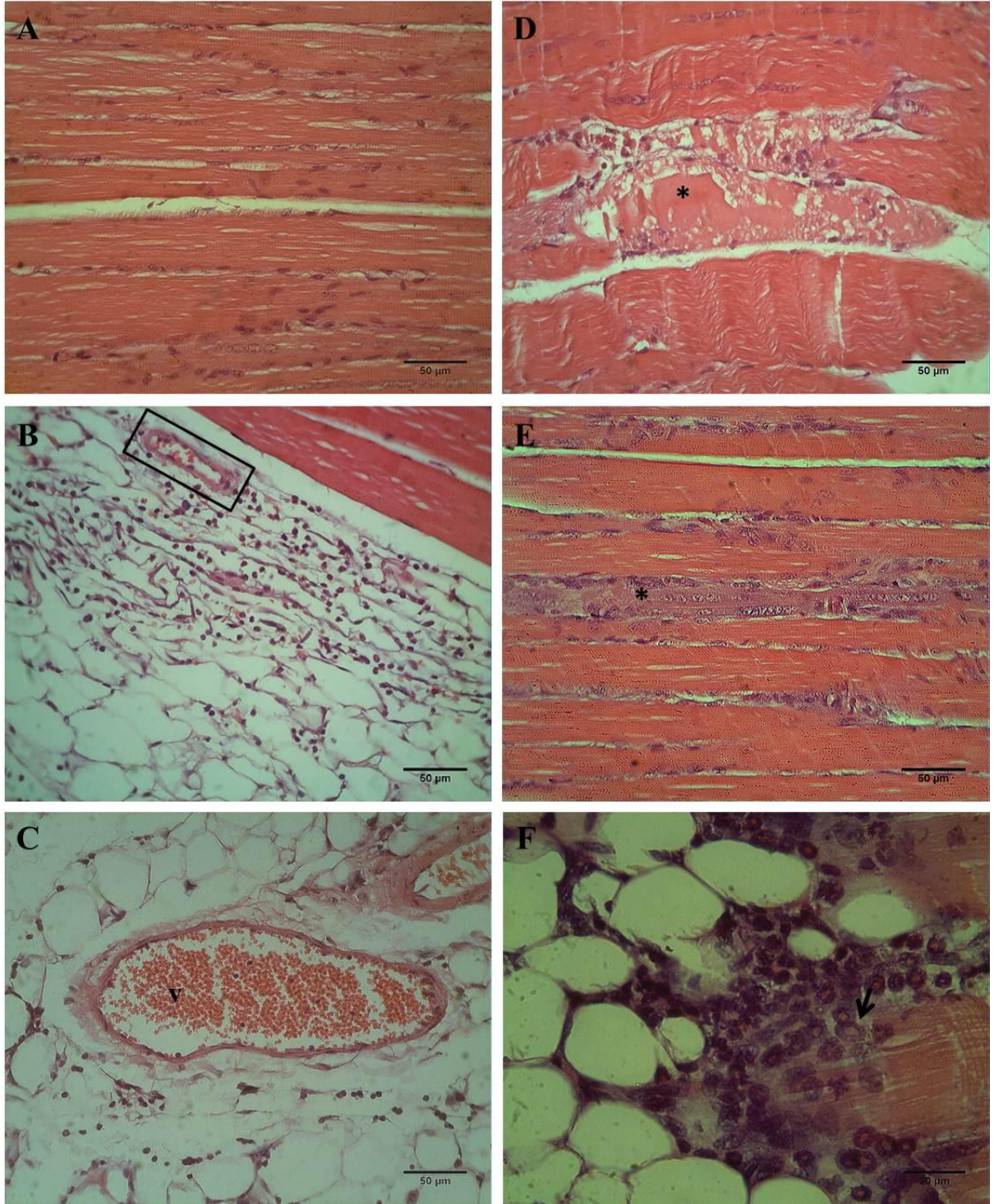


Figura 4.

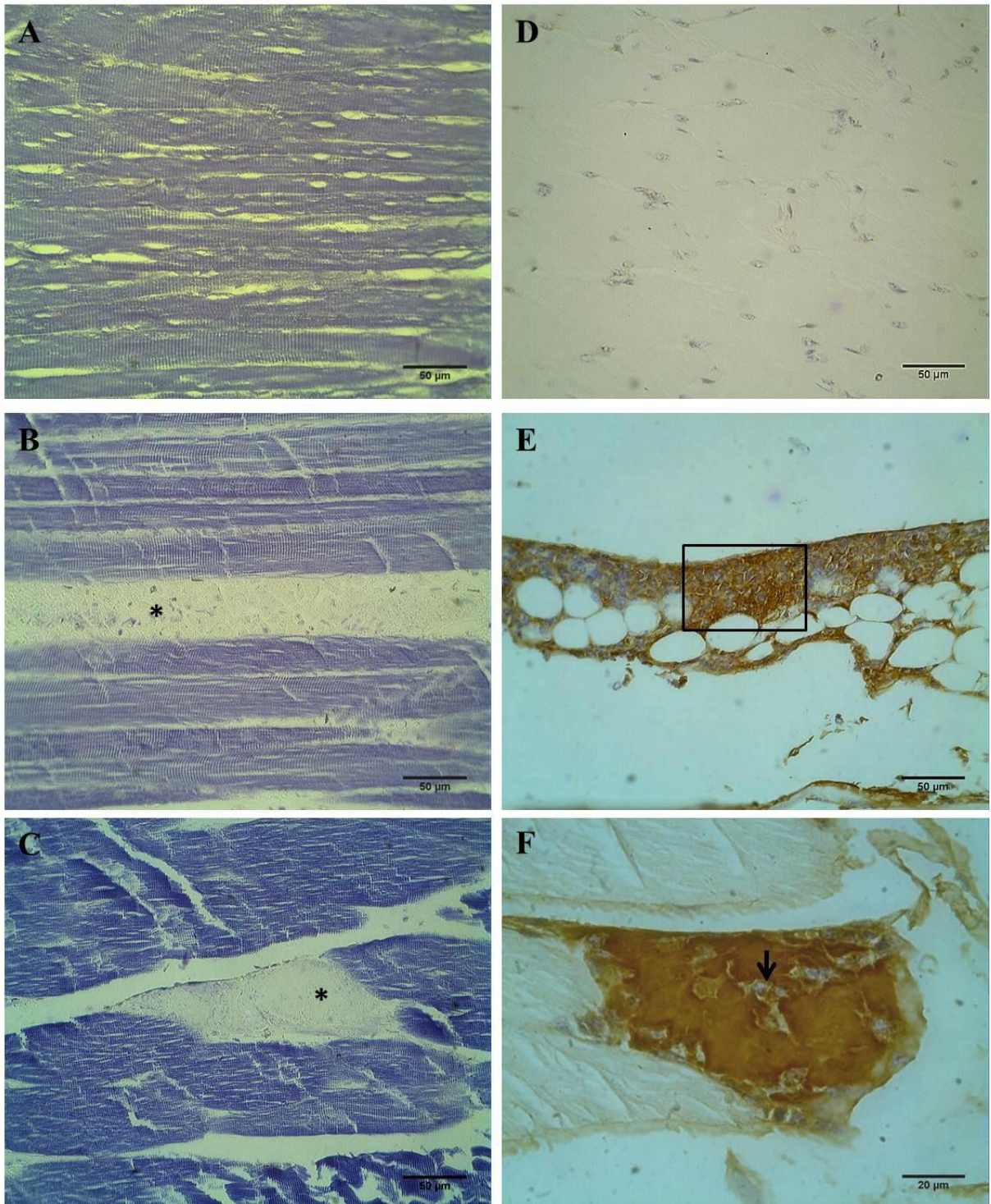
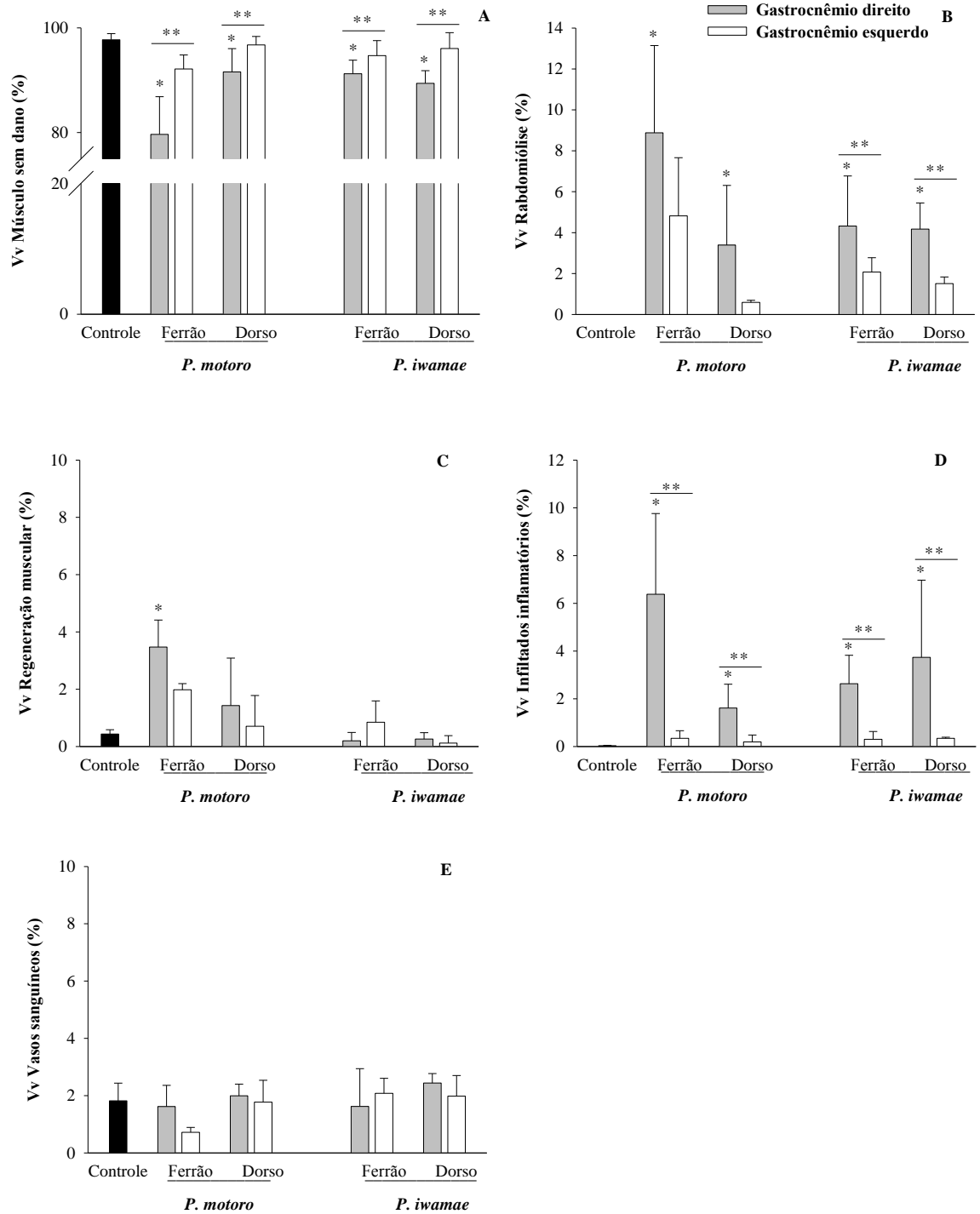


Figura 5.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 2, n. 0, p. 249-279, 1992.
- ALMEIDA, M. P.; BARTHEM, R. B.; VIANA, A. S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Diversidade de raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no estuário amazônico. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 41, n. 2, p. 82-89, 2008.
- ALMEIDA, M. P.; BARTHEM, R. B.; VIANA, A. S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó island, mouth of the Amazon River. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences (PANAMJAS)*, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.
- ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 7, n. 9, 2011.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, n. 3, p. 541-555, 2007.
- ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L. A.; LIRA, M. S.; JARED, S. G.; NETO, D. G.; JARED, C.; BARBARO, K. C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. *Toxicon*, v. 57, n. 2, p. 297-303, 2011.
- ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. *Information document AC*, v. 20, p. 1-6, 2004.
- AUERBACH, P. S. Marine Envenomations. *New England Journal of Medicine*, v. 325, n. 7, p. 486-493, 1991.
- BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; MALTA, M. B.; SOARES, S. L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J. L.; SANTORO, M. L.; HADDAD JR., V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*, v. 50, n. 5, p. 676-87, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRISSET, I. B.; SCHAPER, A.; POMMIER, P.; DE HARO, L. Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe. *Toxicon*, v. 47, n. 1, p. 32-4, 2006.

- CAMPBELL, J.; GRENON, M.; YOU, C. K. Pseudoaneurysm of the superficial femoral artery resulting from stingray envenomation. *Annals of Vascular Surgery*, v. 17, n. 2, p. 217-220, 2003.
- CARRIER, J. C.; PRATT, H. L.; CASTRO, J. I. Reproductive biology of elasmobranchs. In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Biology of sharks and their relatives*. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 10, p.269-286.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 48, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family potamotrygonidae. In: REIS, R. E.; FERARIS JR., C. J.; KULLANDER, S. O. (Ed.). *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*. 1st. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.22-29.
- CARVALHO, M. R.; MAISEY, J. G.; GRANDE, L. Freshwater stingrays of the green river formation of Wyoming (early eocene), with the description of a new genus and species and an analysis of its phylogenetic relationships (Chondrichthyes, Myliobatiformes). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p. 1-136, 2004/06/01 2004.
- CARVALHO, M. R.; PEREZ, M. H. S.; LOVEJOY, N. R. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, n. 2827, p. 1-30, 2011.
- CARVALHO, M. R.; RAGNO, M. P. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, v. 51, p. 101-138, 2011.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165–171, 2005.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCÓN, G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News*, v. 14, p. 1-20, March 2002.
- CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, v. 40, n. 8, p. 1083-1093, 2002.
- CLARK, R. F.; GIRARD, R. H.; RAO, D.; LY, B. T.; DAVIS, D. P. Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 33, n. 1, p. 33-37, 2007.
- CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: A novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Peptides*, v. 27, n. 12, p. 3039-3046, 2006.

- CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; ISMAEL SILVA JR., P.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. *Potamotrygon cf. henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein. *Toxicon*, v. 60, n. 5, p. 821-829, 2012.
- CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides*, v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.
- COOK, M. D.; MATTEUCCI, M. J.; LALL, R.; LY, B. T. Stingray envenomation. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 30, n. 3, p. 345-347, 2006.
- CROSS, T. B. An unusual stingray injury - the skindiver at risk. *Medical Journal of Australia*, v. 2, n. 25-26, p. 947-948, 1976.
- DEGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. *Toxicon*, v. 55, n. 6, p. 1188-94, Jun 1 2010.
- DEGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; RAJAIAN, H.; SAJEDIANFARD, J.; PARTO, P. Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom. *Toxicon*, v. 54, n. 6, p. 881-886, 2009.
- DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *Comptes Rendus Biologies*, v. 329, n. 7, p. 483-493, 2006.
- DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M. P.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J. L.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. *Toxicon*, v. 58, n. 2, p. 147-153, 2011.
- DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical science*, v. 104, n. 1, p. 27-38, 2003.
- DUNCAN, W. L. P.; FERNANDES, M. N. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 5, n. 3, p. 454-464, 2010.
- DUNCAN, W. L. P.; INOMATA, S. O.; FERNANDES, M. N. Comércio de arraias de água doce na região do Médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010.
- ERICSSON, C. D.; HATZ, C.; JUNGHANSS, T.; BODIO, M. Medically Important Venomous Animals: Biology, Prevention, First Aid, and Clinical Management. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 10, p. 1309-1317, November 15 2006.

EVANS, R. J.; DAVIES, R. S. Stingray injury. *Journal of Accident & Emergency Medicine*, v. 13, n. 3, p. 224-225, 1996.

FENNER, P. J.; WILLIAMSON, J. A.; SKINNER, R. A. Fatal and non-fatal stingray envenomation. *Medical journal of Australia*, v. 151, n. 11-12, p. 621-625, 1989.

FORRESTER, M. B. Pattern of stingray injuries reported to Texas poison centers from 1998 to 2004. *Human & Experimental Toxicology*, v. 24, n. 12, p. 639-642, December 1, 2005 2005.

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

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Ocorrência de arraias fluviais (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do baixo Paranapanema, Sudeste do Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, n. 88, p. 10-11, 2007.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Acidentes por raias. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR., V. (Ed.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2nd. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2009. cap. 30, p.295-313.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 82-88, 2010.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V.; VILELA, M. J. A.; UIEDA, V. S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. *Biota Neotropica*, v. 7, p. 0-0, 2007.

GERST, J. W.; THORSON, T. B. Effects of saline acclimation on plasma electrolytes, urea excretion, and hepatic urea biosynthesis in a freshwater stingray, *Potamotrygon* sp. Garman, 1877. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 56, n. 1, p. 87-93, 1977.

GUNDERSEN, H. J. G.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well! *Journal of microscopy*, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

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

HADDAD JR., V. Ocorrência de arraias da família Potamotrygonidae no rio Paraná e relato da presença no rio Tietê: resultados preliminares. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, n. 78, p. 3, 2005.

HADDAD JR., V. Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico. 2ª Ed. São Paulo: 2008.

HADDAD JR., V.; GARRONE NETO, D.; PAULA NETO, J. B.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*, v. 43, n. 3, p. 287-94, Mar 1 2004.

HALSTEAD, B. W. Venomous marine animals of Brazil. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 33, p. 1-25, 1966.

HALSTEAD, B. W. Poisonous and venomous marine animals of the world. 2nd. Princeton, New Jersey: The Darwin Press, 1988. 1168

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. 2nd. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010.

KIERNAN, J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice. 4th. U. K.: Scion - Bloxham, 2008.

KLESZIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus. *FEMS Microbiology Letters*, v. 288, n. 2, p. 216-220, 2008.

KOZLOV, S. A.; VASSILEVSKI, A. A.; FEOFANOV, A. V.; SUROVOY, A. Y.; KARPUNIN, D. V.; GRISHIN, E. V. Laticins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 30, p. 20983-20992, July 28, 2006 2006.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of structural biology*, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LALWANI, K. Animal toxins: Scorpaenidae and stingrays. *British Journal of Anaesthesia*, v. 75, n. 2, p. 247, 1995.

LIM, Y. L.; KUMARASINGHE, S. P. Cutaneous injuries from marine animals. *Singapore Medical Journal*, v. 48, n. 1, p. e25, 2007.

LIMA, J. M.; FREITAS, F. J. C.; AMORIM, R. N. L.; CÂMARA, A. C. L.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. *Toxicon*, v. 57, n. 1, p. 183-185, 2011.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*, v. 38, n. 8, p. 1149-1156, 2000.

- LOVEJOY, N. R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 117, n. 3, p. 207-257, 1996.
- LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 21, n. 1-2, p. 5-13, 2006.
- LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Marine incursion into South America. *nature*, v. 396, n. 6710, p. 421-422, 1998.
- 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*, v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006.
- MAGALHÃES, M. R.; DA SILVA JR, N. J.; ULHOA, C. J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon*, v. 51, n. 6, p. 1060-1067, 2008.
- MASSON, A. A.; ORMONDE DO CARMO, P. H. A.; CARVALHO, J. L. V. Rhabdomyolysis secondary to an accident with marine stingray (*Dasyatis* family). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 18, p. 344-348, 2012.
- MCEACHRAN, J. D.; ASCHLIMAN, N. Phylogeny of Batoidea. In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Biology of sharks and their relatives*. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 3, p.79-113.
- MEBS, D. Stechrochen-Vergiftungen Sting-ray injuries. *Dtsch Med Wochenschr*, v. 105, n. 37, p. 1289-1291, 1980.
- MEYER, P. K. Stingray injuries. *Wilderness & Environmental Medicine*, v. 8, n. 1, p. 24-28, 1997.
- MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; ISMAEL SILVA JR, P.; SOARES, A. B.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. *henlei*. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 9, p. 1368-1377, 2011.
- MORO, G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R. S. Aspectos da alimentação da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da bacia do rio Parnaíba, Nordeste do Brasil. *Revista Nordestina de Biologia*, v. 20, n. 2, p. 47-57, 2012a.
- MORO, G.; CHARVET-ALMEIDA, 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*, v. 72, n. 4, p. 885-891, 2012b.
- NELSON, J. S. *Fishes of the World*. 4th. New Jersey, USA: 2006. 601

NG, H. H.; TAN, H. H.; YEO, D. C. J.; NG, P. K. L. Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore. *Biological Invasions*, v. 12, n. 8, p. 2385-2388, 2010/08/01 2010.

PARDAL, P. P. O. Ictismo por arraia. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. D. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. A.; HADDAD JR., V. (Ed.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2^a. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 47, p.523-529.

PARDAL, P. P. O.; CARVALHO, L. O. S.; GOMES, F. P.; PEDROSA, G. J. Estudo de 246 acidentes por peixes entre os habitantes do município de Peixe-boi, Pará, Brasil. *Pará Médico*, v. 2, p. 6-10, 1993.

PARDAL, P. P. O.; GADELHA, M. A. C. Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas. 2nd. Belém, Pará: 2010. 48

PARDAL, P. P. O.; LOBO, M. H. L.; MENDES, C. W. C.; VIEIRA, V. F. Ictismo entre os pescadores de Icoaraci, Pará. Resumos do XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1992. Belém, Pará. p.117.

PEDROSO, C. M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M. S.; HADDAD, V., JR.; BARBARO, K. C.; ANTONIAZZI, M. M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, v. 50, n. 5, p. 688-97, Oct 2007.

PIERINI, S. V.; WARRELL, D. A.; DE PAULO, A.; THEAKSTON, R. D. G. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and amazonian indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. *Toxicon*, v. 34, n. 2, p. 225-236, 1996.

RATHJEN, W. F.; HALSTEAD, B. W. Report on two fatalities due to stingrays. *Toxicon*, v. 6, n. 4, p. 301-302, 1969.

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

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

ROSA, R. S. *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 7, p. 425-437, 1990.

ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R.; WANDERLEY, C. A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 1-8, 2008.

ROSA, R. S.; CASTELLO, H. P.; THORSON, T. B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, p. 447-458, 1987.

- ROSA, R. S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C. C. D. Biology of the South American Potamotrygonid stingrays. In: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (Ed.). *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptative physiology and conservation*. 1st. United States: CRC Press, 2010. cap. 5, p.241-286.
- RUSSELL, F. E. Stingray injuries: a review and discussion of their treatment. *The American journal of the medical sciences*, v. 226, n. 6, p. 611, 1953.
- RUSSELL, F. E. Venom Poisoning. *Rational drug therapy*, v. 5, n. 8, p. 1-7, August 1971.
- RUSSELL, F. E.; HARREVELD, V. A. Cardiovascular effects of the venom of the round stingray, *Urobatis halleri*. *Archives internationales de physiologie et de biochimie*, v. 62, n. 3, p. 322, 1954.
- SÁ-OLIVEIRA, J. C.; COSTA, E. A.; PENA, F. P. S. Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. *Biota Amazônia*, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2011.
- SANTOS, E. *Nossos peixes marinhos: vida e costume dos peixes do Brasil*. 1^a Ed. Rio de Janeiro: 1952.
- SCHARF, M. J. Cutaneous injuries and envenomations from fish, sharks and rays. *Dermatologic Therapy*, v. 15, n. 1, p. 47-57, 2002.
- SCHIERA, A.; BATTIFOGLIO, M. L.; SCARABELLI, G.; CRIPPA, D. Stingray injury in a domestic aquarium. *International journal of dermatology*, v. 41, n. 1, p. 50-51, 2002.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J.; TANAKA, S. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 1, p. 189-196, 2012.
- SILVA, J. P. C. B.; CARVALHO, M. R. A new species of Neotropical freshwater stingray of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 from the Río Madre de Dios, Peru (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, v. 51, p. 139-154, 2011.
- SIOLI, H. Studies in Amazonian waters. In: (Ed.). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. Belém: CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, v.3, 1967. p.9-50.
- SIVAN, G.; VENKETASVARAN, K.; RADHAKRISHNAN, C. K. Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 914-925, 2010.
- SMITH, W. L.; WHEELER, W. C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. *Journal of Heredity*, v. 97, n. 3, p. 206-217, 2006.
- THORSON, T. B.; BROOKS, D. R.; MAYES, M. A. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Society Research Reports*, v. 15, p. 663-694, 1983.

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

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, n. 2, p. R345-R353, February 1, 2005 2005.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 298, n. 5, p. R1173-R1187, 2010.

TREBERG, J. R.; SPEERS-ROESCH, B.; PIERMARINI, P. M.; IP, Y. K.; BALLANTYNE, J. S.; DRIEDZIC, W. R. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, n. 5, p. 860-870, March 1, 2006 2006.

UZEL, A. P.; MASSICOT, R.; JEAN, M. Stingray injury to the ankle. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, v. 12, n. 2, p. 115-116, 2002.

VAN OFFEL, J. F.; STEVENS, W. J. A stingray injury in a devotee of aquarium fishes. *Acta Clinica Belgica*, v. 55, n. 3, p. 174-175, 2000.

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

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

WOURMS, J. P.; GROVE, B. D.; LOMBARDI, J. The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, v.11B, 1988. p.1-134.

ZHAO, X.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 32, n. 5, p. 500-508, 2008.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 070/2012- CEEA, sobre “Propriedades Biológicas do veneno da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae)” sob responsabilidade de **Wallice Luiz Paxiúba Duncan**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de 18/05/2012.

Manaus, 12 de junho de 2012

Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEA-UFAM



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 22055-2	Data da Emissão: 08/12/2010 11:13
Dados do titular	
Nome: WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	CPF: 304.905.962-15
Título do Projeto: Rio Amazonas: barreira ou filtro zoogeográfico para dispersão das arraias de água doce (Potamotrygonidae)? Um estudo Ecofisiológico	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura, coleta e transporte- Barcelos/Manaus	11/2010	04/2011
2	Transporte-Manaus/São Carlos/Manaus	11/2010	12/2011
3	Captura, coleta e transporte-Parintins e Santarem	05/2011	08/2011
4	Captura, coleta e transporte-Santarem/Itaituba	05/2011	11/2011
5	Captura, coleta e transporte-Colares/Manaus	07/2011	12/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente a o previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Thais de Almeida Corrêa Nogueira	Bolsista-Coletora	522.601.432-53	-AM	Brasileira
2	OSCAR TADEU FERREIRA DA COSTA	Pesquisador	308.952.602-63	06764355 SESEG-AM-AM	Brasileira
3	Maria Lúcia Góes de Araújo	Pesquisadora	276.286.205-15	678495 SSP-SE	Brasileira
4	Tayrine Pascholetti Benze	Bolsista	321.613.438-58	43.966.593-0 SSP-SP	Brasileira
5	Diogo Magalhães Costa	Bolsista	927.042.122-87	1240366441 MDEB-AM	Brasileira
6	Sandrelly Oliveira Inomata	Bolsista	779.966.742-72	18118399 SSP-AM	Brasileira
7	Camila Goncharov de Souza	Bolsista	015.665.192-09	-	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BARCELOS	AM	Manuá	Fora de UC
2	MANAUS	AM	Anavilhanas	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49487349





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 22055-2	Data da Emissão: 08/12/2010 11:13
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	CPF: 304.905.962-15
Título do Projeto: Rio Amazonas: barreira ou filtro zoogeográfico para dispersão das arraias de água doce (Potamotrygonidae)? Um estudo Ecofisiológico	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

3	PARINTINS	AM	Parintins	Fora de UC
4	SANTAREM	PA	Alter do Chão	Fora de UC
5	COLARES	PA	Humaitá	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Plesiopygion iwamae, Potamotrygon hystrix, Potamotrygon henlei, Paratrygon aereba, Potamotrygon scobina, Potamotrygon leopoldi, Potamotrygon motoro, Potamotrygon orbgnyi, Potamotrygon schroederi, Potamotrygon laticeps
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Plesiopygion iwamae, Potamotrygon hystrix, Potamotrygon henlei, Paratrygon aereba, Potamotrygon laticeps, Potamotrygon scobina, Potamotrygon schroederi, Potamotrygon orbgnyi, Potamotrygon motoro, Potamotrygon leopoldi
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Paratrygon aereba (*Qtde: 20), Potamotrygon henlei (*Qtde: 20), Potamotrygon hystrix (*Qtde: 20), Plesiopygion iwamae (*Qtde: 20), Potamotrygon scobina (*Qtde: 20), Potamotrygon orbgnyi (*Qtde: 20), Potamotrygon motoro (*Qtde: 20), Potamotrygon leopoldi (*Qtde: 20), Potamotrygon laticeps (*Qtde: 20), Potamotrygon schroederi (*Qtde: 20)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Outros petrechos (Rapichés, arasto, puçá)
---	-----------------------------------	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa
2	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Laboratório de Microscopia/Citologia

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49487349



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 22055-2	Data da Emissão: 08/12/2010 11:13
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	CPF: 304.905.962-15
Título do Projeto: Rio Amazonas: barreira ou filtro zoogeográfico para dispersão das arraias de água doce (Potamotrygonidae)? Um estudo Ecofisiológico	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 49487349



Página 3/3



CARTA DE ACEITE

Eu, como membro da banca de defesa de dissertação/tese, declaro, para os devidos fins, que a revisão intitulada **ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): BIOLOGIA, VENENO E ACIDENTES**, no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, na área de concentração em Ciências Biológicas, foi avaliada por mim. Portanto, recomendo a sua publicação na Revista *Scientia Amazonia*.

Atenciosamente,
