



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

JULIANA LUIZA VARJÃO LAMEIRAS

**PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE PARA *Potamotrygon motoro* Müller & Henle,
1841 (CHONDRICHTHYES – POTAMOTRYGONINAE): VERIFICAÇÃO DA
REAÇÃO-CRUZADA FRENTE ÀS PEÇONHAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE
ARRAIAS E DA NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES EDEMATOGÊNICA E
MIOTÓXICA**

Manaus

2018

JULIANA LUIZA VARJÃO LAMEIRAS

PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE PARA *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (CHONDRICHTHYES – POTAMOTRYGONINAE): VERIFICAÇÃO DA REAÇÃO-CRUZADA FRENTE ÀS PEÇONHAS DE OUTRAS ESPÉCIES DE ARRAIAS E DA NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES EDEMATOGÊNICA E MIOTÓXICA

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Doutora pelo Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia para Saúde.

Orientadora: Professora Dra. Maria Cristina dos Santos – UFAM

Coorientador: Professor Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa – UFAM

Manaus

2018

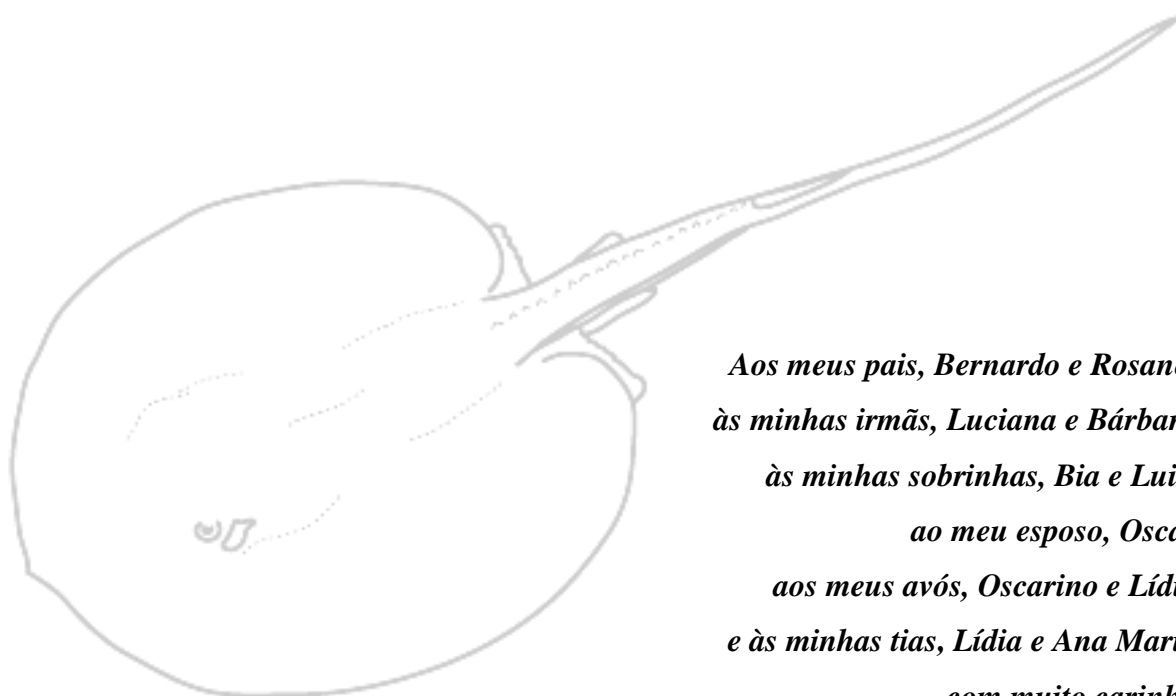
Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L228p Lameiras, Juliana Luiza Varjão
Produção de soro hiperimune para *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes – Potamotrygoninae): verificação da reação-cruzada frente às peçonhas de outras espécies de arraias e da neutralização das atividades edematogênica e miotóxica / Juliana Luiza Varjão Lameiras. 2018
96 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Cristina dos Santos
Coorientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Potamotrygonídeos. 2. ferrão. 3. envenenamentos. 4. antiveneno. 5. soroneutralização. I. Santos, Maria Cristina dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



*Aos meus pais, Bernardo e Rosanei,
às minhas irmãs, Luciana e Bárbara,
às minhas sobrinhas, Bia e Luiza
ao meu esposo, Oscar,
aos meus avós, Oscarino e Lídia,
e às minhas tias, Lídia e Ana Maria,
com muito carinho.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora e ‘Mãe Científica’ Professora Doutora Maria Cristina dos Santos, por todo o conhecimento e apoio e por ter um papel fundamental na minha formação profissional e pessoal. Agradeço pela paciência, pelos esclarecimentos nos meus momentos de dúvida e por ter confiado a mim a realização deste projeto.
- Ao Coordenador Técnico Leonardo Matos e às técnicas Andressa Encarnação e Tania Sumita do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela apoio técnico recebido no cuidado com os animais dos experimentos.
- À valiosa assistência técnica da Sra. Erilene Carmo dos Santos a ao colega Evandro Pessoa nos protocolos histológicos.
- À Professora Doutora Michella Lasmar, ao Doutor Allyson Guimarães, à Mestra Cacilda Satomi Yano e ao Professor Doutor Paulo Nogueira pelas valiosas contribuições.
- Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica, Rafael Sousa e Luana Santana pela ajuda em todos os momentos.
- Às amigas Valéria Mourão, Carolina Scheffer, Ilia Gilmará e Thaís Pereira pela carinho e apoio. É muito bom ter a amizade de vocês!
- Aos meus pais e melhores amigos, Bernardo Lameiras e Rosane Varjão, que sempre estiveram ao meu lado.
- Às minhas tias, Lídia Lameiras e Ana Maria Lameiras, que sempre me incentivaram a estudar e que nunca me deixaram desistir.
- E, finalmente, agradeço ao meu esposo, Professor Doutor Oscar Costa, pela carinho, compreensão, dedicação, paciência, enfim, por tudo. Agradeço a ele, que me acompanhou nas coletas, nos experimentos e me apoiou tantas vezes, discutiu meus resultados comigo, ouviu minhas indagações e me ajudou tanto. Muito obrigada, meu amor!

RESUMO

Arraias pertencentes à subfamília Potamotrygoninae são peixes cartilaginosos que ocorrem nas bacias hidrográficas da América do Sul. Esses animais são providos de ferrões na base da cauda, próprios para a sua defesa. O ferrão é coberto por uma bainha tegumentar contendo glândulas mucosas e de veneno. As vítimas costumam sofrer envenenamentos por arraias geralmente quando pisam no dorso do animal, escondido sob a areia, na beira da praia. Por consequência, a arraia movimenta a cauda abruptamente e introduz o ferrão no indivíduo, causando uma laceração extremamente dolorida, que geralmente leva à necrose do tecido. Os acidentes costumam ocorrer em lugares distantes, isolados, geralmente sem atendimento médico adequado e, portanto, quase sempre não são notificados. Não há uma terapia definida e eficaz para os envenenamentos por arraias e os profissionais de saúde geralmente não recebem treinamento adequado para cuidar deste tipo de acidente. O tratamento é baseado no uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos, pois ainda não existe antídoto específico. Embora os procedimentos médicos sejam capazes de controlar o quadro clínico dos pacientes, a neutralização das toxinas seria a conduta ideal para impedir a indução dos sinais e sintomas apresentados nos envenenamentos por arraias de água doce. No intuito de obter um imunobiológico capaz de neutralizar as principais atividades apresentadas pelas vítimas, o presente estudo teve por objetivo analisar a neutralização, por soros hiperimunes, das atividades edematogênica e miotóxica induzidas pela peçonha da arraia *Potamotrygon motoro*. Os soros foram obtidos em camundongos Balb/c por meio de imunização intradérmica usando-se ou o extrato do dorso ou do ferrão de *P. motoro* adsorvidos em adjuvante hidróxido de alumínio. Por análise de Dot-ELISA e Western Blot, foi possível verificar que o extrato do dorso foi tão imunogênico quanto o extrato do ferrão, induzindo a altos títulos de anticorpos, que reagiram com antígenos homólogos (da mesma espécie) e heterólogos (extrato do dorso ou do ferrão das espécies *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon schroederi*, todas de água doce), indicando que ambos os tipos de extrato poderiam ser usados na produção de antiveneno para tratar vítimas de envenenamento por arraias de água doce. A partir daí, foi verificado o poder dos soros hiperimunes em neutralizar, in vivo, as atividades edematogênica e miotóxica induzidas pelo extrato do ferrão de *P. motoro* por meio de dois protocolos: soroneutralização e vacinação. O primeiro consistiu em injetar a peçonha no músculo gastrocnêmio de camundongos Balb/c, e, em seguida, administrar ou o soro antidorso ou o soro antiferrão via plexo venoso oftálmico. Já, o segundo consistiu em imunizar os camundongos com o extrato do dorso ou do ferrão adsorvidos em hidróxido de alumínio e desafiá-los com a peçonha do ferrão via intramuscular. Os gastrocnêmios foram removidos para análise histopatológica e esterológica e o sangue, coletado via plexo venoso oftálmico para dosagem de citocinas, PCR e CK. Os soros antidorso e antiferrão não neutralizaram a atividade edematogênica, mas os protocolos de soroneutralização e vacinação neutralizaram parcialmente o dano tecidual induzido pela peçonha do ferrão. A rabdomiólise sistêmica só foi neutralizada 100% nos animais vacinados com o extrato do ferrão. A análise das citocinas indicou que o protocolo de soroneutralização induziu a liberação de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, enquanto o protocolo de vacinação induziu à uma resposta Th1. Os resultados indicam que o extrato do dorso pode ser usado como alternativa ao extrato do ferrão (ou em conjunto) na produção de imunobiológicos nos tratamentos por envenenamentos de arraias de água doce.

Palavras-chave: Potamotrygonídeos; ferrão; envenenamentos; antiveneno; soroneutralização.

ABSTRACT

Stingray, belonging to the Potamotrygoninae subfamily are cartilaginous fish which are found in the watersheds of South America. These animals are provided with stingers at the base of the tail, suitable for their defense. The sting is covered by a tegument sheath containing mucous glands and venom. The victims often suffer poisonings by stingrays when they step on the animal's dorsum, hidden under the sand, on the edge of the beach. Consequently, the stingray moves tail abruptly and inserts the stinger on the victim, causing an extremely painful laceration, which usually leads to tissue necrosis. Accidents usually occur in distant and isolated places, usually without adequate medical care, so they are almost always not notified. There is no defined and effective therapy for these poisoning and health professionals not received adequate training to control this type of accident. The treatment is based on the use of analgesics, anti-inflammatories and antibiotics, as there is no specific antidote. Although medical procedures are able to control the clinical status of patients, the neutralization of toxins would be the ideal conduit to prevent the induction of signs and symptoms of poisoning by freshwater stingrays. In order to obtain an immunobiological able to neutralize the main effects induced by the poison, the present study aimed to analyze the neutralization, by hyperimmune sera, of the edematogenic and myotoxic activities induced by the poison of *Potamotrygon motoro*. Serums were obtained in Balb/c mice by means of intradermal immunization using either the dorsal extract or stinger extract of *P. motoro* adsorbed on aluminum hydroxide adjuvant. By Dot-ELISA and Western Blot analysis, it was possible to verify that the dorsal extract was as immunogenic as the stinger extract, inducing high titers of antibodies, which reacted with homologous (of the same species) and heterologous antigens (dorsum and stinger extracts from the species *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi* and *Potamotrygon schroederi*, all of freshwater), indicating that both types of extracts could be used in the production of antivenom to treat victims of poisoning by freshwater stingrays. From there, the power of the hyperimmune sera was verified in neutralizing, in vivo, the edematogenic and myotoxic activities induced by the stinger extract of *P. motoro* through two protocols: serum neutralization and vaccination. The first consisted of injecting the venom into the gastrocnemius muscle of Balb/c mice, and then administering either the antidorsal serum or the antistinger serum via ophthalmic venous plexus. The second one consisted in immunizing the mice with the dorsal or stinger extract adsorbed on aluminum hydroxide and challenging them with the venom of the stinger intramuscularly. The gastrocnemius were removed for histopathological and stereological analysis and blood was collected via the ophthalmic venous plexus for cytokine, CRP and CK dosing. Antidorsal and antistinger sera did not neutralize the edematogenic activity, but the serum neutralization and vaccination protocols partially neutralized the tissue damage induced by the stinger venom. Systemic rhabdomyolysis was only neutralized 100% in the animals vaccinated with the stinger extract. Cytokine analysis indicated that the serum neutralization protocol induced the release of cytokines from the Th1, Th2, Th17 and Treg profiles, while the vaccination protocol induced a Th1 response. The results indicate that the dorsal extract can be used as an alternative to the stinger extract (or together) in the production of immunobiologicals in treatments for freshwater poisoning.

Keywords: Potamotrygonins; sting; poisoning; antivenom; serum neutralization.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Artigo de revisão de acordo com as normas da revista científica *Toxicon* (ISSN: 0041-0101), que será submetido à publicação após sugestões da banca e tradução para a língua inglesa, título ‘Arraias de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygoninae): biologia, aspectos gerais e envenenamentos’2

1. Introdução.....	5
2. Metodologia.....	5
3. Arraias de água doce: biodiversidade, distribuição geográfica e aspectos gerais.....	5
4. Ferrão, peçonha e muco.....	17
5. Envenenamentos por arraias de água doce: mecanismos de intoxicação e manifestações clínicas.....	20
6. Epidemiologia.....	22
7. Tratamento.....	25
8. Produção de antiveneno.....	26
9. Considerações finais.....	27
Agradecimentos.....	28
Conflito de interesses.....	28
Referências bibliográficas.....	28

CAPÍTULO II – Artigo de pesquisa publicado na revista científica *Toxin Reviews* (ISSN: 1556-9551) sob o título ‘Cross-reactivity between *Potamotrygon motoro* antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin’.....36

Introduction.....	36
Material and methods.....	37
Collection and preparation of the venoms.....	37
Preparation of the antivenoms.....	38
Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	39
Zymography.....	39
Detection of cross-reactivity by Western Blot.....	39
Antibody titration by Dot-ELISA.....	39
Results.....	39
Protein and enzyme profiles.....	39

Cross reactivity.....	41
Titration of antibodies in APmD and APmS.....	41
Discussion.....	41
Acknowledgements.....	43
Disclosure statement.....	44
Funding.....	44
ORCID.....	44
References.....	44

CAPÍTULO III – Artigo de pesquisa de acordo com as normas da revista científica Toxicon (ISSN: 0041-0101), que será submetido à publicação após sugestões da banca e tradução para a língua inglesa, título ‘Neutralização das atividades edematogênica e miotóxica, induzidas pela peçonha de *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes – Potamotrygoninae), por soros hiperimunes experimentais’.....

1. Introdução.....	47
2. Material e métodos.....	49
2.1 Coleta e preparo dos venenos.....	49
2.2 Animais dos experimentos.....	50
2.3 Obtenção dos antivenenos.....	50
2.4 Cinética da formação do edema e obtenção da dose mínima edematogênica (DME)	50
2.5 Neutralização da atividade edematogênica.....	51
2.6 Neutralização da atividade miotóxica.....	51
2.6.1 Densidade de volume (volume relativo, Vv) – análise histopatológica e estereológica.....	52
2.6.2 Análises bioquímicas e dosagem de citocinas.....	54
2.7 Análise estatística.....	54
3. Resultados.....	55
3.1 Titulação dos soros antidorso e antiferrão.....	55
3.2 Cinética e neutralização da atividade edematogênica.....	55
3.3 Neutralização da miotoxidade: análise qualitativa.....	56
3.4 Neutralização da miotoxidade: análise quantitativa.....	59
3.5 Análises bioquímicas.....	63
3.6 Citocinas.....	63

3.7 Análise dos componentes principais (PCA)	65
4. Discussão	69
Agradecimentos	74
Referências bibliográficas	75
ANEXOS	80
1. Parecer consubstanciado sobre protocolos de pesquisas no uso de animais emitido pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, no 018/2014	81
2. Autorização emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), protocolo nº 45289-2 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)	82

CAPÍTULO I

Artigo de pesquisa de acordo com as normas da revista científica Toxicon (ISSN: 0041-0101), que será submetido à publicação após sugestões da banca e tradução para a língua inglesa.

Arraias de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygoninae): biologia, aspectos gerais e envenenamentos

Juliana Luiza Varjão Lameiras^{a, c*}, Oscar Tadeu Ferreira da Costa^b, Maria Cristina Dos-Santos^c

^a *Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.*

^b *Laboratório de Microscopia Quantitativa, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.*

^c *Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.*

* *Corresponding Author: +55 92 98242-3066. E-mail: julameiras@hotmail.com.*

Resumo

Esta é uma revisão sobre as arraias de água doce, com ênfase em sua biologia, biodiversidade e os envenenamentos por elas causados. Para a elaboração do artigo, foi realizada uma busca nos portais Periódicos CAPES, ScienceDirect, Scielo, Pubmed e Google Acadêmico. Foram consideradas 340 publicações, de 1952 a 2017, das quais 105 foram usadas como referência bibliográfica para esta revisão. Arraias da subfamília Potamotrygoninae são peixes cartilaginosos que ocorrem nas bacias hidrográficas da América do Sul. São providos de ferrões na base da cauda próprios para a defesa do animal. O ferrão é coberto por epitélio contendo glândulas mucosas e de veneno. Humanos costumam sofrer envenenamentos por arraias geralmente quando pisam no dorso do animal, escondido sob a areia. Por consequência, a arraia introduz o ferrão na vítima, causando um ferimento extremamente dolorido, que geralmente leva à necrose do tecido. Os envenenamentos costumam ocorrer em lugares distantes, isolados, geralmente sem atendimento médico adequado e, portanto, não são notificados. O tratamento médico é baseado no uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos, pois ainda não existe antídoto específico para os envenenamentos. Pelo exposto, autoridades de saúde pública devem planejar ações que focalizem o tratamento e a notificação epidemiológica deste tipo de envenenamento e, assim, justificar e estimular os órgãos competentes a desenvolverem ações de educação ambiental, qualificação adequada dos profissionais de saúde no tratamento dos acidentados e estudos que viabilizem a produção de soroterapia específica.

Palavras-chave: Potamotrygonídeos; *Potamotrygon*; peçonha; veneno; ferrão; envenenamentos.

1. Introdução

Os animais aquáticos de maior importância médica são os peixes (FUNASA, 2001). Dentre os principais peixes peçonhentos estão as arraias, que apesar de não serem agressivas, causam um grande número de envenenamentos nas regiões que habitam (Halstead, 1966; Ericsson et al., 2006; Magalhães et al., 2008). As arraias peçonhentas pertencem à Classe Chondrichthyes (peixes cartilagosos), ordem Myliobatiformes (Nelson et al., 2016), sendo a única ordem de arraias providas de ferrões na cauda, como mostrado na Figura 1 (Lovejoy, 1996; McEachran and Aschliman, 2004). Possuem o corpo achatado dorso-ventralmente, com os olhos e os espiráculos situados na região dorsal (Figura 2), e os cinco pares de fendas branquiais e as nadadeiras pélvicas localizadas na parte ventral (Figura 3).



Figura 1. Ferrão caudal da arraia de água doce *Potamotrygon orbignyi*. Foto: Wallace Duncan.



Figura 2. Exemplar de *Potamotrygon wallacei*, exibindo o espiráculo um pouco abaixo do olho. Foto: Juliana Lameiras.



Figura 3. Exemplar de fêmea de *Paratrygon aiereba*, com a parte ventral exposta, exibindo os cinco pares de fendas branquiais e as nadadeiras pélvicas. Foto: Juliana Lameiras.

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 marinhas (Figura 4) estão distribuídas por toda a costa do Oceano Atlântico, e as espécies de água doce (potamotrygoníneos) estão presentes principalmente nos rios das regiões Norte, Centro-Oeste, Sul, Sudeste (Carvalho et al., 2003) e Nordeste (Rosa et al., 2010; Rosa and Lasso, 2013).



Figura 4. Exemplares de arraias marinhas do gênero *Hypanus* encontradas do litoral brasileiro. Foto: Juliana Lameiras.

Enquanto há muitos trabalhos caracterizando as atividades biológicas de toxinas de animais terrestres, ainda há poucos dados sobre os envenenamentos causados por arraias (Conceição et al., 2006; Magalhães et al., 2006; Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Ziegman and Alewood, 2015), especialmente em relação às espécies dulcícolas, que causam inúmeros envenenamentos na América do Sul (Silva-Jr. et al., 2015), principalmente na região Amazônica (Abati et al., 2017). Sendo assim, a presente revisão teve por objetivo elucidar os envenenamentos causados pelas arraias de água doce (subfamília Potamotrygoninae), destacando a biodiversidade das espécies e enfatizando os mecanismos de intoxicação,

manifestações clínicas, tratamento, epidemiologia e os mais recentes avanços e estudos científicos relacionados ao assunto.

2. Metodologia

Para a elaboração deste artigo de revisão, foi realizada uma busca de referências nos portais Periódicos CAPES, ScienceDirect, Scielo, Pubmed e Google Acadêmico, utilizando-se as seguintes palavras-chave: Potamotrygonidae, *Potamotrygon*, ‘freshwater stingrays’, ‘stingray envenomations’, ‘stingray accidents’, ‘stingray venom’, ‘stingray poisoning’ e ‘stingray antivenom’. Nesta busca foram consideradas 340 publicações, do período de 1952 a 2017, das quais 105 foram usadas como referência bibliográfica para esta revisão.

3. Arraias de água doce: biodiversidade, distribuição geográfica e aspectos gerais

Arraias 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 and Carvalho, 2011). Atualmente, a família está dividida em duas subfamílias (Figura 5): Styracurinae, subfamília marinha com duas espécies válidas (Carvalho et al., 2016), e Potamotrygoninae, subfamília exclusivamente de água doce, com 32 espécies válidas, distribuídas nos gêneros *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon* (Carvalho, 2016). A Figura 6 representa a atual distribuição geográfica dos potamotrygonídeos.

Heliotrygon (Figura 7) é conhecida por ‘arraia China’ ou ‘arraia redonda’, pois possui o corpo bem circular em comparação aos outros gêneros, que possuem o corpo mais oval. Seu ferrão é extremamente reduzido. Atingem até 60 cm de largura de disco. É uma importante espécie de peixe ornamental. Ocorre no Rio Amazonas e seus tributários (Carvalho and Lovejoy, 2011; Carvalho, 2016).

Em *Paratrygon* (Figura 8), 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). Indivíduos adultos podem atingir até 160 cm de largura do disco e pesar até 110 kg (Carvalho, 2016). Ocorre no norte da Bolívia, leste do Peru e do 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).

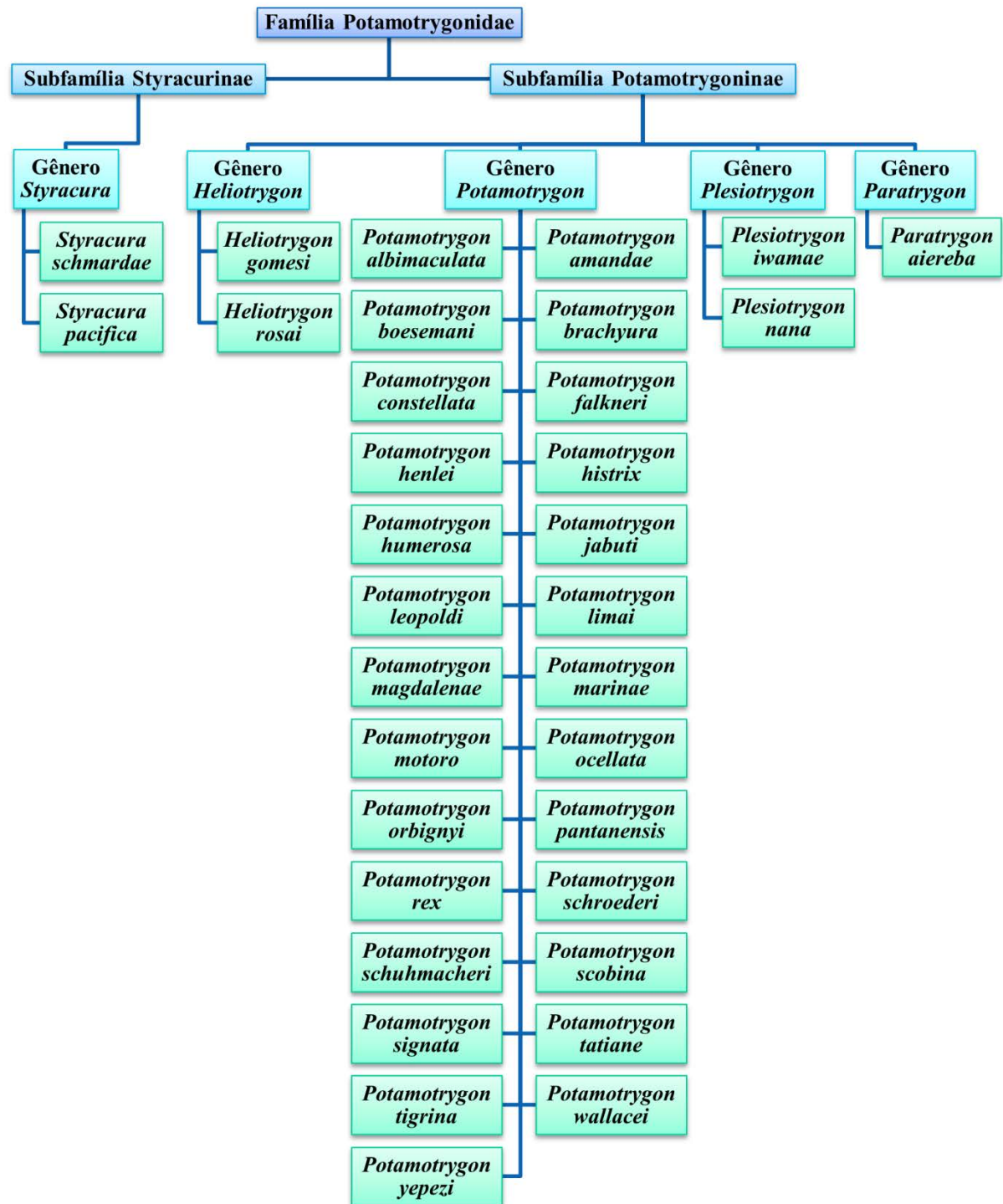


Figura 5. Atual classificação da Família Potamotrygonidae, segundo Carvalho (2016).

Plesiotrygon (Figura 9) é popularmente conhecida como ‘arraia-chicote’, devido à longa cauda, com ferrões em posição mediana (Rosa et al., 1987). Podem atingir até 65 cm de largura do disco (137 cm de comprimento total) e pesar até 15 kg (Carvalho, 2016). 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).

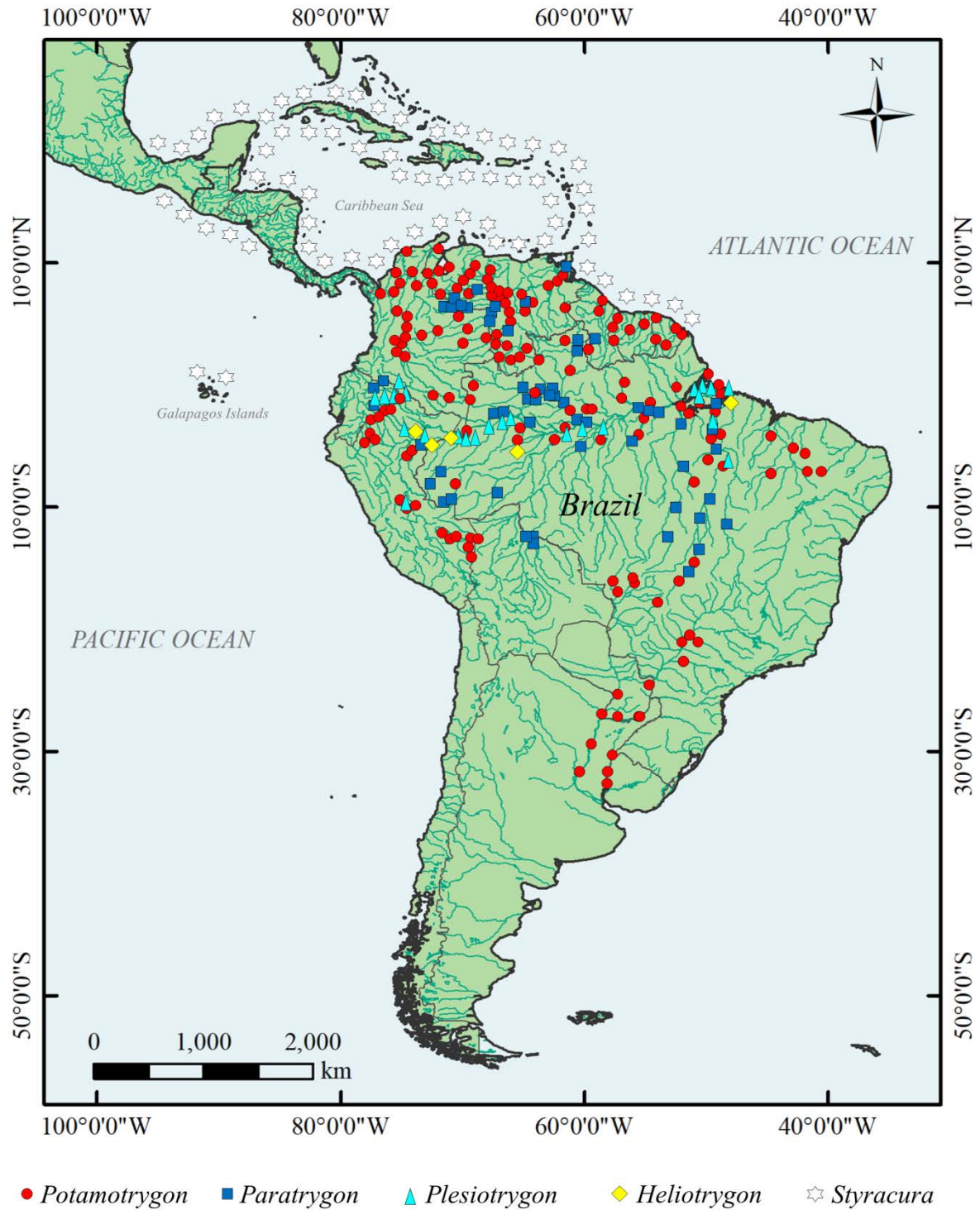


Figura 6. Atual distribuição geográfica da família Potamotrygonidae. Mapa elaborado pelo MSc. Erlane da Cunha.

Potamotrygon é o gênero mais diverso, atualmente com 27 espécies válidas (Carvalho, 2016). Apresenta cauda moderadamente robusta e curta, geralmente mais curta que o comprimento do disco, com ferrões na porção mediodistal (Carvalho et al., 2003). O tamanho das espécies pode variar de 16 (*P. wallacei*) a 150 cm de largura do disco (*Potamotrygon*

brachyura) (Carvalho, 2016). 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), bacia do Paraná-Paraguai (Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai) (Rosa et al., 2010) e na bacia do Parnaíba (Ramos et al., 2014). Espécies como *Potamotrygon albimaculata* (Figura 10a) e *Potamotrygon jabuti* (Figura 10b) ocorrem em rios de águas claras como o Tapajós (Figura 11b) (Carvalho, 2016). Já espécies como *Potamotrygon schroederi* (Figura 10e) e *P. wallacei*, conhecida por arraia cururu (Figura 10f) são endêmicas do Rio Negro (Figura 11c), enquanto *Potamotrygon motoro* (Figura 10c) e *Potamotrygon orbignyi* (Figura 10d) têm ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas nas águas do Rio Amazonas, na foz do Rio Tocantins e no Arquipélago de Mariuá, no Rio Negro (Duncan and Fernandes, 2010; Rosa et al., 2010).



Figura 7. Exemplar de *Heliotrygon gomesi*. Foto: Akemi Shibuya.



Figura 8. Exemplar de *Paratrygon aiereba*. Foto: Juliana Lameiras.



Figura 9. Exemplar de *Plesiotrygon iwamae*. Foto: Akemi Shibuya.

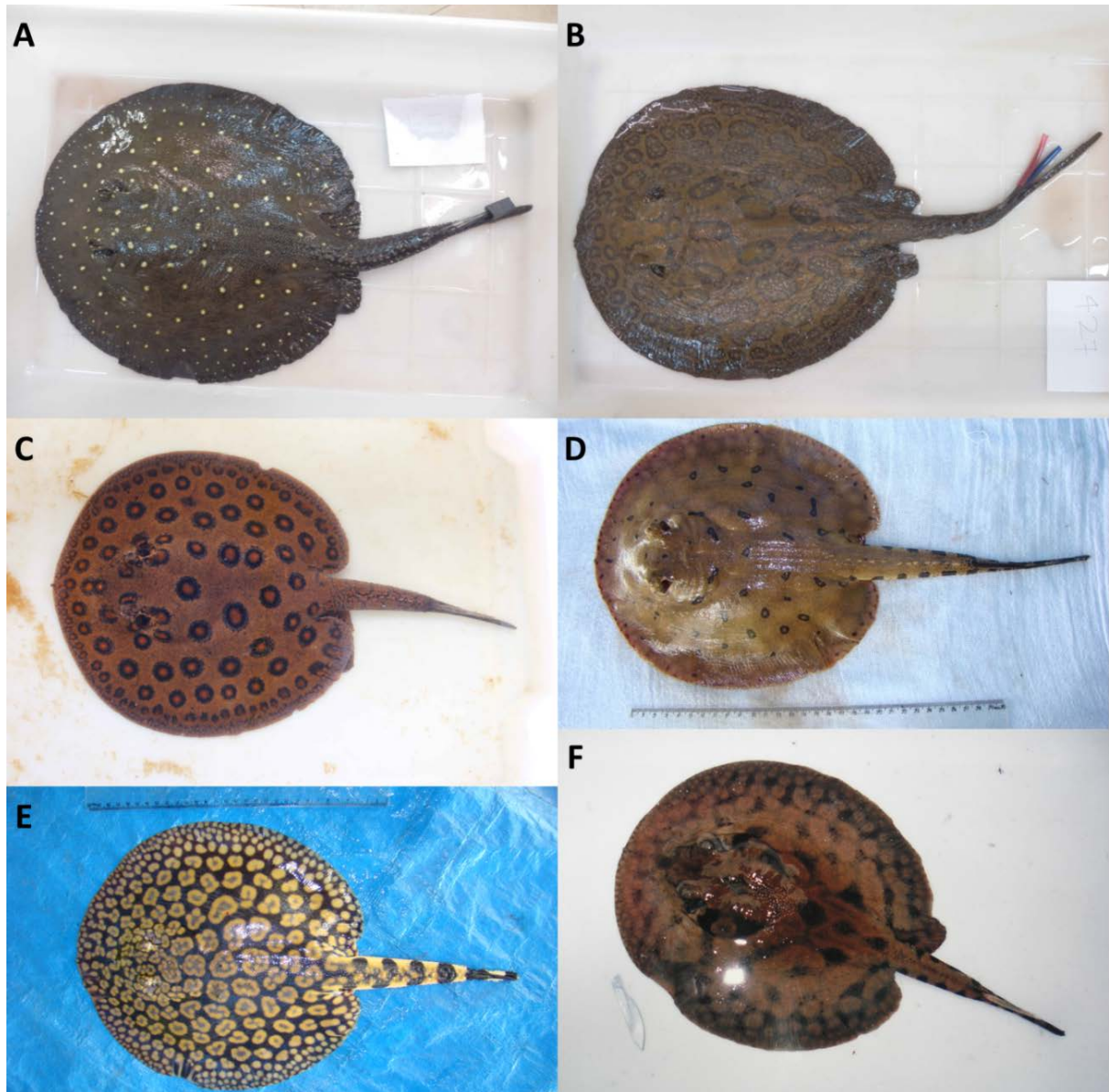


Figura 10. Exemplos de arraias do gênero *Potamotrygon*. A. *Potamotrygon albimaculata*. B. *Potamotrygon jabuti*. C. *P. motoro*. D. *Potamotrygon orbignyi*. E. *Potamotrygon schroederi*. F. *P. wallacei*. Fotos A, B e C: Akemi Shibuya. Fotos C, D e E: Wallace Duncan.

Diferente de qualquer outra família viva de arraias, as espécies de água doce se diversificaram nas bacias hidrográficas da América do Sul (Thorson et al., 1983; Lovejoy, 1996; Carvalho et al., 2004; Silva and Carvalho, 2011) provavelmente a partir do gênero *Styracura* (grupo irmão) durante as incursões marinhas do Mioceno, há aproximadamente 20 milhões de anos atrás (Lovejoy et al., 1998; Lovejoy et al., 2006; Carvalho et al., 2016).

Na Bacia Amazônica, as arraias são encontradas em todos os tipos de rio (Sioli, 1967), incluindo rios de água branca, rica em sedimentos (Figura 11A), água clara, pobre em sedimento (Figura 11B), e água preta (Figuras 11C), rica em ácidos húmicos (Duncan and Fernandes, 2010; Rosa et al., 2010). Podem viver em habitats lênticos, como lagos e igapós

(Figuras 11D e E), e lóticos, incluindo fortes correntezas (Almeida et al., 2008; Almeida et al., 2009) e até mesmo próximo de cachoeiras e corredeiras (Figuras 11F), nos mais diversos substratos, como fundos arenosos, lodosos e rochosos, como na Figura 12 (Rosa et al., 2010). Alimentam-se principalmente de pequenos invertebrados (incluindo larvas de insetos, anelídeos, moluscos e crustáceos), peixes ósseos e até mesmo de bagres (Shibuya et al., 2012; Shibuya et al., 2016).

As arraia de água doce são um grupo monofilético, compartilhando especializações morfofisiológicas 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 (Rosa et al., 1987; Carvalho et al., 2003; Fontenelle and Carvalho, 2017). São animais estenoalinos e hiperosmóticos em relação ao ambiente (Treberg et al., 2006) e apresentam mecanismos osmo-ionorregulatórios semelhantes aos dos teleósteos (Duncan, 2016). As brânquias possuem um eficiente sistema de transporte ativo de sais para a corrente sanguínea. Além disso, estes animais têm mecanismos para reduzir a perda de sais para o ambiente, incluindo um sistema de reabsorção de eletrólitos pelos rins. Tais características podem ter sido importantes para a evolução e tolerância dos potamotrygoníneos ao ambiente de água doce (Duncan, 2016).

As arraia de água doce são vivíparas aplacentárias (Figura 13) (Thorson et al., 1983; Garrone Neto, 2010). Os embriões são nutridos por uma secreção rica em lipídeos produzida pela mucosa viliforme do útero materno (trophonemata), caracterizando o modo reprodutivo como viviparidade matotrófica (Wourms et al., 1988). A gestação pode variar de 3 a 9 meses, dependendo da espécie. As fêmeas geralmente são maiores que os machos e o ciclo reprodutivo parece estar relacionado com o ciclo hidrológico (Araújo et al., 2004; Charvet-Almeida et al., 2005; Garrone Neto, 2010). Assim como as espécies marinhas, as arraia de água doce apresentam baixa fecundidade, maturação sexual tardia e crescimento lento, fazendo com que sejam mais susceptíveis a impactos ambientais (Carrier et al., 2004).

A maioria das arraia de água doce tem arranjos dorsais coloridos, incluindo ocelos, padrões reticulares e marcas vermiformes, que, geralmente, são espécie-específica (Thorson et al., 1983; Carvalho, 2016) e, por isso, algumas espécies são comercializadas como peixes ornamentais (Duncan et al., 2010), o que tem sido uma ameaça à preservação do grupo, uma vez que, em muitos casos, estes animais são capturados e exportados ilegalmente em condições precárias (enrolados em tubos de PVC, por exemplo), fazendo com que a arraia morra durante o transporte. Além disso, a permanência destes animais em cativeiro pode

torná-los susceptíveis à infecção pela enterobactéria *Citrobacter freundii*, como observado por Sun et al. (2018).

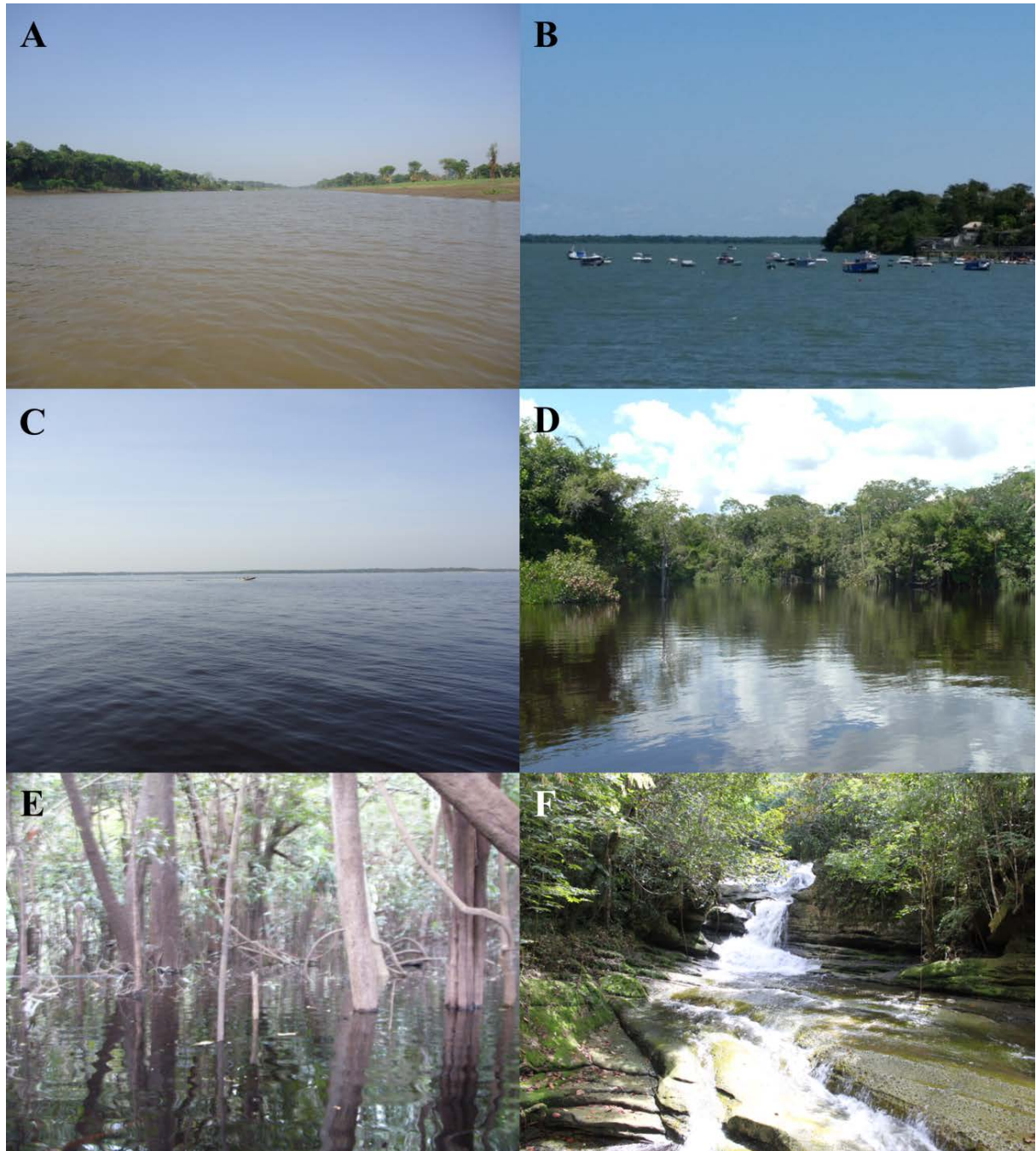


Figura 11. Diversos ambientes onde ocorrem arraías de água doce. A. Rio Solimões (água branca). B. Rio Tapajós (água clara). C e D. Rio Negro (água preta). E. Área de lago. F. Área de igapó. Fotos A e C: Juliana Lameiras. Foto B: Ilia dos Santos. Fotos D e E: Maria Lúcia Góes de Araújo. Foto F: Maria Cristina dos Santos.

Outras ameaças à conservação dos potamotrigoníneos são a deterioração e destruição dos seus habitats por dragagens, barragens e minas de ouro, a pesca de subsistência para fins alimentares, a pesca comercial como captura acessória, a pesca recreativa (ecoturismo) e a

pesca negativa, na qual o pescador, que captura o animal muitas vezes por engano, pensando em prevenir futuros envenenamentos, corta a cauda da arraia para devolvê-la ao rio sem o ferrão, como na Figura 14 (Araújo et al., 2004; Oliveira et al., 2015). Além disso, em mais da metade dos casos, os pescadores simplesmente sacrificam o animal sem motivo algum, o que já está refletindo no declínio de algumas populações de arraias, como, por exemplo, as da Bacia do Paraná (Lucifora et al., 2017). Neste contexto, é importante adotar medidas de educação ambiental com os pescadores para evitar a sobrepesca e dessa forma conservar as arraias de água doce (Oliveira et al., 2015).

Apesar de serem limitadas às bacias hidrográficas da América do Sul, já existe registro da arraia *P. motoro* fora de seu ambiente natural, ocorrendo no Alto do Reservatório Seletar, em Cingapura (Ng et al., 2010). Esta espécie foi introduzida neste local devido provavelmente 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, *P. motoro* tem potencial para ser uma espécie invasora (Charvet-Almeida et al., 2005; Martin, 2005). Aliás, um dos problemas adicionais para a questão dos envenenamentos por arraias de água doce é a importação maciça dessas espécies para a Europa, Japão, Tailândia, China e Estados Unidos. A falta de informações sobre os riscos de como manter estas arraias em um aquário pode resultar em lesões, às vezes com consequências graves (Schiera et al., 2002). Já existem relatos de envenenamentos na Bélgica (Van Offel and Stevens, 2000), Itália (Schiera et al., 2002), Alemanha (Mebs, 1980), França (Brisset et al., 2006), Espanha (Picazo and Pastor, 2009) e China (Liang et al., 2018; Ng et al., 2018).

No Brasil, em São Paulo e nos municípios paranaenses e sul-matogossenses, localizados às margens do Rio Paraná, à montante da cachoeira de Sete-Quedas em Guaíra, Paraná, arraias não faziam parte da fauna aquática nativa até o final da década de 70, do século XX. No entanto, com a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em 1982, a importante barreira geográfica representada pelas Sete-Quedas foi submersa, possibilitando a colonização do trecho situado à montante de Guaíra por espécies como *P. motoro*, *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon schuhmacheri*, que vêm se aproveitando dos canais artificiais nas barragens da Hidrovia Tietê-Paraná para ampliar suas áreas de distribuição, despertando o interesse de pesquisadores pelos envenenamentos ocorridos com a população local e com os turistas (Garrone Neto et al., 2007; Garrone Neto and Haddad Jr., 2009; Garrone Neto and Haddad Jr., 2010).



Figura 12. Arraia de água doce (*Potamotrygon* sp.) em seu hábitat. Foto: Wallace Duncan.



Figura 13. A. Momento do nascimento de uma arraia cururu (*P. wallacei*). B. Neonato de *P. wallacei*. Foto: Wallice Duncan.

Curiosamente, arraias também têm uso na medicina tradicional de algumas populações nativas da América do Sul. Em alguns lugares do Brasil, por exemplo, a cauda e a gordura de algumas espécies são usadas no preparo de remédios caseiros para asma, reumatismo, artrite e “fraqueza” (Alves and Rosa, 2007; Alves et al., 2009). Na Venezuela, ribeirinhos dos rios Orinoco e Apure extraem o óleo de fígado de arraias, por banho-maria, para uso no tratamento da gripe (Dao, 1965). Na Amazônia Peruana, o óleo de fígado de *P. motoro* é usado no

tratamento de doenças brônquicas, tosse, asma, e tendinite e possui atividade anti-inflamatória (Schmeda-Hirschmann et al., 2014).



Figura 14. Exemplar de *P. motoro* capturado no Rio Solimões. Note que a cauda da arraia encontra-se mutilada, sem o ferrão. Foto: Juliana Lameiras.

O histórico taxonômico dos potamotrygoníneos 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 and Haddad Jr., 2009; Rosa et al., 2010). Devido ao grande tamanho corporal, ao endemismo de algumas espécies, à dificuldade de captura e aos riscos com o manuseio, os potamotrygoníneos ainda constituem uma parcela pouco conhecida da fauna de água doce quando comparados a outros grupos de animais aquáticos (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009; Lameiras et al., 2013).

4. Ferrão, peçonha e muco

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 (Barbaro et al., 2007). Os ferrões são estruturas afiadas, alongadas e mineralizadas, derivados de dentículos dérmicos modificados (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009), retro-serrados bilateralmente e cobertos por um epitélio (Figura 15) contendo células produtoras de proteínas que induzem à dor, inflamação e necrose (Pedroso et al., 2007; Silva-Jr. et al., 2015). A distribuição dessas células secretoras, ou glândulas de peçonha, pode diferir de acordo com a espécie (Barbaro et al., 2007). 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 do ferrão diferem entre as famílias de Myliobatiformes (Halstead, 1988), características que, aliadas aos hábitos das arraias, podem influenciar na ocorrência e na gravidade dos envenenamentos (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Além do ferrão, algumas espécies apresentam dentículos na superfície dorsal do disco e numerosos espinhos e tubérculos mineralizados ao longo da cauda (Figura 16). Estas estruturas também são capazes de causar envenenamento (Carvalho et al., 2003).

Histologicamente, os ferrões das arraias de água doce são diferentes dos ferrões das espécies marinhas. Pedroso et al. (2007) mostrou que no ferrão das espécies de água doce existe um número maior de células secretoras de proteínas (de dois tipos diferentes) distribuídas por todo o epitélio, enquanto nas espécies marinhas estas células secretoras estão apenas ao redor ou dentro dos sulcos ventrolaterais do ferrão. Segundo os autores, estas diferenças podem influenciar nos envenenamentos por arraias de água doce, que, geralmente, são mais graves e apresentam maior percentagem de necrose que os acidentes causados por arraias marinhas. Inclusive Barbaro et al. (2007), em estudo com modelo murino, mostra que o extrato do ferrão da arraia de água doce *Potamotrygon falkneri* possui maior toxicidade e provoca mais dor que o extrato do ferrão da arraia marinha *Hypanus guttatus* (Last et al., 2016). As atividades letal, dermonecrótica e miotóxica foram detectadas apenas nos extratos de *P. falkneri*, ao passo que ação edematogênica foi similar e dose-dependente em ambos os extratos.

Algumas arraias de água doce já tiveram a peçonha parcialmente caracterizada, indicando a presença de fosfolipase A₂, L-aminoácido oxidases, lectina tipo C, metaloproteases, serina-proteases (Oliveira-Jr. et al., 2016), hialuronidase (Magalhães et al., 2008; Oliveira-Jr. et al., 2016) e pequenos peptídeos como orpotrina (vasoconstritor) e porflan

(Conceição et al., 2006; Conceição et al., 2009). Inclusive, um estudo ontogenético in vitro com *Potamotrygon leopoldi* mostra que a toxicidade da peçonha é maior em espécimes juvenis, diminuindo durante a maturação das arraias, sem que a composição da peçonha se altere. Isto acontece provavelmente porque os indivíduos juvenis sofrem mais predação que os adultos (Kirchhoff et al., 2014).



Figura 15. Ferrão de *Potamotrygon* sp., coberto com epitélio, em cor escura. Foto: Wallice Duncan.

Ainda existem poucos dados sobre as atividades biológicas dos venenos de arraias de água doce. A falta de dados é principalmente devido à dificuldade de se extrair a peçonha, pois a captura destes animais pode ser perigosa e difícil, dependendo do tamanho do animal, do horário de captura, do local onde são capturados e como são capturados. 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; Magalhães et al., 2006; Kimura et al., 2014).



Figura 16. Espinhos caudais de *P. motoro*. Foto: Juliana Lameiras.

Ensaio in vitro realizados até o momento mostram que a peçonha das arraias de água doce possui atividades gelatinolítica (Haddad Jr. et al., 2004; Barbaro et al., 2007; Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Lameiras et al., 2014), caseinolítica (Haddad Jr. et al., 2004; Magalhães et al., 2006; Barbaro et al., 2007; Magalhães, 2017), fibrinolítica (Barbaro et al., 2007), hialurônica (Haddad Jr. et al., 2004; Barbaro et al., 2007; Magalhães et al., 2008), citotóxica para linfoblastos humanos, hemolítica direta e fosfolipásica (Oliveira, 2015; Magalhães, 2017), fosfolipásica A₂ (Barbaro et al., 2007; Oliveira, 2015; Magalhães, 2017), enzimática sobre 5'-nucleotidase, elastase, collagenase e proteolítica sobre a azocaseína e azoalbumina (Magalhães, 2017).

Os estudos in vivo evidenciam que a administração da peçonha causa dor intensa e induz a uma resposta inflamatória complexa, com presença de edema, eritema, alterações microcirculatórias, recrutamento de leucócitos, liberação de citocinas e quimiocinas (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Kimura et al., 2014; Kimura et al., 2015), formação de necrose (Antoniuzzi et al., 2011; Lameiras et al., 2014) e induz a atividade hipotensora quando injetada por via endovenosa (Rodrigues, 1972). Análises histopatológicas realizadas em camundongos indicam que, no sítio de injeção do veneno, há a presença de infiltrado inflamatório intenso, principalmente de neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Antoniuzzi et

al., 2011; Kimura et al., 2014; Lameiras et al., 2014). Além disso, um estudo histopatológico com camundongos injetados no músculo gastrocnêmio direito com peçonha de arraia mostrou a presença de lesão tecidual no mesmo músculo esquerdo, indicando a presença miotoxicidade sistêmica (Lameiras et al., 2014). Recentemente, um estudo em camundongos nocauteados para mastócitos e vários genes envolvidos na resposta inflamatória demonstrou que a neutrofilia induzida pela injeção intraplantar da peçonha de *Potamotrygon cf. henlei* pode ser atribuída à liberação abundante de IL-33 por cardiomiócitos, e não pelos mediadores dos mastócitos (Dos-Santos et al., 2017).

Em adição à peçonha, as arraias de água doce produzem um muco espesso, que recobre todo o corpo do animal, inclusive o ferrão. O muco, secretado por células mucosas localizadas na epiderme, é considerado a primeira linha de defesa na imunidade inata dos peixes (Zhao et al., 2008) e ajuda a manter a areia ou lama aderidas por cima do disco da arraia quando esta se esconde no substrato, auxiliando na camuflagem do animal (Walker, 2003). O muco contém peptídeos antimicrobianos (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Conceição et al., 2012), induz ao envenenamento de forma semelhante ao extrato do ferrão (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Lameiras et al., 2014) e também pode induzir à rabdomiólise sistêmica (Lameiras et al., 2014). Além disso, a presença do muco, juntamente com a peçonha, pode potencializar a necrose nos envenenamentos por arraias de água doce, como observado por Magalhães et al. (2006).

5. Envenenamentos por arraias de água doce: mecanismos de intoxicação e manifestações clínicas

Arraias de água doce são animais de hábito bentônico, costumando ficar escondidas sob a areia no fundo dos rios. São dóceis e, portanto, não costumam atacar os humanos (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). No entanto, se são acidentalmente pisadas ou têm suas nadadeiras tocadas, a arraia movimentada a sua cauda abruptamente em comportamento defensivo, introduzindo, assim, o ferrão no indivíduo e causando uma laceração irregular (Magalhães et al., 2006).

Os envenenamentos por arraias de água doce se caracterizam pela ação inflamatória intensa (Antoniazzi et al., 2011; Kimura et al., 2014). A vítima se queixa de dor lancinante, desproporcional ao tamanho da lesão (Pardal and Gadelha, 2010). Inicialmente, o ferimento apresenta eritema e edema e, em pouco tempo, surge uma necrose, causando flacidez do tecido e formação de uma úlcera que evolui lentamente, como visto na Figura 17 (Magalhães

et al., 2008). O processo de cicatrização costuma ser longo e difícil, podendo durar meses (Haddad Jr. et al., 2013). Os pacientes também podem apresentar complicações como náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular e convulsões (Haddad Jr. et al., 2004). Como um fator agravante, o ferrão pode quebrar e provocar a retenção de fragmentos de dentina no ferimento (Haddad Jr. et al., 2004). Lesões letais raramente ocorrem, exceto em casos onde o ferrão atinge órgãos vitais (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009).



Figura 17. Ferimento por envenenamento com arraia de água doce. Foto: Frederico Neves.

A gravidade da lesão também se dá pela ação mecânica do ferrão, que, além de introduzir o veneno, possibilita que bactérias presentes na pele da vítima ou na água ou no muco que recobre o corpo das arraias adentrem o ferimento, podendo causar infecção secundária (Figura 18), geralmente por bactérias como *Aeromonas* spp, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp. e *Enterobacter* spp. (Domingos et al., 2011; Torrez et al., 2012).



Figura 18. Lesão com necrose e infecção secundária por envenenamento por arraia de água doce da região Amazônica. Foto: Daniela Maia.

6. Epidemiologia

Apesar dos envenenamentos por arraias de água doce serem comuns nas comunidades ribeirinhas da América do Sul (Haddad Jr. et al., 2013; Silva-Jr. et al., 2015), ainda existem poucos estudos epidemiológicos a respeito (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Os envenenamentos são pouco letais, mas extremamente dolorosos e desagradáveis, e como geralmente ocorrem em áreas remotas, quase nunca são relatados, e, em muitos casos, não são tratados adequadamente ou são tratados apenas com medicina tradicional (Haddad Jr., 2008; Haddad Jr. et al., 2013). Os envenenamentos são ainda mais frequentes na Bacia Amazônica (Charvet-Almeida et al., 2002), onde constituem um problema de saúde pública, embora não recebam a mesma atenção dispensada para os casos de ofidismo e envenenamentos envolvendo artrópodes peçonhentos como aranhas e escorpiões (Sá-Oliveira et al., 2011). No Estado do Acre, Norte do Brasil, por exemplo, os acidentes são comuns entre índios e seringueiros (Pierini et al., 1996). Morte como consequência direta do envenenamento por arraia de água doce ainda não foi relatada, mas existem casos de óbitos na Venezuela e no

Brasil em decorrência de tétano, pois os acidentados não receberam tratamento adequado logo após o envenenamento (Dao, 1965; Torrez et al., 2012).

Os envenenamentos por arraias de água doce apresentam praticamente as mesmas características e são mais frequentes durante a vazante dos rios, que geralmente ocorre entre os meses de junho a dezembro (Abati et al., 2017). Neste período, bancos de areia e praias são formados ao longo dos rios, onde milhares de pessoas realizam atividades recreativas, como, por exemplo, a praia de Alter-do-Chão, no Pará (Figura 19) (Haddad Jr., 2008; Haddad Jr. et al., 2013; Haddad Jr. et al., 2013). Talvez, outro ponto que contribua para o aumento dos envenenamentos no período de seca seja o fato de que neonatos e juvenis de arraias tendem a permanecer em águas rasas, próximas à costa, onde provavelmente permanecem protegidos de predadores de canais (Rosa et al., 2010). Os envenenamentos são mais frequentes no horário da tarde. As vítimas são geralmente indivíduos adultos do sexo masculino que praticam alguma atividade à beira da praia. As áreas anatômicas mais atingidas são os membros inferiores, no caso dos banhistas, e as mãos, no caso dos pescadores, que se acidentam ao manipular o animal ou ao tentar tirá-lo da rede de pesca. As vítimas sempre reportam dor lancinante e o local lesionado apresenta, inicialmente, edema e eritema, seguido, na maioria das vezes, de necrose isquêmica. O ferimento pode demorar meses para cicatrizar. Raramente, alguns indivíduos podem manifestar tonturas, mialgia, enxaqueca, febre, sudorese, náuseas e vômitos. Geralmente, as vítimas ficam com cicatrizes ou sequelas (Piola et al., 2001; Gutierrez et al., 2004; Haddad Jr. et al., 2004; Garrone Neto and Haddad Jr., 2010; Monteiro-dos-Santos et al., 2014; Castro et al., 2016; Passos et al., 2016; Abati et al., 2017) e, em alguns casos, pode ocorrer amputação do membro afetado (Sá-Oliveira et al., 2011; Monteiro et al., 2016).

Os envenenamentos por arraias de água doce, apesar de serem de notificação compulsória no Brasil desde 2014 (Brasil, 2014), apresentam registros esparsos e pouco conclusivos em termos de epidemiologia, sintomatologia e medidas terapêuticas empregadas (Haddad Jr., 2008). Além disso, não existe um CID (Classificação Internacional de Doenças) específico para esse tipo de envenenamento. Diferentemente do que ocorreu com os sistemas de notificação para envenenamentos ofídicos e, posteriormente, para os casos de araneísmo e escorpionismo, os registros sobre envenenamentos por arraias no Brasil sempre foram relegados a um segundo plano, negligenciado pelos órgãos responsáveis pela notificação, controle e prevenção de agravos envolvendo animais peçonhentos (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Sendo assim, nosso grupo de pesquisa elaborou um sistema de notificação para

acidentes por arraias (SNAA) que, quando validado e implantado, poderá auxiliar na notificação dos envenenamentos (Gualberto et al., 2016).



Figura 19. Praia de Alter-do-Chão, município de Santarém, Estado do Pará, Brasil. Nos meses de julho a dezembro, belíssimas praias se formam com a vazante do Rio Tapajós, atraindo banhistas desavisados que acabam sendo envenenados por arraias. Foto: Maria Cristina dos Santos.

Em estudo de 84 casos de envenenamentos por arraias ocorridos nos rios Paraná, Paraguai, Araguaia e Tocantins, Haddad Jr. et al. (2004) sugerem que a maioria dos envenenamentos foi causada pela espécie *P. motoro*, seguida de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon orbignyi*, pois estas arraias são frequentemente coletadas nestes rios. Inclusive, em um relato de caso de envenenamento por arraia no Rio Araguaia, a vítima, apesar do estresse da situação, foi capaz de detectar e observar a arraia (o que é incomum), identificada posteriormente como um adulto de *P. motoro* com aproximadamente 60 cm de largura do disco (Silva-Jr. et al., 2015). *P. motoro* e *P. orbignyi* também parecem estar relacionadas a muitos casos de envenenamentos em comunidades indígenas da Colômbia (Haddad Jr. et al., 2013). Uma análise epidemiológica de envenenamentos por arraias nos municípios de Penalva e Viana, Estado do Maranhão, também indica *P. motoro* como a espécie causadora dos

envenenamentos em todos os 40 casos estudados (Costa, 2017). Os sintomas mais relatados nestes casos foram dor e edema e 70% dos acidentados apresentaram necrose cutânea. Alguns indivíduos chegaram a sofrer envenenamento mais de uma vez. Talvez, *P. motoro* seja uma das espécies mais causadora de envenenamentos por ser uma espécie muito fecunda (Charvet-Almeida et al., 2005) e por apresentar ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na maioria dos sistemas de água doce da América do Sul (Loboda and Carvalho, 2013).

7. Tratamento

Até o momento, não há uma terapia definitiva e realmente funcional para os envenenamentos por arraias e os profissionais de saúde geralmente não recebem treinamento adequado para cuidar deste tipo de envenenamento. Também não há um antiveneno específico para o tratamento das lesões. A abordagem terapêutica é sintomática, baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos para prevenir infecção secundária (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009).

Nos envenenamentos por arraia, é recomendado, inicialmente, que o ferimento seja lavado em água corrente ou solução salina, a fim de remover a maior quantidade possível de toxina e restos do tegumento do ferrão. Em seguida, o membro ferido deve ser imerso em água morna (entre 45 e 60°C). Com essa medida, é esperado um alívio da dor entre 30 e 90 minutos, pois algumas toxinas que compõem os venenos das arraias são termolábeis e devem ser inativadas com esse procedimento. Exploração cirúrgica do ferimento pode ser realizada para a retirada de restos de tecido e possíveis fragmentos do ferrão, visíveis em exame de raio-X. Importante ressaltar que os anestésicos locais não podem conter adrenalina, por causar vasoconstrição cutânea, aumentando ainda mais o risco de necrose. Outros procedimentos importantes compreendem o uso de antibióticos sistêmicos de amplo espectro em casos de pacientes com lesões profundas e necrosadas, imunização antitetânica e o uso de analgésicos sistêmicos, inclusive opiáceos, se o controle da dor não for obtido nas primeiras duas horas. Pacientes com perfurações abdominais ou torácicas devem receber atendimento médico imediatamente, pois há risco de morte nestes casos. As complicações da fase crônica são tratadas com as condutas de cicatrização de úlceras crônicas: repouso, lavagem com água e sabão, sedativo e antibiótico terapia tópica. O uso de corticosteroides sistêmicos é controverso, pois estas drogas aumentam o tempo de cicatrização do ferimento (Pardal, 2009; Garrone Neto and Haddad Jr., 2010).

O fato dos envenenamentos ocorrerem, geralmente, longe dos centros de saúde e de não haver tratamento específico faz com que os acidentados busquem soluções caseiras para minimizar os sintomas clínicos, colocando, sobre o ferimento, ervas medicinais, óleos e cascas vegetais, sebo de carneiro, borra de café, fumo, pelo de guaxinim queimado, gordura de arraia, seiva de bananeira, limão, álcool, diesel, querosene, gasolina, e, nos casos mais bizarros, saliva, urina e até fezes humanas (Sá-Oliveira et al., 2011; Lameiras et al., 2013; Costa, 2017). Além disso, em algumas comunidades ribeirinhas do Brasil, a população recomenda que o ferimento seja colocado em contato com uma genitália feminina (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Obviamente, esses tratamentos não são recomendados, pois podem agravar ainda mais a lesão (Sá-Oliveira et al., 2011; Lameiras et al., 2013).

Embora os procedimentos médicos mencionados anteriormente sejam capazes de controlar o quadro clínico dos pacientes, a neutralização das toxinas locais e circulantes seria a conduta ideal para impedir a indução dos sinais e sintomas apresentados nos envenenamentos por arraias de água doce (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Segundo recomendação da WHO (2007), a soroterapia é o tratamento indicado para indivíduos acidentados por animais peçonhentos, como serpentes, aranhas, escorpiões e peixes. No entanto, infelizmente, não há estudo que justifique a produção de antiveneno para arraias, devido ao pequeno número de acidentes reportados. Por isso a importância da notificação dos casos de acidentes e de estudos mais aprofundados sobre atividades biológicas induzidas pelos venenos de arraias (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009).

8. Produção de antiveneno

Na busca da obtenção de imunobiológicos específicos para os envenenamentos por arraias e outros peixes peçonhentos, alguns pesquisadores vêm trabalhando e alguns resultados já estão sendo divulgados. Em estudo com arraias marinhas realizado por Russell (1972), foi observada a neutralização da letalidade do veneno de *Urobatris halleri* (testado em camundongos) com soro (preparado em cavalo) contra os venenos das arraias *Myliobatis californicus* e *Urobatris castexi*.

Para a neutralização das atividades biológicas induzidas pela peçonha de peixes, Soliani (2008) obteve, em camundongos, soros monoespecíficos para as espécies *Thalassophryne nattereri* (niquim), *Cathorops spixii* (bagre amarelo), *Scorpaena plumieri* (peixe escorpião) e *Potamotrygon* gr. *orbignyi* (arraia dulcícola). Pela junção de um miligrama de IgG veneno-específica de cada soro monoespecífico, foi produzido o soro

poliespecífico, que foi avaliado frente as principais atividades tóxicas induzidas pelos venenos dessas mesmas espécies utilizadas para a produção dos soros monoespecíficos. Esse soro poliespecífico foi capaz de neutralizar parcialmente as seguintes atividades: a miotoxicidade induzida pelo veneno de *C. spixii*, a dor causada pelo veneno de *Potamotrygon* gr. *orbigny*, o edema formado pelo veneno de *S. plumieri* e totalmente a inflamação pulmonar induzida pelo veneno de *S. plumieri*.

Por outro lado, Thomazi (2016) imunizou camundongos com o muco do dorso *Paratrygon aiereba* irradiado por raios gama de ^{60}Co . Após a imunização, esses camundongos foram testados frente à atividade edematogênica induzida pelo muco do *P. aiereba*, *P. orbigny* e *Potamotrygon henlei* e os anticorpos circulantes não foram capazes de neutralizar essa atividade.

Pesquisas indicam que os soros antiarraia de água doce apresentam altos títulos de anticorpos que reconhecem fortemente as peçonhas homólogas e heterólogas de outras arraia de água doce (Thomazi, 2016; Lameiras et al., 2017) e de uma espécie de arraia marinha (Barbaro et al., 2007). Porém, os anticorpos obtidos não reconhecem, no veneno, componentes de baixo peso molecular que apresentam atividade enzimática (Barbaro et al., 2007; Lameiras et al., 2017). Como títulos de anticorpos não indicam a eficácia do soro, são necessários mais testes *in vivo* para avaliar o poder de neutralização frente aos efeitos local e sistêmico induzido pelos venenos de arraia de água doce (Lameiras et al., 2017).

9. Considerações finais

Os envenenamentos por arraia de água doce são muito temidos pelas populações ribeirinhas da América do Sul, pois estão quase sempre associados a casos de incapacidade física temporária (ou permanente), além de causarem muita dor e desconforto para os acidentados. A documentação detalhada desses envenenamentos é rara, pois, na maioria das vezes, ocorre em lugares distantes e isolados, como em rios que cortam a floresta Amazônica, o que contribui para a falta de conhecimento sobre esse tema (Haddad Jr. et al., 2004). Essa subnotificação mostra que as autoridades de saúde pública devem incluir em seus planejamentos ações que possam registrar os envenenamentos por arraia e, assim, estimular os órgãos competentes a desenvolverem ações de educação ambiental, qualificação adequada de profissionais de saúde no tratamento de acidentados e estudos que viabilizem a produção de imunobiológicos específicos (Sá-Oliveira et al., 2011).

Agradecimentos

Este artigo faz parte da tese de doutorado apresentada pela JLV L para o Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas. JLV L foi bolsista de doutorado da CAPES. MCS é bolsista produtividade do CNPq (ref. 303032 / 2016-2).

Os autores agradecem aos doutores Akemi Shibuya (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Wallice Luiz Paxiúba Duncan e Ilia Gilmará Carvalho dos Santos (Universidade Federal do Amazonas) e Maria Lúcia Goes de Araújo (Universidade Federal Rural de Pernambuco) por ceder fotos dos espécimes de arraias de água doce. Agradecem, ainda, aos médicos Daniela Maia (Hospital Giselda Trigueiro) e Frederico Neves por ceder as fotos de envenenamento por arraias de água doce.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências bibliográficas

- Abati, P. a. M., Torrez, P. P. Q., França, F. O. S., Tozzi, F. L., Guerreiro, F. M. B., Santos, S. a. T., Oliveira, S. M. S., Haddad Jr., V., 2017. Injuries caused by freshwater stingrays in the Tapajós River Basin: a clinical and sociodemographic study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50(3), 374-378.
- Almeida, M. P., Barthém, R. B., Viana, A. S., Charvet-Almeida, P., 2008. Diversidade de raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no estuário amazônico. *Arquivos de Ciências do Mar* 41(2), 82-89.
- Almeida, M. P., Barthém, R. B., Viana, A. S., Charvet-Almeida, P., 2009. 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)* 4(1), 1-11.
- Alves, R. R. N., Léo-Neto, N. A., Brooks, S. E., Albuquerque, U. P., 2009. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 124(3), 600-608.
- Alves, R. R. N., Rosa, I. L., 2007. Zootherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 113(3), 541-555.
- 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(2), 297-303.

- Araújo, M. L. G., Charvet-Almeida, P., Almeida, M. P., Pereira, H., 2004. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20, 1-6.
- 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(5), 676-687.
- Brasil, 2014. Portaria nº 1.271, de 6 de junho de 2014. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil, Ministério da Saúde.
- Brisset, I. B., Schaper, A., Pommier, P., Haro, L., 2006. Envenomation by Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*: 2 cases reported in Europe. *Toxicon* 47(1), 32-34.
- Carrier, J. C., Pratt, H. L., Castro, J. I., 2004. Reproductive biology of elasmobranchs, in: Carrier, J. C., Musick, J. A., Heithaus, M. R. (Eds.), *Biology of sharks and their relatives*, 1. ed ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 269-286.
- Carvalho, M. R., 2016. Description of two extraordinary new species of freshwater stingrays of the genus *Potamotrygon* endemic to the rio Tapajós basin, Brazil (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), with notes on other Tapajós stingrays. *Zootaxa* 4167(1), 1-63.
- Carvalho, M. R., 2016. Neotropical Stingrays: Family Potamotrygonidae, in: Last, P. R., Naylor, G. J. P., Séret, B., White, W. T., Stehmann, M. F. W., Carvalho, M. R. (Eds.), *Rays of The World*, 1st ed. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 619-655.
- Carvalho, M. R., Loboda, T. S., Silva, J. P. C. B., 2016. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, *Styracura*, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941)(Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Zootaxa* 4175(3), 201-221.
- 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. ed ed. EDIPUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, pp. 22-29.
- Carvalho, M. R., Maisey, J. G., Grande, L., 2004. 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* 284, 1-136.
- Castro, T. A., Airesi, R. S., Turibio, T. O., Neves, A. C. D., Gemelli, T. F., Araujo, R. O., 2016. Pacientes acidentados por raias registrados no SINAN de Porto Nacional – TO entre 2009 e 2013. *Coletânea Científica Presidente Antônio Carlos: Utilizando o DATASUS como ferramenta de investigação* 2(1), 173-180.
- Charvet-Almeida, P., Araújo, M. L. G., Almeida, M. P., 2005. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* 35, 165–171.
- 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.
- Conceição, K., Konno, K., Melo, R. L., Marques, E. E., Hiruma-Lima, C. A., Lima, C., Richardson, M., Pimenta, D. C., Lopes-Ferreira, M., 2006. Orpotrin: A novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon* gr. orbignyi. *Peptides* 27(12), 3039-3046.

- Conceição, K., Monteiro-Dos-Santos, J., Seibert, C. S., Ismael Silva Jr., P., Marques, E. E., Richardson, M., Lopes-Ferreira, M., 2012. *Potamotrygon* cf. *henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein. *Toxicon* 60(5), 821-829.
- 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., 2009. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides* 30(12), 2191-2199.
- Costa, J. A., 2017. Acidentes causados por arraias pintadas *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) em duas comunidades do sistema lacustre Pindaré-Mearim, Maranhão: epidemiologia, aspectos clínicos e medidas preventivas Monografia, Universidade Federal do Maranhão.
- Dao, L., 1965. Lesiones producidas por las rayas *Potamotrygonidae* en rios de Venezuela. *International journal of dermatology* 4(4), 219-224.
- 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(2), 147-153.
- Dos-Santos, J. C., Grund, L. Z., Seibert, C. S., Marques, E. E., Soares, A. B., Quesniaux, V. F., Ryffel, B., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., 2017. Stingray venom activates IL-33 producing cardiomyocytes, but not mast cell, to promote acute neutrophil-mediated injury. *Scientific reports* 7(7912), 1-15.
- Duncan, W. L. P., 2016. Ecofisiologia das raias de água doce (*Potamotrygonidae*): mecanismos de interação organismo-ambiente, in: Lasso, C. A., Rosa, R. S., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., Carvalho, M. R. (Eds.), XV. Rayas de agua dulce (*Potamotrygonidae*) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia, pp. 45-66.
- 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(3), 454-464.
- Duncan, W. L. P., Inomata, S. O., Fernandes, M. N., 2010. Comércio de arraias de água doce na região do Médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* 5(2), 13-22.
- 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(10), 1309-1317.
- Fontenelle, J. P., Carvalho, M. R., 2017. Systematic revision of the *Potamotrygon scobina* Garman, 1913 species-complex (*Chondrichthyes*: *Myliobatiformes*: *Potamotrygonidae*), with the description of three new freshwater stingray species from Brazil and comments on their distribution and biogeography. 2017 4310(1), 63.
- Funasa, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, Ministério da Saúde: 81-85.
- Garrone Neto, D., 2010. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de raias (*Myliobatiformes*, *Potamotrygonidae*) na região do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5(1), 101-111.
- 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*, 2nd ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, pp. 295-313.

- Garrone Neto, D., Haddad Jr., V., 2010. Arraías em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(1), 82-88.
- Garrone Neto, D., Haddad Jr., V., Vilela, M. J. A., Uieda, V. S., 2007. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrígonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. *Biota Neotropica* 7, 0-0.
- Gualberto, R. M., Mendonça, A. P., Dos-Santos, M. C., 2016. A Contribution to the Notification of Accidents with Ray Species: Developing a Web System for Managing Notifications. *Journal of Health Informatics* 8(2), 57-65.
- Gutierrez, J., Benítez Guerra, I., Benítez Guerra, G., 2004. Envenenamiento por rayas de agua dulce. *Rev. Fac. Med.(Caracas)* 27(2), 131-134.
- Haddad Jr., V., 2008. Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico. São Paulo.
- Haddad Jr., V., Cardoso, J. L. C., Garrone Neto, D., 2013. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 19(1), 16.
- Haddad Jr., V., Garrone-Neto, D., Lasso, C. A., Morales-Betancourt, M. A., Barriga, R., Barbarino, A., 2013. Envenenamientos causados por rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) en Brasil, con notas sobre los países vecinos (Colombia, Venezuela y Ecuador): implicaciones en la salud pública, in: Lasso, C. A., Rosa, R., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., Carvalho, M. R. (Eds.), XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte I: Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia, pp. 343-360.
- 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(3), 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.
- Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Antoniazzi, M. M., Jared, S. G. S., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., 2014. Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Experimental Biology and Medicine* 239(5), 601-609.
- Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Távora, B. C. L. F., Faquim-Mauro, E. L., Pereira, N. A., Antoniazzi, M. M., Jared, S. G. S., Teixeira, C. F. P., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., 2015. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Toxicon* 103, 65-73.
- Kirchhoff, K. N., Klingelhöfer, I., Dahse, H.-M., Morlock, G., Wilke, T., 2014. Maturity-related changes in venom toxicity of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*. *Toxicon* 92, 97-101.
- Lameiras, J. L. V., Costa, O. T. F., Dos-Santos, M. C., Duncan, W. L. P., 2013. Arraías de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes. *Scientia Amazonia* 2(3), 11-27.

- Lameiras, J. L. V., Costa, O. T. F., Moroni, F. T., Araújo, J. D. R., Caranhas, S. M. E., Marques, C. M. A., Dos-Santos, M. C., Duncan, W. L. P., 2014. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. *Toxicon* 77(0), 105-113.
- Lameiras, J. L. V., Moura, V. M., Dias, L. C., Santos, I. G. C., Costa, O. T. F., Dos-Santos, M. C., 2017. Cross-reactivity between *Potamotrygon motoro* antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin. *Toxin Reviews* 36(0), 1-10.
- Last, P. R., Naylor, G. J. P., Manjaji-Matsumoto, B. M., 2016. A revised classification of the family Dasyatidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes) based on new morphological and molecular insights. *Zootaxa* 4139(3), 345-368.
- Liang, P. C., Zhang, Y. L., Liu, Y., Wang, Y. Q., Xia, L. L., Ren, B. L., Wang, C. R., Cao, Y., 2018. Dynamic variations in platelet counts may reflect the severity and prognosis of stingray injuries in the early phase. *The American Journal of Emergency Medicine* 36(5), 910.e911-910.e914.
- Loboda, T. S., Carvalho, M. R., 2013. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 11(4), 693-737.
- Lovejoy, N. R., 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 117(3), 207-257.
- Lovejoy, N. R., Albert, J. S., Crampton, W. G. R., 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences* 21(1–2), 5-13.
- Lovejoy, N. R., Bermingham, E., Martin, A. P., 1998. Marine incursion into South America. *nature* 396(6710), 421-422.
- Lucifora, L. O., Balboni, L., Scarabotti, P. A., Alonso, F. A., Sabadin, D. E., Solari, A., Vargas, F., Barbini, S. A., Mabrugaña, E., Díaz, J. M. A., 2017. Decline or stability of obligate freshwater elasmobranchs following high fishing pressure. *Biological Conservation* 210, 293-298.
- 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. *orbignyi*. *Toxicon* 47(5), 575-583.
- Magalhães, M. R., 2017. Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri* Tese de doutorado, Universidade de Brasília.
- Magalhães, M. R., Silva Jr, N. J., Ulhoa, C. J., 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 51(6), 1060-1067.
- Martin, R. A., 2005. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs: a review. *JMBA-Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85(5), 1049-1074.
- Mceachran, J. D., Aschliman, N., 2004. Phylogeny of Batoidea, in: Carrier, J. C., Musick, J. A., Heithaus, M. R. (Eds.), *Biology of sharks and their relatives*, 2. ed ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 79-113.

- Mebs, D., 1980. Stechrochen-Vergiftungen Sting-ray injuries. Dtsch Med Wochenschr 105(37), 1289-1291.
- 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(9), 1368-1377.
- Monteiro-Dos-Santos, J., Seibert, C. S., Araújo, G. C., Bertolin, A. O., Marques, E. E., 2014. Habitat de arraias em rios e o perigo de acidentes valorado pelo acidentado na bacia Tocantins Araguaia. Scientia Amazonia 3(2), 24-38.
- Monteiro, W. M., Oliveira, S. S., Sachett, J. D. a. G., Silva, I. M., Ferreira, L. C. L., Lacerda, M. V. G., 2016. Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 49(3), 389-392.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. H., 2016. Fishes of the World. New Jersey, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Ng, H. H., Tan, H. H., Yeo, D. C. J., Ng, P. K. L., 2010. Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore. Biological Invasions 12(8), 2385-2388.
- Ng, V. C. H., Lit, A. C. H., Wong, O. F., Tse, M. L., Fung, H. T., 2018. Injuries and envenomation by exotic pets in Hong Kong. Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi 24(1), 48-55.
- Oliveira-Jr., N. G., Fernandes, G. R., Cardoso, M. H., Costa, F. F., Cândido, E. S., Garrone-Neto, D., Mortari, M. R., Schwartz, E. F., Franco, O. L., Alencar, S. A., 2016. Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil. Nature - Scientific reports 6(21935), 1-14.
- Oliveira, A. T., Lima, E. C., Paes, L. S., Santos, S. M., Araújo, R. L., Pantoja-Lima, J., Aride, P. H. R., 2015. Relação entre as populações naturais de arraias de água doce (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) e pescadores no baixo rio Juruá, Estado do Amazonas, Brasil. Biota Amazonia 5(3), 108-111.
- Oliveira, L. P., 2015. Avaliação da citotoxicidade do extrato do ferrão de arraia *Potamotrygon falkneri* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). Masters dissertation, Universidade de Brasília. Brasil.
- Pardal, P. P. O., 2009. Ictismo por arraia, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. D. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S. A., Haddad Jr., V. (Eds.), Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes, 2. ed ed. Sarvier, São Paulo, pp. 523-529.
- Pardal, P. P. O., Gadelha, M. a. C., 2010. Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas. Belém, Pará.
- Passos, A. P., Pimenta, M. A., Thomazi, G. O. C., Aires, R. S., Turibio, T. O., 2016. Perfil epidemiológico dos pacientes vítimas de acidentes por raias atendidos no hospital público de Porto Nacional/TO, 2012 a 2015. Coletânea Científica Presidente Antônio Carlos: Informação Científica Baseada em Evidências 1(1), 105-114.
- 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., 2007. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. Toxicon 50(5), 688-697.
- Picazo, M. M. G., Pastor, M. V., 2009. Caso clínico: lesión por raya de agua dulce. SEMERGEN - Medicina de familia 35(4), 194-196.
- Pierini, S. V., Warrell, D. A., De Paulo, A., Theakston, R. D. G., 1996. 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 34(2), 225-236.

- Piola, J. C., Prada, D. B., Evangelista, M., Lloveras, S., Orduna, T., 2001. Epidemiología de los Accidentes por Rayas. Sertox. Rosario. 1990-1999. Congreso Arg. de Toxicología, XXI Jorn. Interdisc. de Toxicol. y I Jorn. Rioplat. de Toxicol., Rosario, Argentina.
- Ramos, T. P. A., Ramos, R. T. D. C., Ramos, S. a. Q. A., 2014. Ichthyofauna of the Parnaíba river Basin, Northeastern Brazil. *Biota Neotropica* 14(1), 1-8.
- Rodrigues, R. J., 1972. Pharmacology of South American freshwater stingray venom (*Potamotrygon motoro*). *Transactions of the New York Academy of Sciences* 34(8), 677.
- Rosa, R., Lasso, C. A., 2013. Biogeografía de las rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de América del Sur, in: Lasso, C. A., Rosa, R., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., Carvalho, M. R. (Eds.), XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte I: Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia, pp. 39-47.
- Rosa, R. S., 1990. *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 7, 425-437.
- 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*, 1. ed ed. CRC Press, United States, pp. 241-286.
- Russell, F. E., 1972. Some Chemical and Zootoxicological Properties of Stingray Venom. Los Angeles, DTIC Document.
- Sá-Oliveira, J. C., Costa, E. A., Pena, F. P. S., 2011. Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. *Biota Amazônia* 1(2), 74-78.
- Santos, E., 1952. Nossos peixes marinhos: vida e costume dos peixes do Brasil. Rio de Janeiro.
- Schiera, A., Battifoglio, M. L., Scarabelli, G., Crippa, D., 2002. Stingray injury in a domestic aquarium. *International journal of dermatology* 41(1), 50-51.
- Schmeda-Hirschmann, G., Delporte, C., Valenzuela-Barra, G., Silva, X., Vargas-Arana, G., Lima, B., Feresin, G. E., 2014. Anti-inflammatory activity of animal oils from the Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 156, 9-15.
- Shibuya, A., Zuanon, J., Carvalho, M. R., 2016. Alimentação e comportamento predatório em raias Potamotrygonidae, in: Lasso, C. A., Rosa, R., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., Carvalho, M. R. (Eds.), XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia, pp. 67-81.
- Shibuya, A., Zuanon, J., Tanaka, S., 2012. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 10(1), 189-196.
- Silva-Jr., N. J., Ferreira, K. R. C., Pinto, R. N. L., Aird, S. D., 2015. A Severe Accident Caused by an Ocellate River Stingray (*Potamotrygon motoro*) in Central Brazil: How


- Well Do We Really Understand Stingray Venom Chemistry, Envenomation, and Therapeutics? *Toxins* 7(6), 2272-2288.
- Silva, J. P. C. B., Carvalho, M. R., 2011. 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) 51, 139-154.
- Sioli, H., 1967. Studies in Amazonian waters, Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica. CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, pp. 9-50.
- Soliani, F. M. B., 2008. Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- Sun, H.-Y., Cao, X.-H., Jiang, Y.-F., Ni, L.-Y., Mo, Z.-Q., Qin, Q.-W., Li, Y.-W., Dan, X.-M., 2018. Outbreak of a novel disease associated with *Citrobacter freundii* infection in freshwater cultured stingray, *Potamotrygon motoro*. *Aquaculture* 492, 35-39.
- Thomazi, G. O. C., 2016. Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co da raia de água doce *Paratrygon aiareba* Doctoral thesis, Universidade de São Paulo.
- Thorson, T. B., Brooks, D. R., Mayes, M. A., 1983. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Society Research Reports* 15, 663-694.
- Torrez, P. P. Q., Moura, L., Duarte, M. R., Medeiros, C. R., Haddad Jr, V., Franca, F. O. S., 2012. Injury by stingray: Soft tissue infection caused by *Aeromonas caviae*. Special Issue: Abstracts of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom 31, 431-432.
- Treberg, J. R., Speers-Roesch, B., Piermarini, P. M., Ip, Y. K., Ballantyne, J. S., Driedzic, W. R., 2006. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species. *Journal of Experimental Biology* 209(5), 860-870.
- Uzel, A. P., Massicot, R., Jean, M., 2002. Stingray injury to the ankle. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 12(2), 115-116.
- Van Offel, J. F., Stevens, W. J., 2000. A stingray injury in a devotee of aquarium fishes. *Acta Clinica Belgica* 55(3), 174-175.
- Walker, S. M., 2003. Rays - A carolrhoda nature watch book. Minneapolis, USA, Carolrhoda Books, Inc. Minneapolis.
- Who, 2007. Rabies and Envenomings: a Neglected Public Health Issue. Report of a Consultative Meeting. Geneva, 10 January 2007, World Health Organization.
- Wourms, J. P., Grove, B. D., Lombardi, J., 1988. The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes, in: Hoar, W. S., Randall, D. J. (Eds.), *Fish Physiology*, 1. ed ed. Academic Press, San Diego, pp. 1-134.
- Zhao, X., Findly, R. C., Dickerson, H. W., 2008. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 32(5), 500-508.
- Ziegman, R., Alewood, P., 2015. Bioactive components in fish venoms. *Toxins* 7(5), 1497-1531.



ORIGINAL ARTICLE



Cross-reactivity between *Potamotrygon motoro* antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin

Juliana Luiza Varjão Lameiras^{a,b} , Valéria Mourão de Moura^{b,c}, Lucas Castanhola Dias^d,
Ilia Gilmara Carvalho dos Santos^{a,b}, Oscar Tadeu Ferreira da Costa^e and Maria Cristina Dos-Santos^b

^aPrograma Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, Manaus, Brazil; ^bLaboratório de Imunoquímica, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, Manaus, Brazil; ^cPrograma de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Brazil; ^dLaboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil; ^eLaboratório de Microscopia Quantitativa, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, Manaus, Brazil

ABSTRACT

In this study, two mouse hyperimmune sera were produced, one using extract from the stinger of the stingray *Potamotrygon motoro* and the other using extract from the dorsal region of the same species and their cross-reactivity with extracts from the following species of stingrays from the Amazon basin was investigated using Western blot and dot ELISA: *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi* and *Potamotrygon schroederi*. The results show that the dorsal extract was as immunogenic as the stinger extract and induced high levels of antibodies, which reacted with homologous and heterologous antigens, indicating that both types of extract may be suitable for use in the production of antivenom to treat victims of envenomation by stingrays.

ARTICLE HISTORY

Received 28 August 2017
Revised 14 October 2017
Accepted 16 October 2017

KEYWORDS

Potamotrygonins; freshwater stingrays; envenomations; biological; antivenom

Introduction

Venomous fishes include stingrays, which although not aggressive cause many cases of envenomation (Halstead 1966, Ericsson *et al.* 2006, Magalhães *et al.* 2008). Freshwater stingrays belong to the family Potamotrygonidae, subfamily Potamotrygoninae (Carvalho 2016) and include the species *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* and *Potamotrygon schroederi* (Figure 1). The stingrays *P. aiereba*, *P. orbignyi* and *P. motoro* can be found in the basins of the Amazon, Tocantins and Negro Rivers (Rosa *et al.* 2010, Monteiro *et al.* 2016), while *P. schroederi* is endemic in the basin of the Negro River and *P. iwamae* is found in the Amazon and Napo River Basins, in Ecuador, up to the mouth of the Amazon, in the state of Pará, as well as in the lower Tocantins River (Rosa *et al.* 2010).

Freshwater stingrays have benthic habits, are not aggressive and do not usually attack humans (Neto and Haddad Jr. 2009). However, they have one to three stingers at the base of the tail which, when used

in self-defense, act as a whip and cause an irregular laceration (Magalhães *et al.* 2006). The stingers are sharp, elongate mineralized structures derived from modified dermal denticles (Neto and Haddad Jr. 2009) with bilateral backward-pointing serrations covered by an integumentary sheath with a ventrolateral glandular groove. The toxins are produced by specialized cells along the whole epithelium (Monteiro-dos-Santos *et al.* 2011, Kimura *et al.* 2014). In fact, there is no specific venom gland, and it is the supernatant of the extract obtained from the epithelium covering the stinger that is referred to as venom (Kimura *et al.* 2014). In addition to venom, freshwater stingrays produce a thick mucus that covers the animal's whole body, including the stinger. This mucus, which is secreted by mucous cells in the epidermis and is considered the first line of immune defense in these animals (Zhao *et al.* 2008), also exhibits toxic activity (Monteiro-dos-Santos *et al.* 2011, Lameiras *et al.* 2014).

The envenomations are characterized by intense inflammatory reaction and the victims complain of a searing pain (Silva-Jr. *et al.* 2015) out of proportion to

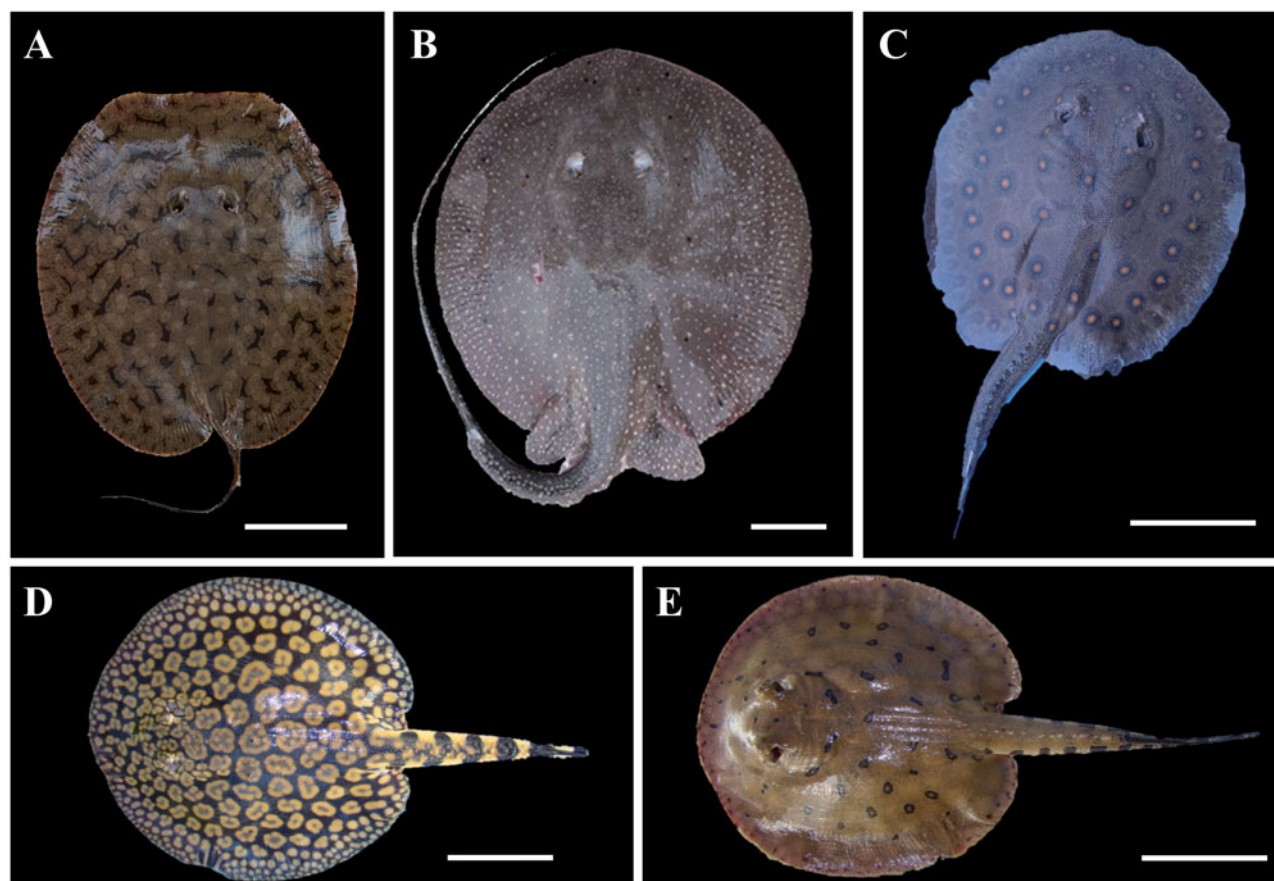


Figure 1. Specimens of stingrays of the Potamotrygonidae family. A. *Paratrygon aiereba*. B. *Plesiotrygon iwamae*. C. *Potamotrygon motoro*. D. *Potamotrygon schroederi*. E. *Potamotrygon orbignyi*. A and B photographs by Akemi Shibuya. C photograph by Juliana Lameiras. D and E photographs by Wallace Duncan. Scale bar = 10 cm.

the size of the wound (Pardal and Gadelha 2010). Erythema and edema appear around the wound, which is followed by necrosis, causing flaccidity in the affected area and the formation of a deep, slowly developing ulcer (Haddad Jr. *et al.* 2004).

Freshwater stingray envenomations are rarely reported, as they usually occur in remote, isolated areas (Haddad Jr. *et al.* 2004). In the Amazon Forest, the situation is even worse, as the riverine and indigenous communities generally live in very remote areas far from health centers, making it difficult to treat victims' wounds (Monteiro *et al.* 2016). As a result, members of these communities look to alternative therapies to minimize the clinical symptoms, including the use of warm water to relieve the intense pain, urine, herbs, plant-based oils, mutton tallow, coffee grounds and, in more bizarre cases, diesel or kerosene (Sá-Oliveira *et al.* 2011, Lameiras *et al.* 2013). These treatments are not recommended as they can aggravate the clinical symptoms (Lameiras *et al.* 2013, Monteiro *et al.* 2016).

There is no antidote or specific antivenom for freshwater stingray envenomation, and medical therapy is

usually based on the use of analgesics and anti-inflammatory agents and antibiotics to prevent secondary infection (Neto and Haddad Jr. 2010).

In an attempt to identify a more effective treatment for the victims of freshwater stingray envenomations, this study sought to produce hyperimmune sera using mucus and tissue extracts from the dorsal region and stinger of *Potamotrygon motoro* and to investigate cross-reactivity between these antivenoms and the dorsal and stinger extracts of the most important stingray species in the Amazon basin.

Material and methods

Collection and preparation of the venoms

Authorization to collect stingrays was provided by the Chico Mendes Institute for the Conservation of Biodiversity (ICMBio) under the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) ref. no. 45289–2. Figure 2 shows where the stingrays were collected. Specimens of *P. schroederi* ($n=4$) and *P. orbignyi* ($n=1$) were collected in Cubá Lake in the

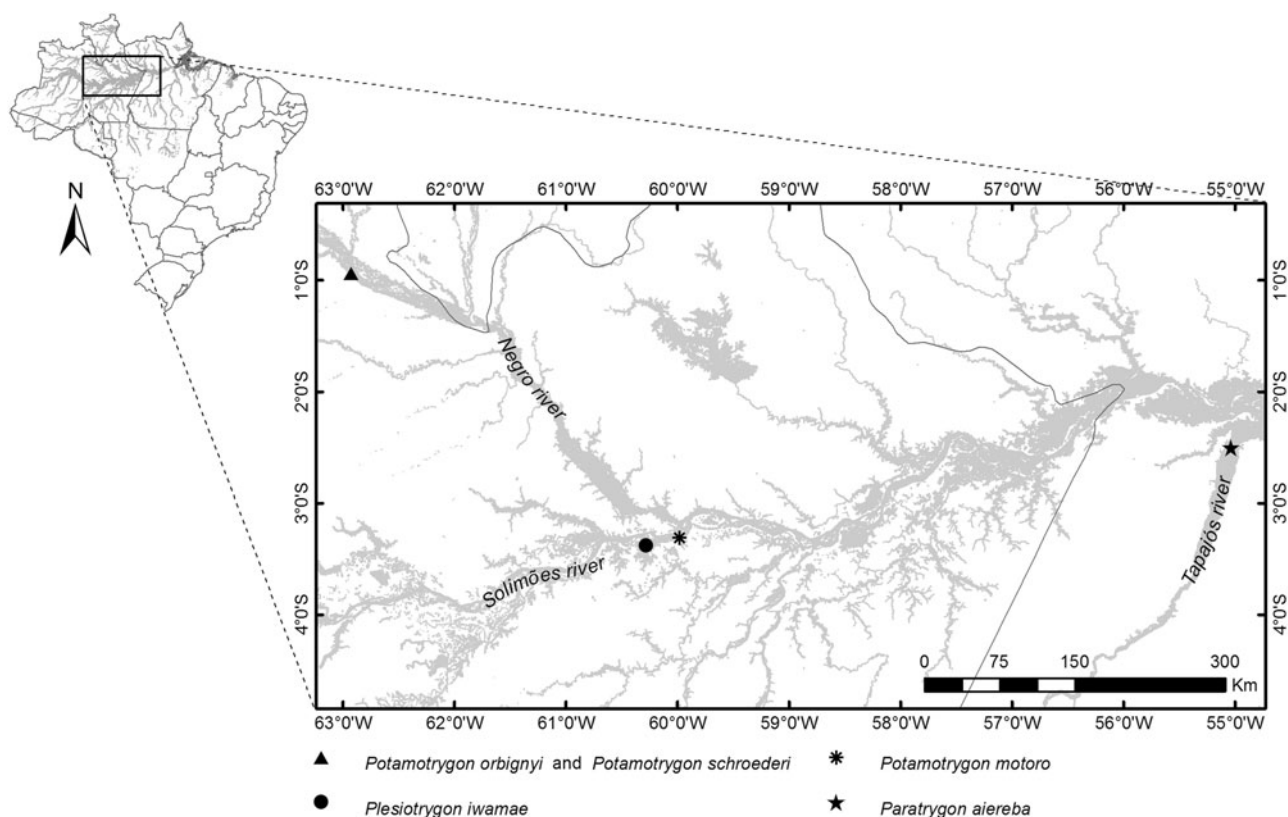


Figure 2. Locations where *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba* were collected. States of Amazonas and Pará, Brazil. Map elaborated by Erlane da Cunha.

Negro River basin (0°56'25.9"S 62°55'57.4"W) in the municipality of Barcelos in the state of Amazonas. Specimens of *P. aiereba* ($n=6$) were collected in the Tapajós River in Alter do Chão, a district in the municipality of Santarém, Pará State (2°30'16.6"S 55°01'59.8"W). Specimens of *P. iwamae* ($n=4$) and *P. motoro* ($n=6$) were collected in the Solimões River basin, in Janauacá Lake (3°22'54.8"S 60°18'01.3"W, Municipality of Manauquiri) and Curarizinho channel (3°18'42.6"S 59°59'02.4"W, Municipality of Careiro da Várzea), respectively. The dorsal region and stinger of the stingrays were scraped separately with a scalpel and the material collected was transported in liquid nitrogen to Manaus. Then, all samples were mixed with (phosphate buffered saline) pH 7.4 and centrifuged at 6000 rpm for 15 min. Supernatants were lyophilized and stored at -20°C until use. Sample protein concentration was determined by the Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Preparation of the antivenoms

To produce hyperimmune anti-*Potamotrygon motoro* dorsal and anti-*Potamotrygon motoro* stinger sera

(APmD and APmS, respectively), 20 two-month-old Swiss mice from the animal colony at the Amazonia Biotechnology Center (CBA) with *ad libitum* access to food and water were used. The study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research at the National Amazonian Research Institute (INPA) under ref. no. 018/2014. The procedures involving mice were performed in accordance with national legislation, the ethical principles of the Brazilian Society for Science in Laboratory Animals (SBCAL) and the resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

The first group received dorsal extract (mucus and tissue) of *P. motoro* (200 μg) adsorbed on aluminum hydroxide adjuvant $[\text{Al}(\text{OH})_3]$, and the second group received a mixture of stinger extract (mucus and tissue) of *P. motoro* (200 μg) also adsorbed on $\text{Al}(\text{OH})_3$. Immunization and booster doses were administered subcutaneously at seven-day interval following Dos-Santos *et al.* (1988). On the 38th day, blood samples were collected from the ocular venous plexi of the mice to titrate the antibodies. The samples, which were collected without anticoagulant, were centrifuged at 5000 rpm at room temperature and the sera were stored at -20°C until use.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Analysis of the proteins in the dorsal and stinger extracts from *P. aiereba*, *P. iwamae*, *P. motoro*, *P. orbignyi* and *P. schroederi* was performed by SDS-PAGE following Laemmli (1970) with a 14% resolving gel and 5% stacking gel at 100 mV for approximately 3 h. A total of 50 µg of protein was used from each sample in the proportion 1:1 (v/v) with nonreducing sample buffer. The following proteins (7 µL each) were used as molecular weight markers: myosin (203 kDa), β-galactosidase (114 kDa), bovine serum albumin (73 kDa), ovalbumin (47 kDa), carbonic anhydrase (34 kDa), soybean trypsin inhibitor (27 kDa), lysozyme (18 kDa) and aprotinin (6 kDa) (Bio Rad® Prestained Broad Range SDS-PAGE Standards, USA, catalog no. 161–0318). The protein bands were visualized by staining the gels for 24 h in a solution containing 450 ml of ethanol p.a., 450 ml of distilled water, 100 ml of glacial acetic acid p.a. and Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad®, USA, cat # 161–0400). The same solution but without Coomassie Blue was used to destain the gel.

Zymography

Zymography was used to test for gelatinolytic enzymes in the dorsal and stinger extracts from *P. aiereba*, *P. iwamae*, *P. motoro*, *P. orbignyi* and *P. schroederi* following Monteiro-dos-Santos *et al.* (2011). SDS-PAGE was performed under the same conditions as those described previously, but with gelatin at a concentration of 2 mg/mL incorporated into the gel. After the run, the gels were washed for 30 min in buffer solution containing 50 mM Tris-HCl, 5 mM calcium chloride and 2.5% Triton X-100. After the wash, the gels were immersed in the incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM calcium chloride, 2.5% Triton X-100 and 0.02% sodium azide) at 37 °C for 16 h. The gel was then stained for 24 h in Coomassie Blue and gently destained for 30 min. The presence of transparent bands in the gels indicated proteolytic activity.

Detection of cross-reactivity by western blot

Western blot was performed following Dos-Santos *et al.* (1989), to investigate whether the two sera (APmD and APmS) cross reacted with the stinger and dorsal extracts from *P. aiereba*, *P. iwamae*, *P. orbignyi* and *P. schroederi*. The samples were separated by SDS-PAGE, and after the run, the proteins in the gel

were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad®, USA, cat # 162–0115) using a Mini Trans-Blot® cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) at 200 mA for three hours. The membranes were then blocked for 24 h at 4 °C with 5% Molico® skim milk (Nestlé) in a phosphate-buffered saline pH 7.5 (PBS) solution and incubated with the APmD or APmS sera for one hour at room temperature. After five washes with PBS, they were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific®) for over an hour, washed five times with PBS and the antigen–antibody reaction was visualized by using H₂O₂ as substrate and 3,3'-diaminobenzidine (DAB – Bio-Rad®) as chromogen, both diluted in PBS.

Antibody titration by dot-ELISA

Antibody titration was performed following Towbin and Gordon (1984). Dorsal and stinger extracts from *P. aiereba*, *P. iwamae*, *P. motoro*, *P. orbignyi* and *P. schroederi* (2 µL containing 2 µg of protein) were applied to stripes of nitrocellulose membranes. The membranes were then placed in 5% Molico® skim milk (Nestlé) for 24 h at 4 °C to block unspecific binding sites. Serial dilutions of APmD or APmS in PBS were added to each membrane (1:1.000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16.000, 1:32.000, 1:64.000, 1:128.00 and 1:256.000), and the membranes were incubated for one hour with APmD or APmS. They were then washed five times with PBS, incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific®) for over an hour and washed five times with PBS. Antigen–antibody reactions were visualized as described above.

Results

Protein and enzyme profiles

All the dorsal and stinger extracts from *P. motoro*, *P. orbignyi*, *P. schroederi*, *P. aiereba* and *P. iwamae* produced various protein bands, the majority between 6 and 27 kDa (Figure 3) and a weak 114 kDa band. The protein profiles for the dorsal extracts from *P. schroederi* and *P. aiereba* were different from those for the stinger extracts.

Figure 4 shows the results of zymography. All the extracts contained enzymes that could cleave gelatin, the majority between 73 and 203 kDa. However, the dorsal and stinger extracts from *P. motoro* and *P. iwamae* had more enzymes with gelatinolytic activity, especially an intense and diffuse 18 kDa band.

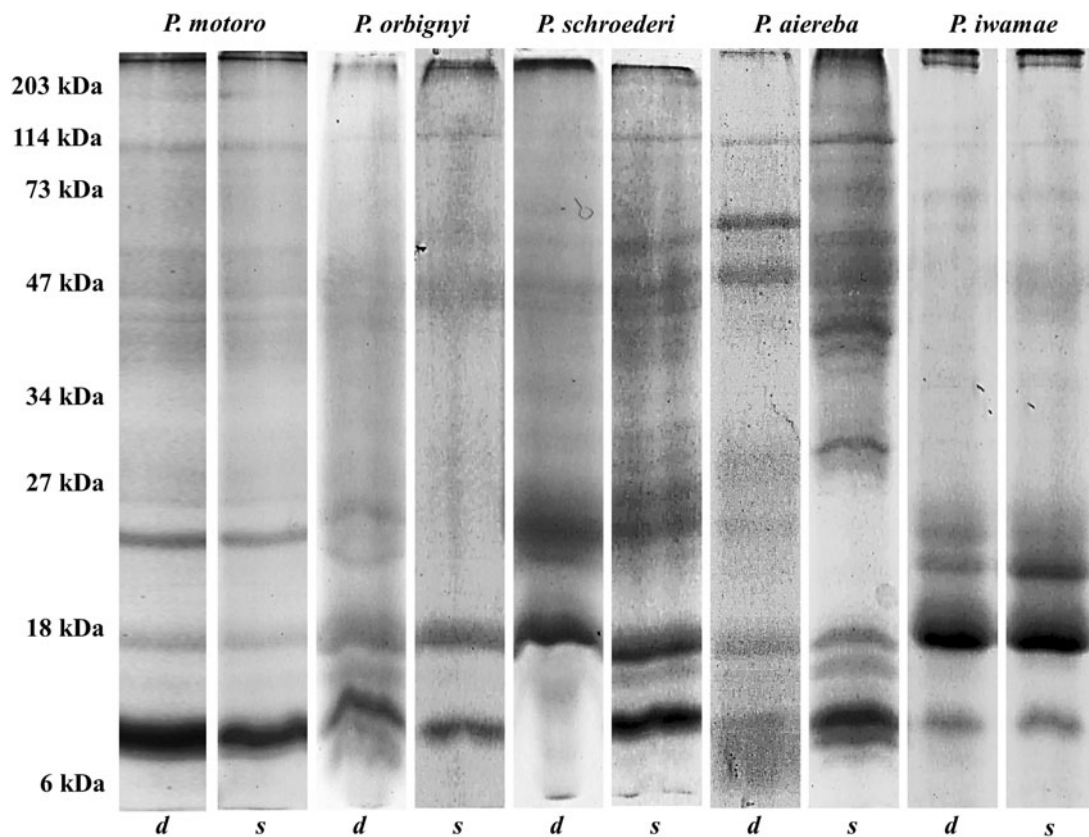


Figure 3. SDS-PAGE electrophoretic profiles of dorsal and stinger extracts from *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi*, *Paratygon aiereba* and *Plesiotrygon iwamae*. *d* = dorsal extract. *s* = stinger extract.

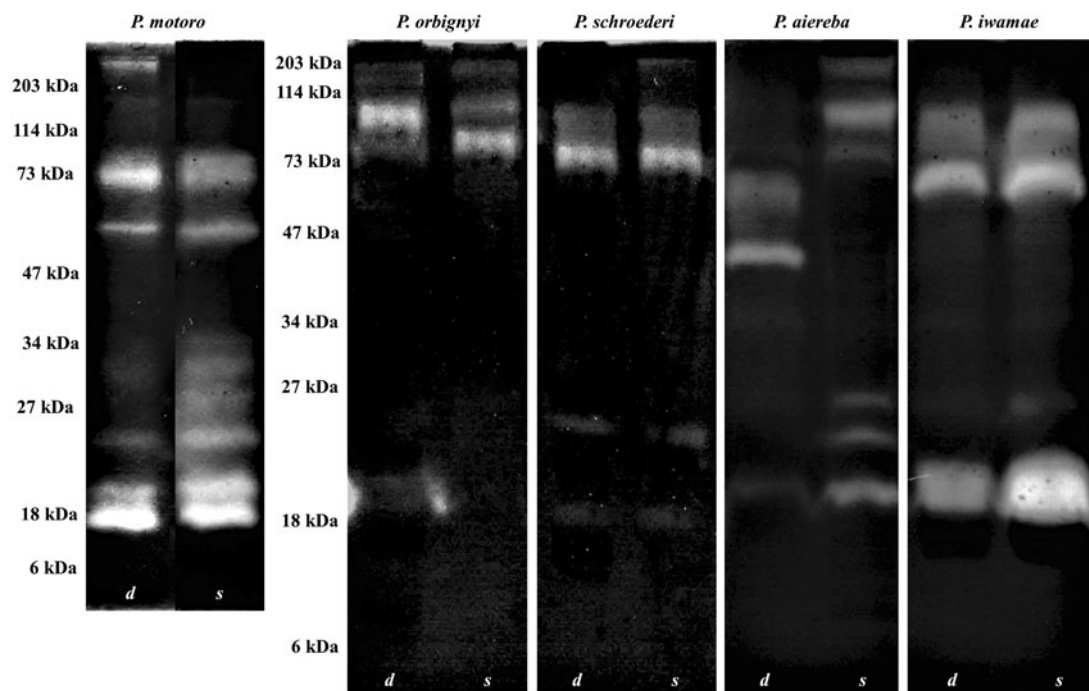


Figure 4. Zymogram showing gelatinolytic components of dorsal and stinger extracts from *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon schroederi*, *Potamotrygon orbignyi*, *Paratygon aiereba* and *Plesiotrygon iwamae*. *d* = dorsal extract. *s* = stinger extract.

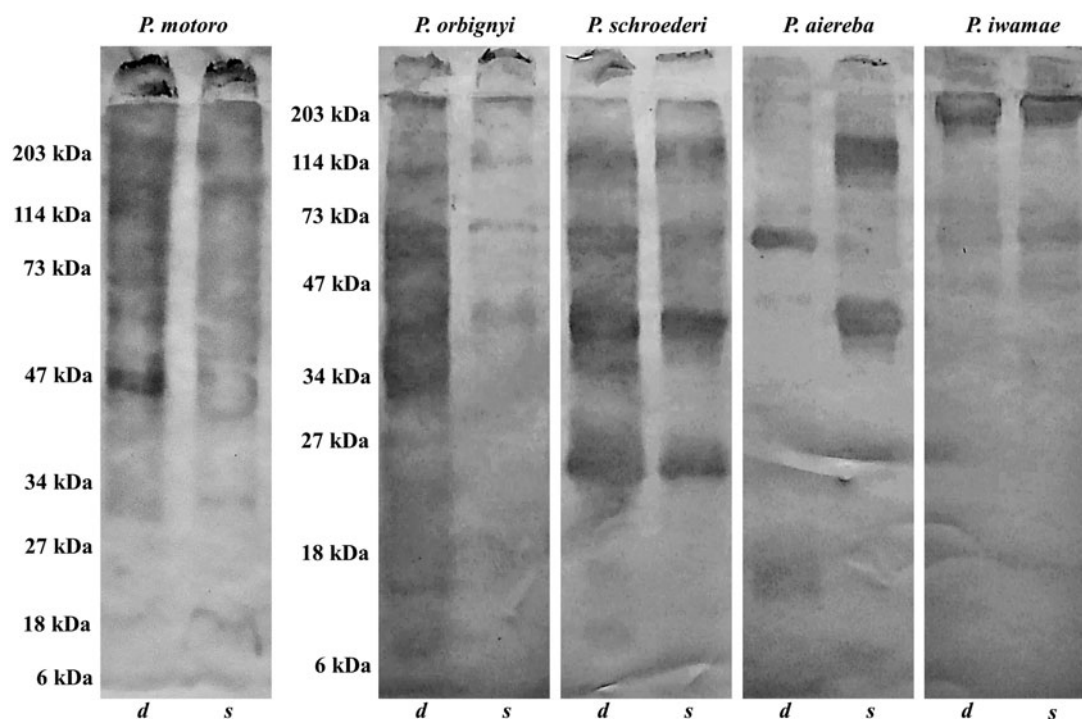


Figure 5. Western blot showing cross-reactivity between APmD antibodies and dorsal and stinger extracts from *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi*, *Paratygon aiereba* and *Plesiotrygon iwamae*. d = dorsal extract. s = stinger extract.

Cross reactivity

Figure 5 shows that the antibodies in the APmD-recognized proteins in the dorsal and stinger extracts from all species studied, mainly above 27 kDa. A protein band with a molecular mass of approximately 70 kDa was visible for all the homologous and heterologous extracts apart from the extract from the stinger of *P. aiereba*. For the genus *Potamotrygon*, 40 kDa bands and those above 114 kDa were observed for all the extracts, including the extract from the stinger of *P. aiereba*. A band of approximately 20 kDa was visible only in the extracts from *P. schroederi*. Bands corresponding to molecular masses of more than 203 kDa were also observed.

Figure 6 shows the cross reactions between the APmS antibodies and the dorsal and stinger extracts from *P. orbignyi*, *P. schroederi*, *P. aiereba* and *P. iwamae*. The APmS antibodies reacted with the same protein bands as the APmD antibodies, but more intensely, and showed the low-molecular-mass bands more clearly, particularly those with the homologous antigens (*P. motoro*). The APmS and APmD antibodies failed to recognize most bands with a molecular weight of less than 27 kDa in all the extracts analyzed. This is a very important point, as these components may be toxic and contribute to envenomation by freshwater stingrays.

Titration of antibodies in APmD and APmS

APmD and APmS had high titers of antibodies against homologous and heterologous antigens. However, the titers for APmS were higher than those for APmD apart from the titer with dorsal extract of *P. iwamae*.

The highest titers using APmD (Table 1) were observed with stinger extracts from *P. orbignyi* and dorsal extracts from *P. iwamae* (1:128,000), and the lowest with dorsal extracts from *P. schroederi* and *P. aiereba* and stinger extracts from *P. aiereba* and *P. iwamae* (1:32,000). While APmS had higher titers against dorsal extract from rays of the same species and stinger extracts from rays of the same genus, *P. orbignyi* and *P. schroederi* (1:256,000), cross reactivity with *P. schroederi* dorsal extract and *P. iwamae* dorsal and stinger extract was less intense (1:64,000).

Discussion

Lameiras *et al.* (2014) showed that dorsal and stinger extracts from *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* from the Solimões River induced systemic rhabdomyolysis in Balb/c mice. Histopathological analysis after 24 h showed coagulative tissue necrosis, muscle fiber regeneration and the presence of inflammatory infiltrates including neutrophils, macrophages and a small number of eosinophils and lymphocytes.

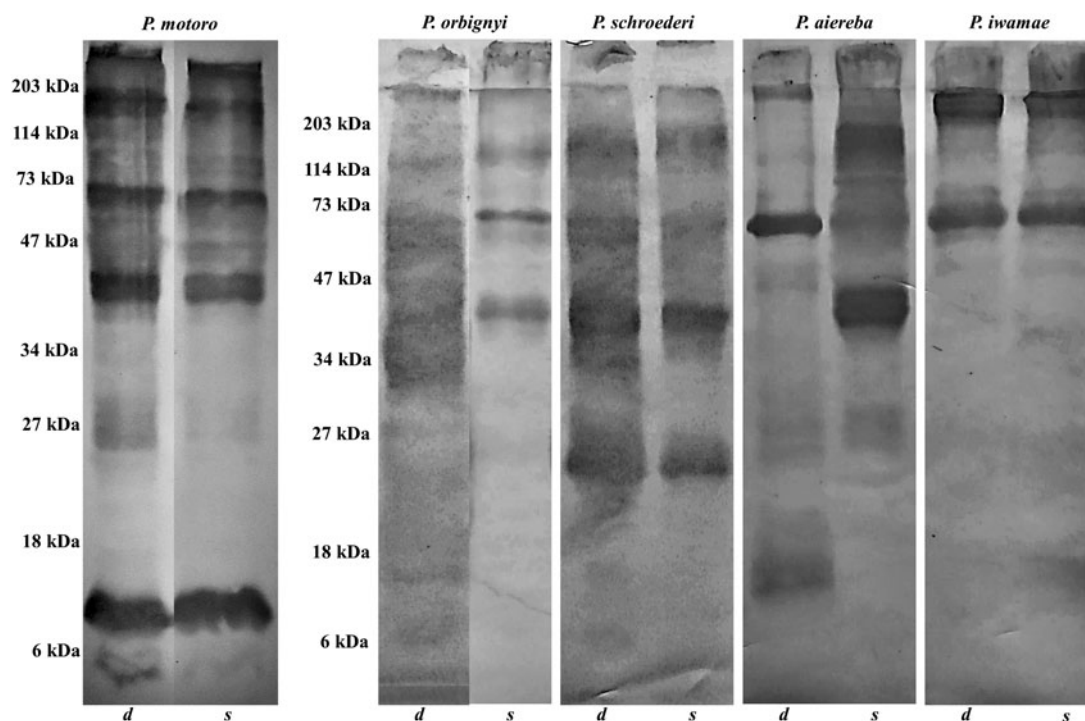


Figure 6. Western blot showing cross-reactivity between APmS antibodies and dorsal and stinger extracts from *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi*, *Paratrygon aiereba* and *Plesiotrygon iwamae*. *d* = dorsal extract. *s* = stinger extract.

Table 1. APmD and APmS antibody titrations.

Type of extract and species	Anti- <i>P. motoro</i> dorsal serum*	Anti- <i>P. motoro</i> stinger serum*
<i>Potamotrygon motoro</i> stinger extract	1:64,000	1:128,000
<i>Potamotrygon motoro</i> dorsal extract	1:64,000	1:256,000
<i>Potamotrygon orbignyi</i> stinger extract	1:128,000	1:256,000
<i>Potamotrygon orbignyi</i> dorsal extract	1:64,000	1:128,000
<i>Potamotrygon schroederi</i> stinger extract	1:64,000	1:256,000
<i>Potamotrygon schroederi</i> dorsal extract	1:32,000	1:64,000
<i>Paratrygon aiereba</i> stinger extract	1:32,000	1:128,000
<i>Paratrygon aiereba</i> dorsal extract	1:32,000	1:128,000
<i>Plesiotrygon iwamae</i> stinger extract	1:32,000	1:64,000
<i>Plesiotrygon iwamae</i> dorsal extract	1:128,000	1:64,000

*Values correspond to the endpoints of the titrations.

In a study with Swiss mice, Barbaro *et al.* (2007), found that *Potamotrygon falkneri* extract induced myotoxicity, which was reflected in an increase in serum total creatine kinase (CK) activity.

One of the few reports of the myotoxic activity of stingray venom in human was published by Masson *et al.* (2012). Myotoxic activity was evidenced by the increase in serum total CK and CK-MB (heart muscle) activity in an individual injured in the arm by a marine stingray probably of *Dasyatis* family. The authors also showed an increase in C-reactive protein, suggesting a systemic inflammatory response. Like the finding of myotoxicity in mice in a previous study by our group Lameiras *et al.* (2014), their findings indicate possible systemic myotoxicity in humans.

As systemic rhabdomyolysis can lead to complications such as acute kidney failure and as there is no effective treatment or specific antivenom for victims of envenomations involving freshwater stingrays, we decided to develop hyperimmune sera using dorsal and stinger extracts from *P. motoro*. This species was chosen because it has the widest geographic distribution of all the potamotrygonins and is found in most South American freshwater systems, such as the basins of the Amazon, Orinoco, Paraná-Paraguay and Uruguay Rivers, as well as the Mearim system in the north of Brazil (Loboda and Carvalho 2013).

Dorsal extract from freshwater stingrays has a similar chemical composition to that of stinger extract and can induce the same effects when tested *in vivo*

(Monteiro-dos-Santos *et al.* 2011, Lameiras *et al.* 2014). For this reason and because it can be obtained in larger quantities, dorsal extract was also investigated in the present study.

The intense inflammatory reaction observed in envenomations involving freshwater stingrays suggests that homeostasis of the extracellular matrix is disturbed, probably because of the many proteolytic components in the venom of these stingrays (Barbaro *et al.* 2007). We found gelatinolytic enzymes in dorsal and stinger extracts from all the stingrays investigated, corroborating the findings of other studies (Haddad Jr. *et al.* 2004, Barbaro *et al.* 2007, Monteiro-dos-Santos *et al.* 2011). These authors suggest that the venom of freshwater stingrays may break down the proteins in conjunctive tissue and the extracellular matrix, leading to tissue lesion and inducing the release of mediators involved in nociception.

Magalhães *et al.* (2006) found that under non-reducing conditions the electrophoretic profile of stinger mucus from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* has a broad band starting at 15 kDa and two separate bands, one at 66.2 kDa and another close to 25 kDa. We obtained similar results, as *P. orbignyi* stinger extract had an intense band at around 18 kDa. However, we observed another intense diffuse band at around 10 kDa. SDS-PAGE of *Potamotrygon falkneri* stinger extract (Haddad Jr. *et al.* 2004, Barbaro *et al.* 2007, Oliveira 2015) under nonreducing conditions revealed protein bands at 12 and 22 kDa, an intense and diffuse band between 43 and 65 kDa and various other components between 15 and 130 kDa, as well as gelatinolytic and caseinolytic components with molecular masses above 80 and 100 kDa. These studies corroborate our results as we found that all the dorsal and stinger extracts from all the stingrays studied had more intense protein bands between 6 and 27 kDa and many proteolytic components above 73 kDa.

Studies with marine stingrays also report the presence of various high-molecular-mass proteolytic components in stinger mucus (Barbaro *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2011, Vennila *et al.* 2011), as observed in the protein profiles of freshwater stingrays in the present study and that such components are found in the mucus covering these animals. These similarities could be justified by the recent evolutionary history of the potamotrygonins, which diversified in the South American freshwater environment (Thorson *et al.* 1983, Lovejoy 1996, Carvalho *et al.* 2004, 2011) from a sister group of the genus *Styracura* during marine incursions in the Miocene approximately 20 million years ago (Lovejoy *et al.* 1998, 2006, Carvalho *et al.* 2016). This could also justify the similarities between the protein

profiles of the different genera of freshwater stingrays in the present study.

An interesting finding of the present study was that protein profiles of stingray venoms, like those of snake venoms (Chippaux *et al.* 1991), vary between populations from different locations. This was observed for the extracts from *P. motoro*, for which the electrophoretic profiles differed from those observed by Magalhães *et al.* (2008) and Lameiras *et al.* (2014).

Both *P. motoro* extracts were immunogenic and induced high levels of antibodies, which reacted strongly with homologous and heterologous antigens, as observed in a study using dorsal and stinger mucus of *P. aiereba* (Thomazi 2016) and in a study of antigenic cross-reactivity between *P. falkneri* and *Hypanus guttatus* tissue extracts (Barbaro *et al.* 2007). In our findings, while these antibodies reacted more strongly with high-molecular-mass proteins in all dorsal and stinger extracts studied, proteins below 27 kDa, although detected by electrophoresis and zymography were only weakly recognized by the antibodies in the WB, as seen in Barbaro *et al.* (2007). Nevertheless, as antibody titer does not indicate the effectiveness of neutralization, *in vivo* tests are required to evaluate the power of these sera against the local and likely systemic effects induced by freshwater stingrays venom.

Considering that the dorsal extract was as immunogenic as the stinger extract, inducing the production of antibodies which recognizing stinger venom antigens, can induce envenomation in *in vivo* tests, can be obtained in larger quantities and it is easier to collect, reducing the risk of envenomation to the researcher, it could be used as an alternative to stinger extract (or along with it) in the production of biologicals for studies on potential treatments for victims of freshwater stingray envenomation.

Acknowledgements

This article is part of a doctoral thesis presented by JLVF for the Multi-institutional Postgraduate Program in Biotechnology at the Federal University of Amazonas.

The authors would like to thank PhD Akemi Shibuya of the National Research Institute of Amazonia (INPA) and PhD Wallace Duncan of Federal University of Amazonas (UFAM) for ceding photos of the freshwater stingray specimens. We also want to thank MSc. Erlane José Rodrigues da Cunha Antônio of the Emílio Goeldi Paraense Museum of Federal University of Pará (UFPA) for drawing the map and PhD José Lapa of the Amazon Biotechnology Center (CBA) animal colony for his invaluable aid and for providing the necessary conditions for the study to be carried out.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

JLVL was a recipient of a doctoral fellowship from CAPES. MCS is a recipient of a CNPq-PQ grant (ref. nos. 303786/2013–2 and 303032/2016–2).

ORCID

Juliana Luiza Varjão Lameiras  <http://orcid.org/0000-0001-7034-4632>

References

- Barbaro, K.C., et al., 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.
- Carvalho, M.R., 2016. Neotropical stingrays: family Potamotrygonidae. In P.R. Last, et al. (eds.) *Rays of the world*. 1st ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 619–655.
- Carvalho, M.R., Loboda, T.S., and Silva, J.P.C.B., 2016. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, *Styracura*, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941)(Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Zootaxa*, 4175, 201–221.
- Carvalho, M.R., Maisey, J.G., and Grande, L., 2004. 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*, 284, 1–136.
- Carvalho, M.R., Perez, M.H.S., and Lovejoy, N.R., 2011. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandez-Yépez, 1958 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, 2827, 1–30.
- Chippaux, J.P., Williams, V., and White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29, 1279–1303.
- Dos-Santos, M.C., et al., 1989. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon*, 27, 297–303.
- Dos-Santos, M.C., et al., 1988. Phospholipase A₂ injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 26, 207–213.
- Ericsson, C.D., et al., 2006. Medically important venomous animals: biology, prevention, first aid, and clinical management. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1309–1317.
- Neto, D.G., and Haddad, V., Jr., 2009. Acidentes por raias. In J.L.C. Cardoso, et al. (eds.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2nd ed. São Paulo, Brasil: Sarvier, 295–313.
- Neto, D.G., and Haddad, V., Jr., 2010. Arraías 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.
- Haddad, V., Jr., et al., 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.
- Kimura, L.F., et al., 2014. Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 239, 601–609.
- Kumar, K.R., et al., 2011. Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. *J Thromb Thrombolysis*, 31, 464–471.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lameiras, J.L.V., et al., 2013. Arraías de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes. *Scientia Amazonia*, 2, 11–27.
- Lameiras, J.L.V., et al., 2014. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. *Toxicon*, 77, 105–113.
- Loboda, T.S., and Carvalho, M.R., 2013. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 11, 693–737.
- Lovejoy, N.R., 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 117, 207–257.
- Lovejoy, N.R., Albert, J.S., and Crampton, W.G.R., 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21, 5–13.
- Lovejoy, N.R., Bermingham, E., and Martin, A.P., 1998. Marine incursion into South America. *Nature*, 396, 421–422.
- Magalhães, K.W., et al., 2006. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon*, 47, 575–583.
- Magalhães, M.R., Da Silva, N.J., Jr., and Ulhoa, C.J., 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon:Official Journal of the International Society on Toxinology*, 51, 1060–1067.
- Masson, A.A., Ormonde Do Carmo, P.H.A., and 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., et al., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. *henlei*. *International Immunopharmacology*, 11, 1368–1377.
- Monteiro, W.M., et al., 2016. Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 49, 389–392.
- Oliveira, L. P., 2015. *Avaliação da citotoxicidade do extrato do ferrão de arraia Potamotrygon falkneri (Myliobatiformes: Potamotrygonidae)*. Masters dissertation. Brasil: Universidade de Brasília.
- Pardal, P. P. O., and Gadelha, MaC., 2010. *Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas*, 2. ed. Belém: Pará.
- Rosa, R.S., Charvet-Almeida, P., and Quijada, C.C.D., 2010. 241–286. Biology of the South American Potamotrygonid stingrays. In J.C. Carrier, J.A. Musick & M.R. Heithaus (eds.) *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptative physiology and conservation*. 1st ed. United States: CRC Press.
- Sá-Oliveira, J.C., Costa, E.A., and Pena, F.P.S., 2011. Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. *Biota Amazônia*, 1, 74–78.
- Silva-Jr, N.J., et al., 2015. A severe accident caused by an Ocellate River stingray (*Potamotrygon motoro*) in Central Brazil: how well do we really understand stingray venom chemistry, envenomation, and therapeutics? *Toxins*, 7, 2272–2288.
- Thomazi, G. O. C., 2016. *Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ⁶⁰Co da raia de água doce Paratrygon aier-ea*. Doctoral thesis. Universidade de São Paulo.
- Thorson, T.B., Brooks, D.R., and Mayes, M.A., 1983. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *National Geographic Society Research Reports*, 15, 663–694.
- Towbin, H., and Gordon, J., 1984. Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *Journal of Immunological Methods*, 72, 313–340.
- Vennila, R., et al., 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingrays. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, S239–S243.
- Zhao, X., Findly, R.C., and Dickerson, H.W., 2008. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 500–508.

CAPÍTULO III

Artigo de pesquisa de acordo com as normas da revista científica *Toxicon* (ISSN: 0041-0101), que será submetido à publicação após sugestões da banca e tradução para a língua inglesa.

Neutralização das atividades edematogênica e miotóxica, induzidas pela peçonha de *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes – Potamotrygoninae), por soros hiperimunes experimentais

Juliana Luiza Varjão Lameiras^{a, i*}, Valéria Mourão de Moura^b, Lucas Castanhola Dias^c, Evandro Rezende Pessoa Júnior^d, Cacilda Satomi Yano Mallman^e, Allyson Guimarães da Costa^f, Michella Lima Lasmar^g, Cecilia Veronica Nunez^h, Oscar Tadeu Ferreira da Costa^d, Maria Cristina Dos-Santosⁱ

^a Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará. Avenida Mendonça Furtado, 2949, CEP 68040-470, Santarém, Pará, Brasil.

^c Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Avenida André Araújo, 2936, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil.

^d Laboratório de Microscopia Quantitativa (LaMiq), Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas. Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.

^e Hospital Universitário Getúlio Vargas, Universidade Federal do Amazonas, Conselho de Ensino e Pesquisa. Avenida Apuriná, 04, Praça 14 de janeiro, CEP 69020-170, Manaus, Amazonas, Brasil

^f Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Av. Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, CEP 69040-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

^g GT de Ações de Ensino, Extensão e Pesquisa Apoiadas em Tecnologia, Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas. Av. Darcy Vargas, 1.200, Parque Dez de Novembro, CEP 69050-020, Manaus, Amazonas, Brasil.

^h Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, CEP 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil

ⁱ Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, CEP 69077-000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil.

* Corresponding Author: +55 92 98242-3066. E-mail: julameiras@hotmail.com.

Resumo

Arraias de água doce são peixes cartilagosos providos de ferrões na base da cauda. O ferrão é coberto por epitélio contendo glândulas mucosas e de veneno. Humanos costumam sofrer envenenamentos por estas arraias geralmente quando pisam no dorso do animal, escondido sob a areia. Consequentemente, a arraia introduz o ferrão na vítima, causando um ferimento extremamente dolorido, que geralmente leva à necrose do tecido. O tratamento é baseado no uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos, pois ainda não existe um antiveneno específico para os envenenamentos por arraias de água doce. Pelo exposto, o presente estudo teve por objetivo analisar a neutralização das atividades edematogênica e miotóxica induzidas pela peçonha da arraia *Potamotrygon motoro* por meio de dois protocolos: o de soroneutralização, utilizando os soros de camundongos hiperimunes antidorso ou antiferrão de *P. motoro* ou de vacinação com os extratos do dorso ou do ferrão dessa espécie. O protocolo de soroneutralização consistiu em injetar a peçonha via intramuscular (gastrocnêmio), e, em seguida, administrar ou o soro antidorso ou o soro antiferrão via plexo venoso oftálmico. Já o protocolo de vacinação consistiu em imunizar os camundongos com o extrato do dorso ou do ferrão adsorvidos em hidróxido de alumínio e desafiá-los com a peçonha via intramuscular. Os gastrocnêmios foram removidos para análise histopatológica e esterológica e o sangue, coletado via plexo venoso oftálmico para dosagem de citocinas, PCR e CK. Os protocolos de soroneutralização e vacinação com os soros antidorso e antiferrão não neutralizaram as atividades edematogênica e miotóxica sob as condições experimentais adotadas. A rabdomiólise sistêmica só foi neutralizada 100% nos animais vacinados com o extrato do ferrão. A análise das citocinas indicou que o protocolo de soroneutralização induziu a liberação de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, enquanto o protocolo de vacinação induziu a uma resposta Th1.

Palavras-chave: *Potamotrygon*, arraias de água doce, envenenamentos, soro, ferrão, soroneutralização.

1. Introdução

Arraias de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygoninae) são peixes de hábito bentônico que possuem de um a três ferrões na base da cauda. O ferrão é uma estrutura afiada, alongada e mineralizada, derivada de dentículo dérmico modificado (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009), retro-serrada bilateralmente e coberta por um epitélio contendo células produtoras de proteínas que induzem à dor, inflamação e necrose (Pedroso et al., 2007; Silva-Jr. et al., 2015).

Os acidentes com arraias geralmente acontecem quando as pessoas, ao realizar alguma atividade à beira da praia, pisam no animal, escondido sob a areia do rio (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Nesse momento, a arraia movimenta a cauda em comportamento defensivo, introduzindo, assim, o ferrão na vítima e causando uma laceração irregular (Magalhães et al., 2006).

Os envenenamentos por arraias de água doce se caracterizam pela ação inflamatória intensa (Antoniazzi et al., 2011; Kimura et al., 2014). As vítimas quase sempre se queixam de dor lancinante, desproporcional ao tamanho da lesão (Pardal and Gadelha, 2010). Inicialmente, o ferimento apresenta eritema e edema e, em pouco tempo, surge uma necrose, causando flacidez do tecido e formação de uma úlcera que evolui lentamente (Magalhães et al., 2008). O processo de cicatrização costuma ser longo e difícil, podendo durar meses (Haddad Jr. et al., 2013). Os pacientes também podem apresentar complicações como náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular e convulsões (Haddad Jr. et al., 2004). Como um fator agravante, o ferrão pode quebrar no momento do acidente e provocar a retenção de fragmentos no ferimento (Haddad Jr. et al., 2004). Geralmente, as vítimas ficam com cicatrizes ou sequelas (Haddad Jr. et al., 2004; Garrone Neto and Haddad Jr., 2010; Abati et al., 2017). Em casos onde não há tratamento adequado, pode ocorrer até amputação do membro afetado (Sá-Oliveira et al., 2011; Monteiro et al., 2016). Lesões letais raramente ocorrem, exceto em casos onde o ferrão atinge órgãos vitais (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009).

Ainda que sejam pouco letais, os envenenamentos são extremamente dolorosos e desagradáveis, pois podem deixar a pessoa incapacitada por meses (Haddad Jr. et al., 2013). Como geralmente ocorrem em áreas remotas, quase nunca são relatados, e, em muitos casos, não são tratados corretamente ou são tratados apenas com medicina tradicional (Haddad Jr., 2008; Haddad Jr. et al., 2013). As pessoas acabam buscando soluções caseiras para minimizar os sintomas clínicos, como o uso de ervas medicinais, óleos e cascas vegetais, sebo de carneiro, borra de café, seiva de bananeira, limão, álcool, e até mesmo diesel, querosene ou gasolina (Sá-Oliveira et al., 2011; Lameiras et al., 2013; Costa, 2017). Obviamente, esses tratamentos não são recomendados, pois podem agravar a lesão (Sá-Oliveira et al., 2011; Lameiras et al., 2013).

Até o momento, não há antiveneno específico para o tratamento das lesões em envenenamentos por arraias. A abordagem terapêutica é sintomática, baseada no uso água morna para aliviar a dor, analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos para prevenir infecção secundária (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009).

Embora os procedimentos médicos sejam capazes de controlar o quadro clínico dos pacientes, a neutralização das toxinas seria a conduta ideal para impedir a indução dos sintomas (Garrone Neto and Haddad Jr., 2009). Segundo recomendação da WHO (2007), a soroterapia é o tratamento mais indicado para indivíduos acidentados por animais peçonhentos. Existem estudos mostrando a eficácia de soros experimentais em neutralizar a

peçonha de alguns peixes (teleósteos), como o niquim (*Thalassophryne nattereri*) (Lopes-Ferreira et al., 1998; Lopes-Ferreira et al., 2000), o peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) (Gomes et al., 2011) e já existem soros sendo produzidos comercialmente, como no caso do peixe-pedra (*Synanceia* sp.) (Darlene and Phee-Kheng, 2013; Ziegman and Alewood, 2015).

Em relação aos estudos com soro contra peçonha de arraia, Russell (1972) observou a neutralização da letalidade da peçonha da arraia *Urobatris halleri*, em camundongos, com soro de cavalo contra os venenos das arraias marinhas *Myliobatis californicus* e *Urobatris castexi*. Quanto às pesquisas voltadas para soro contra a peçonha das arraias de água doce, estudos apontam que a peçonha é imunogênica, induzindo a altos títulos de anticorpos que possuem reatividade cruzada, *in vitro*, com a peçonha de outras espécies de arraias de água e uma espécie marinha (Barbaro et al., 2007; Thomazi, 2016; Lameiras et al., 2017).

Pelo exposto, o presente estudo teve por objetivo analisar a neutralização das atividades edematogênica e miotóxica induzidas pela peçonha da arraia de água doce *P. motoro* por meio de soros hiperimunes ou da vacinação a partir do extrato de muco que recobre o dorso ou o ferrão do animal, uma vez que o soro antidorso reconhece componentes presentes no extrato do ferrão (Lameiras et al., 2017).

2. Material e métodos

2.1 Coleta e preparo dos venenos

A autorização para coletar as arraias de água doce foi fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade a Biodiversidade – SISBIO (ref. no.45289-2). Os espécimes de *Potamotrygon motoro* (n=14) foram coletados no Rio Solimões, Paraná do Curarizinho (3°18'42.6"S 59°59'02.4"W), Município de Careiro da Várzea. A região dorsal e o ferrão das arraias foram raspados separadamente com um bisturi e o material coletado foi transportado em nitrogênio líquido. Após, as amostras foram misturadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,4) e centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram liofilizados e armazenados em -20° C até o uso. As concentrações de proteína das amostras foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como proteína padrão.

2.2 Animais dos experimentos

Para a realização dos experimentos, foram usados camundongos Balb/c fêmeas, provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, com acesso à água e alimento *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do INPA (ref. no. 018/2014). Os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com 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).

2.3 Obtenção dos antivenenos

Para a produção dos soros hiperimunes antidorso (SAD) e antiferrão (SAF) de *P. motoro*, foram usados 20 camundongos Balb/c entre cento e oitenta e duzentos e dez dias de idade. Um grupo (n=10) recebeu extrato de tecido e muco do dorso de *P. motoro* (200 µg) adsorvido em hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] utilizado como adjuvante e o outro grupo (n=10) recebeu o extrato de muco e tecido do ferrão (peçonha) de *P. motoro* (200 µg) também adsorvido em Al(OH)₃. A dose de imunização e as doses reforço foram administradas por via subcutânea a cada sete dias de acordo com Dos-Santos et al. (1988), totalizando 5 doses. No 29º dia, amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante pelo plexo venoso oftálmico dos camundongos para a obtenção dos soros e titulação dos anticorpos dos mesmos por Dot-ELISA, de acordo com Towbin and Gordon (1984) e modificado por de Lameiras et al. (2017). Após, os camundongos foram eutanasiados com 100 µl de solução de cetamina 5% e xilazina 2% 1:1 (v/v) via intraperitoneal. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos, à temperatura ambiente e os soros foram armazenados em -20° C até o uso.

2.4 Cinética da formação do edema e obtenção da dose mínima edematogênica (DME)

Para a cinética da formação do edema e determinação da DME para o experimento de neutralização do edema pelo SAD ou SAF, camundongos Balb/c (n=4/grupo) provenientes do Biotério Central do INPA, receberam, na pata traseira direita (i.pl.), amostras de 50 µl dos extratos do ferrão de *P. motoro*, nas doses de 5, 10 e 15 µg, e, na pata esquerda, 50 µl de salina estéril (veículo). O edema foi quantificado pelas medidas das espessuras das patas traseiras direita e esquerda nos tempos de 20 e 35 minutos, uma hora, uma hora e trinta

minutos, quatro e vinte e quatro horas após a injeção do extrato do ferrão, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana, SP, Brasil). Os valores em mm foram transformados em porcentagem pela equação:

$$\text{Edema (\%)} = \frac{\text{Epd} - \text{Epe}}{\text{Epe} \times 100}$$

Onde Epd é a espessura da pata direita e Epe é a espessura da pata esquerda.

2.5 Neutralização da atividade edematogênica

Para verificar a eficácia do SAD ou SAF em neutralizar a atividade edematogênica, camundongos Balb/c fêmeas (n=4/grupo) foram injetados com 50 µl contendo duas DME (30 µg) do extrato do ferrão de *P. motoro* (via i.p.) na pata traseira direita e, na pata esquerda, injetados com 50 µl de salina estéril (controle negativo). Pelo plexo oftálmico venoso, um grupo recebeu apenas salina estéril (controle positivo), um recebeu 100 µl do SAD e o outro recebeu 100 µl do SAF. O edema foi quantificado pela medida das espessuras das patas direita e esquerda com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana, SP, Brasil) nos tempos de 20 e 35 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 e 24 horas após as injeções e os valores em mm foram transformados em porcentagem pela equação no item anterior.

2.6 Neutralização da atividade miotóxica

A neutralização da atividade miotóxica pelo SAD ou SAF foi avaliada em camundongos Balb/c fêmeas, conforme desenho experimental da Tabela 1 (n=4/grupo). A dose ministrada nos camundongos desafiados com o extrato do ferrão de *P. motoro* foi a de 400 µg, pois é a dose mínima capaz de induzir à reação inflamatória intensa e necrose, conforme Barbaro et al. (2007). No 26º dia de imunização, amostras de sangue foram obtidas via plexo venoso oftálmico para a titulação dos anticorpos por Dot-ELISA dos grupos vacinados com o extrato do dorso (VD) ou do ferrão (VF) frente ao extrato do ferrão de *P. motoro*. No 29º dia, vinte e quatro horas após os tratamentos, amostras de sangue foram obtidas novamente via plexo venoso oftálmico para dosagem de citocinas, creatina cinase (CK) e da Proteína C-reativa (PCR) a partir dos soros. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados com 100 µl de solução de cetamina 5% e xilazina 2% 1:1 (v/v) via

intraperitoneal e os músculos gastrocnêmios direito (músculo teste, que recebeu ou salina ou extrato de ferrão) e esquerdo (músculo contralateral saudável, que não recebeu nenhum tratamento ou veículo, indicador da ação miotóxica sistêmica) de todos os camundongos foram retirados e fixados em formol tamponado 10%, por 5 dias, à temperatura ambiente, para posterior análise histopatológica e estereológica.

Tabela 1. Desenho experimental adotado para a avaliação de neutralização da atividade miotóxica induzida pelo extrato do ferrão de *Potamotrygon motoro* pelo SAD ou SAF.

Tratamentos		1 ^o , 8 ^o , 15 ^o e 22 ^o dia (via subcutânea)	28 ^o dia (via músculo gastrocnêmio direito)
Grupos			
Soroneutralização	Controle negativo (C-)	100µl de salina	50µl de salina
	Controle positivo (C+)	100µl de salina	400µg do extrato do ferrão em 50µL de salina
	Tratamento com o soro antidorso (SAD)	100µl de salina	400µg do extrato do ferrão em 50µL de salina + 100µL de SAD via plexo venoso oftálmico
	Tratamento com o soro antiferrão (SAF)	100µl de salina	400µg de extrato do ferrão em 50µL de salina + 100µL de SAF via plexo venoso oftálmico
	Hidróxido/salina (HS)	50µl de Al(OH) ₃ + 50µl de salina	50µl de salina
Vacinação	Hidróxido/salina + veneno (HSV)	50µl de Al(OH) ₃ + 50µl de salina	400µg de extrato do ferrão em 50µL de salina
	Vacinação com o extrato do dorso (VD)	30µg do extrato do dorso em 100µl de Al(OH) ₃	400µg de extrato do ferrão 50µL de salina
	Vacinação com o extrato do ferrão (VF)	30µg do extrato do ferrão em 100µl de Al(OH) ₃	400µg de extrato do ferrão 50µL de salina

2.6.1 Densidade de volume (volume relativo, Vv) – análise histopatológica e estereológica

Após o período de fixação, todos os músculos coletados foram processados histologicamente e emblocados em historesina (Technovit[®] 7100 [2-hydroxyethyl methacrylate], Heraeus Kulzer, Germany). Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com H.E (hematoxilina e eosina) para observação e porcentagem do dano tecidual, e azul de toluidina/fucsina para a visualização e contagem de neutrófilos e mastócitos (granulados e não granulados). Todos os procedimentos adotados para o processamento histológico do material estão adaptados de Kiernan (2015).

A porcentagem de dano tecidual foi obtida pelo sistema de contagem de pontos (Howard and 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 (Schneider et al., 2012) 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. 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 na seção histológica. 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 and 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 Leica DM500, câmera Leica ICC50 W.

Na etapa seguinte, cada imagem (10 a 12 por seção) foi quantificada quanto à porcentagem de alterações teciduais observadas. 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. A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (tecido muscular) foi calculada como:

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

Onde V_v é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa) de determinado componente, P_{comp} é a somatória de pontos que tocam determinado componente e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (tecido muscular). Os componentes avaliados foram: rabdomiólise (necrose de coagulação ou liquefativa), derrame hemorrágico, vacuolização (degeneração hidrópica), infiltrado inflamatório agudo e músculo saudável (sem dano tecidual aparente).

Para a quantificação dos mastócitos e células polimorfonucleares (PMNs), as seções foram fotografadas em baixo aumento. Em seguida, utilizando-se o programa ImageJ 1.451,

para evitar possíveis vieses de seleção e aferimento, selecionou-se aleatoriamente campos de vista. Estes foram fotografados em maior aumento, produzindo entre 15 a 20 imagens por animal. As imagens foram codificadas, o que proporcionou uma análise às cegas, de maneira que a pessoa responsável pela contagem não soubesse de qual animal as lâminas pertenciam e não alterassem inconscientemente os valores. Em seguida, um sistema teste composto por molduras (*frames*), área de contagem de $1024 \mu\text{m}^2$, contendo linhas contínuas e tracejadas foi sobreposto as imagens por meio do programa IMOD 4.5. As células observadas no interior da moldura eram contadas somente quando não tocavam as linhas contínuas. Para a diferenciação dos mastócitos degranulados dos granulados, usou-se a técnica descrita por Laufer (2002). Os mastócitos foram considerados degranulados quando apresentavam grânulos salientes a partir da membrana celular, grânulos liberados em vesículas alterando a continuidade da membrana celular, membrana celular rompida com grânulos livres na proximidade ou metacromasia desigual, quando a célula perde a coloração azul-violeta para assumir uma coloração mais clara (tons de rosa).

2.6.2 Análises bioquímicas e dosagem de citocinas

As análises bioquímicas de CK total e PCR das amostras de soro dos camundongos foram realizadas no equipamento automatizado para testes de química clínica Roche[®], modelo Cobas c111, pelo princípio de medição da fotometria de absorbância, uma metodologia comum nas análises de enzimas, substratos e proteínas específicas.

A dosagem de citocinas das amostras de soro foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array) com o Kit BDTM Mouse Th1/Th2/Th17 CBA (Cat. N° 560485, Lot.: 4345943, BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), segundo instruções do fabricante. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α . Para o cálculo das concentrações das citocinas (valores em pg/mL), foi utilizado o software FCAP-ArrayTM (v3.0.1).

2.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas univariadas, utilizou-se o programa Prisma (GraphPad Software, Inc. USA). Todos os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA (análise de variância one-way), exceto o

edema, que foi analisado por meio de ANOVA two-way. O teste paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os tratamentos. As análises foram feitas separadamente para o protocolo de soroneutralização com os soros antidorso e antiferrão de *P. motoro* (SAD e SAF), tendo como controles os grupos C- e C+, e para o protocolo de vacinação com os extratos do dorso e do ferrão de *P. motoro* (VD e VF), tendo o grupo HS (hidróxido + salina) como controle negativo e o grupo HSV (hidróxido + salina + veneno) como controle positivo. Alternativamente, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado quando apropriado. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%. Para as análises estatísticas multivariadas, utilizou-se o programa PAST-Paleontological STatistics, version 3.14 (Hammer, 2013) que reduziu a análise de 18 variáveis para apenas dois componentes principais (PCA). Essa estratégia possibilitou explorar as relações das variáveis deste estudo e seus comportamentos nos diferentes tratamentos. Adicionalmente, foi aplicada análise de agrupamento hierárquico para evidenciar as similaridades entre os tratamentos.

3. Resultados

3.1 Titulação dos soros antidorso e antiferrão

Os soros hiperimunes antidorso e antiferrão (SAD e SAF) produzidos apresentaram anticorpos na titulação de 1:64.000 e estes soros íntegros (sem o isolamento dos anticorpos) foram usados nos experimentos de neutralização das atividades edematogênica e miotóxica induzidas pelo extrato do ferrão de *P. motoro*.

3.2 Cinética e neutralização da atividade edematogênica

A Figura 1A indica a cinética da formação do edema de pata induzido pelo extrato do ferrão de *P. motoro*. O pico do edema ocorreu em 20 minutos após a injeção. A Dose Mínima Edematogênica (DME), que induziu aumento do volume da pata maior que 30% em relação ao do tempo zero (inicial), foi a dose de 15 µg. A dose de desafio para a neutralização do edema pelo SAD e SAF foi de duas vezes a DME (30 µg). Os edemas induzidos pelas doses de 5, 10 e 15 µg não apresentaram diferença estatística nos tempos avaliados, exceto em trinta e cinco minutos, onde a dose de 5 µg induziu a um edema significativamente menor que as doses de 10 e 15 µg ($p = 0,0038$ e $0,0011$, respectivamente). A Figura 1B apresenta a

neutralização da atividade edematogênica pelo SAD e SAF. Os soros não foram capazes de neutralizar a atividade edematogênica induzida pelos 30 µg de extrato do ferrão de *P. motoro* nos tempos observados.

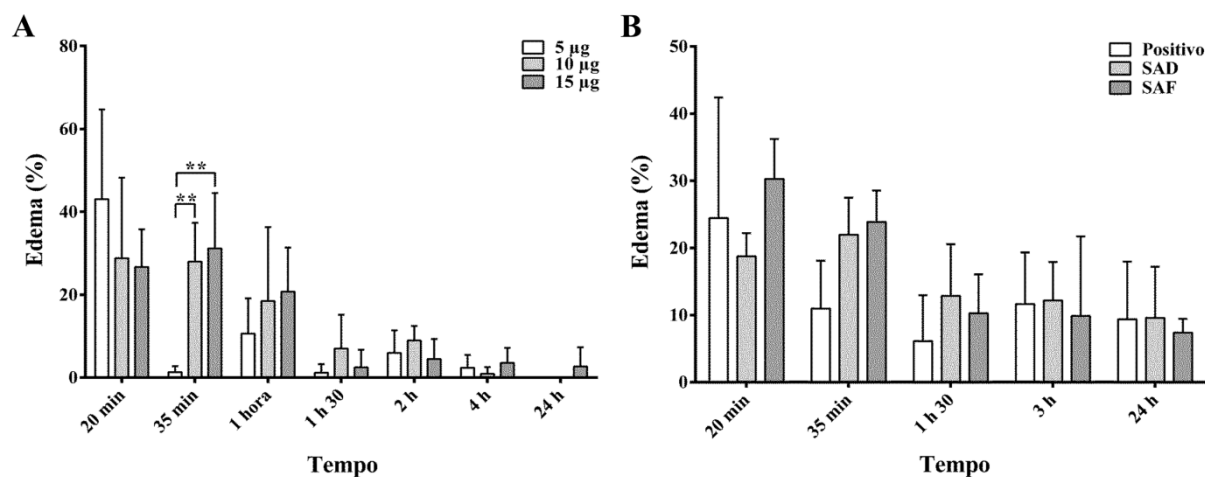


Figura 1. A. Cinética da atividade edematogênica induzida pelo extrato do ferrão de *P. motoro*. B. Neutralização da atividade edematogênica pelos soros antidorso (SAD) e antiferrão (SAF) de *P. motoro*. ** $p \leq 0,01$.

3.3 Neutralização da miotoxidade: análise qualitativa

Os soros colhidos no 26º dia do experimento de neutralização (item 2.6) mostrou que os camundongos dos grupos vacinados com o extrato do dorso (VD) e o extrato do ferrão (VF) de *P. motoro* apresentaram títulos de anticorpos em 1:64.000 e 1:128.000, respectivamente. Os camundongos que receberam apenas salina ou hidróxido de alumínio + salina no decorrer do experimento não apresentaram títulos de anticorpos para o extrato do ferrão.

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram a análise histopatológica dos camundongos após os protocolos de soroneutralização e vacinação. Vinte e quatro horas após a injeção de salina estéril ou de extrato do ferrão de *P. motoro* no músculo gastrocnêmio, os camundongos do grupo controle negativo (C-) apresentaram derme com moderado infiltrado inflamatório e tecido muscular compatível com a histologia normal, isto é, sarcoplasma com estriações preservadas e núcleos periféricos em formato fusiforme ou ovoide (Figura 3A).

Os camundongos do protocolo de soroneutralização [grupo controle positivo (C+) e grupos tratados com os soros antidorso e antiferrão (SAD e SAF)], e do protocolo de vacinação [grupo que recebeu hidróxido de alumínio e salina estéril (HS), hidróxido de alumínio, salina e veneno (HSV) e grupo vacinados com o extrato do dorso (VD) ou do ferrão

(VF)] apresentaram tecido subcutâneo caracterizado por células adiposas entremeadas por finas fibras colágenas dispostas frouxamente e exsudato inflamatório agudo (Figura 2), caracterizado pela presença de células polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), macrófagos, linfócitos (Figura 3B) e mastócitos (Figura 3C), além de numerosos vasos sanguíneos congestionados, de diferentes calibres (Figura 3B) e áreas de extravasamento de eritrócitos, caracterizando focos de derrames hemorrágicos, exceto no grupos HS e HSV (Figura 3D).

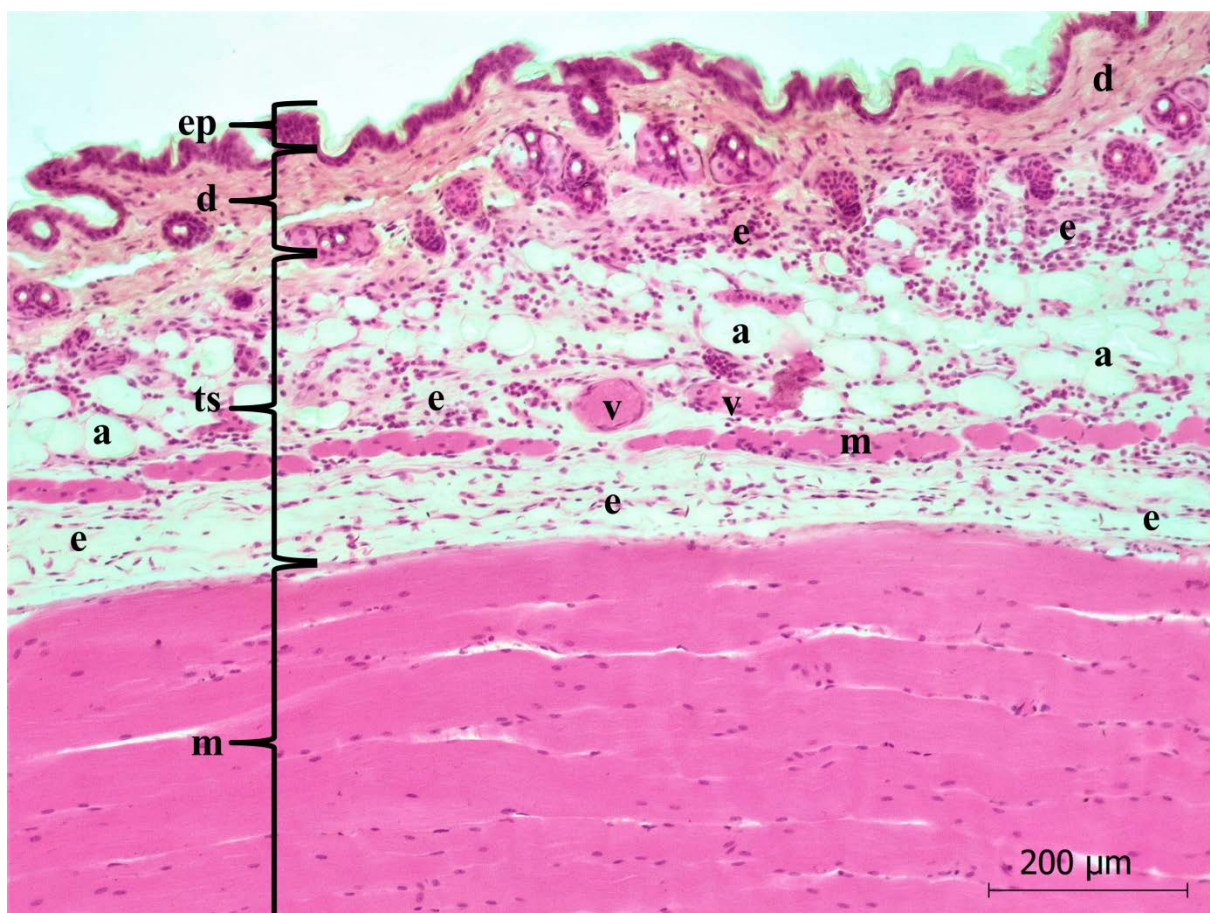


Figura 2. Corte histológico em baixo aumento de músculo gastrocnêmio injetado com o extrato do ferrão de *P. motoro*, apresentando tecido subcutâneo (ts) caracterizado por células adiposas (a) entremeadas por exsudato inflamatório agudo (e), além de numerosos vasos sanguíneos congestionados (v). Na camada superior está a epiderme (ep) e a derme (d) e, mais profundamente, tecido muscular (m). Coloração: H.E.

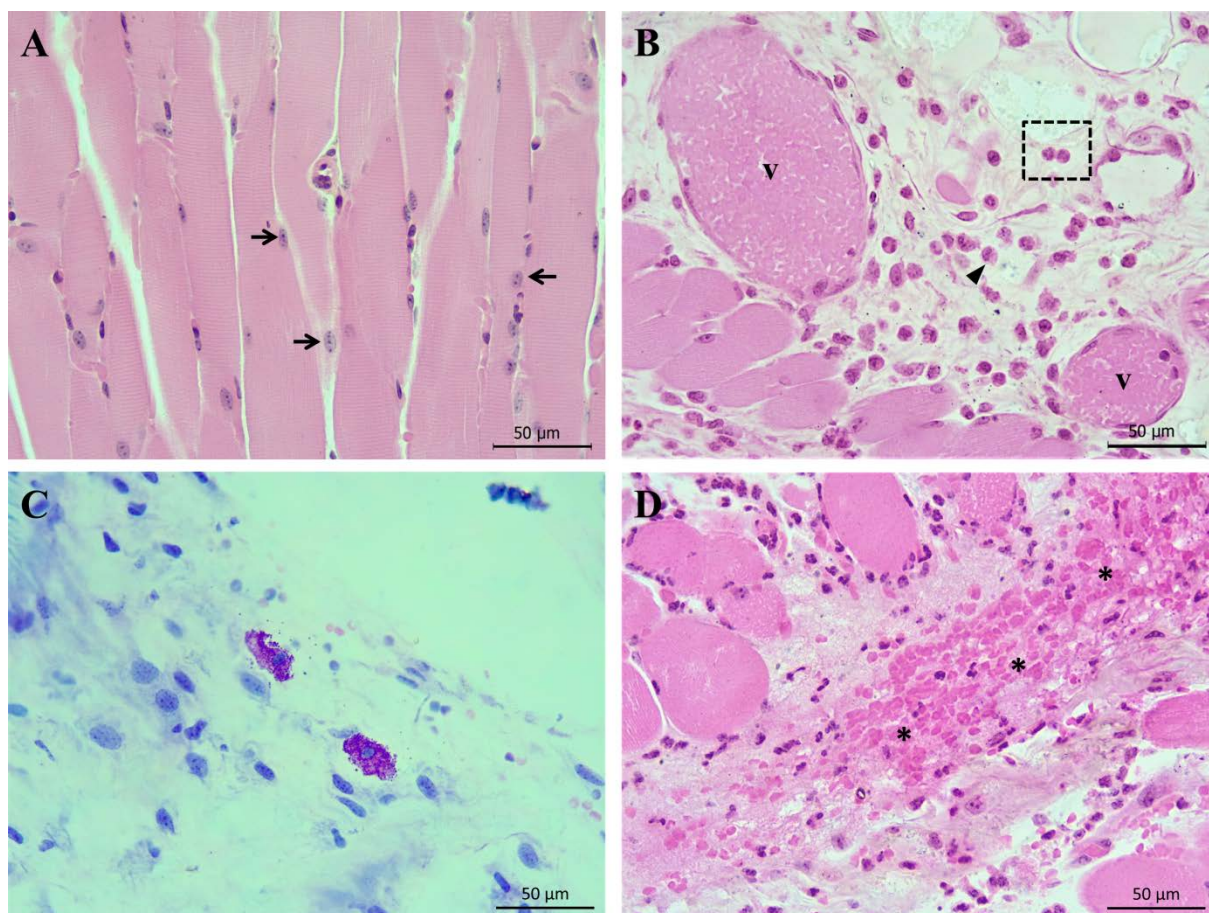


Figura 3. Efeito da injeção de extrato do ferrão de *P. motoro* na pele e no músculo de camundongo. A. Gastrocnêmio de camundongo do grupo controle negativo apresentando tecido muscular com estriações preservadas e núcleos periféricos em formato fusiforme ou ovoide (setas). B. Exsudato inflamatório agudo caracterizado pela presença de neutrófilos (retângulo tracejado), macrófagos (cabeça de seta) e vasos sanguíneos congestionados de diferentes calibres (v). C. Mastócitos ao centro da imagem, exibindo o núcleo em tom azul e numerosos grânulos em violeta. Coloração em azul de toluidina/fucsina. D. Área de extravasamento de eritrócitos (asterico), caracterizando derrame hemorrágico. Imagens A, B e D em H.E.

Esse padrão de vasos hiperemiados (Figura 4A) e exsudato inflamatório se estendeu até a camada muscular, envolvendo epímísio, perímísio e endomísio das fibras. Algumas regiões musculares também apresentaram focos compatíveis com vacuolização (degeneração hidrópica) (Figura 4B) e rabdomiólise, confirmada pela presença de focos de necrose liquefativa (Figura 4C), caracterizada pela presença de restos necróticos de fibras musculares e abundante acúmulo de células inflamatórias polimorfonucleares, além de linfócitos e macrófagos, indicando abscesso, e áreas predominantemente em necrose de coagulação, com padrão de citoplasma eosinofílico e núcleos em picnose, cariorrexe ou cariólise com preservação dos contornos celulares (Figura 4D).

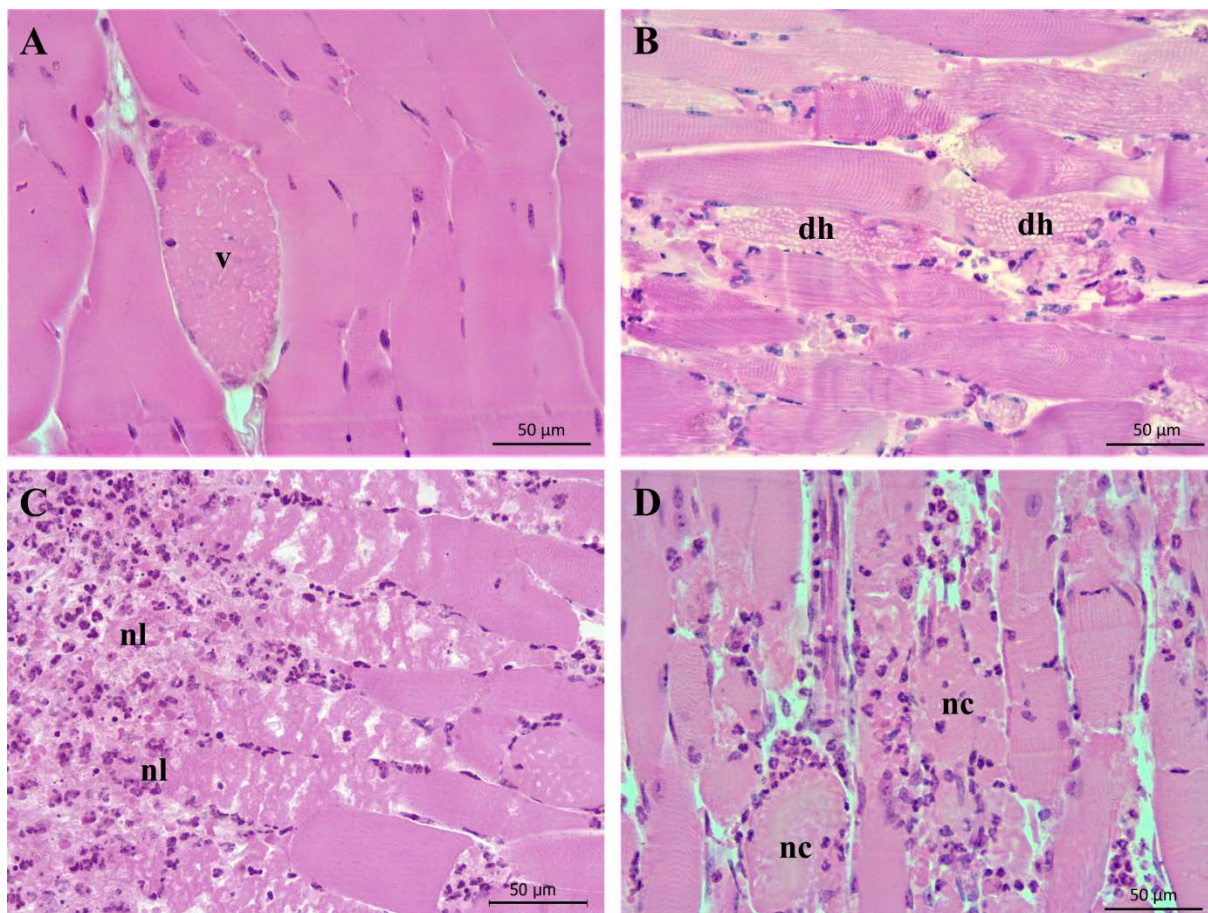


Figura 4. Efeito da injeção de extrato do ferrão de *P. motoro* em músculo de camundongo. A. Vasos hiperemiados meio ao tecido muscular. B. Região muscular compatível com degeneração hidrópica (dh). C. Necrose liquefativa (nl) caracterizada pela presença de restos necróticos de fibras musculares e abundante acúmulo de células inflamatórias polimorfonucleares, além de linfócitos e macrófagos, indicando abscesso. D. Áreas em necrose de coagulação (nc) com preservação dos contornos celulares e presença de infiltrado inflamatório. Coloração: H.E.

3.4 Neutralização da miotoxidade: análise quantitativa

Os gastrocnêmios teste dos camundongos do protocolo de soroneutralização e dos camundongos do protocolo de vacinação não diferiram quanto ao volume de rabdomiólise (Figura 5A), vacuolização (Figura 5C), derrame hemorrágico (Figura 5D), infiltrado inflamatório agudo (Figura 5E), volume de músculo saudável (Figura 5G) e volume de dano total (soma do volume de rabdomiólise, vacuolização e derrame hemorrágico - Figura 5F).

Em relação aos gastrocnêmios contralaterais, somente os grupos C+, SAD, SAF, HSV e VD, injetados via intramuscular com a dose de 400 µg do extrato do ferrão de *P. motoro*, apresentaram rabdomiólise em porcentagem muito menor que os gastrocnêmios teste (Figura 5B), indicando que o extrato induziu à miotoxidade sistêmica nos camundongos Balb/c. No entanto, os gastrocnêmios contralaterais não apresentaram derrame hemorrágico. Ainda nos

tratamentos com os soros hiperimunes, os gastrocnêmios contralaterais do grupo SAD apresentaram infiltrado inflamatório agudo ($0,23 \pm 0,36$ %) e fibras musculares com vacuolização ($0,08 \pm 0,17$ %) e o grupo SAF apresentou somente infiltrado inflamatório agudo ($0,06 \pm 0,12$ %). A porcentagem de músculo saudável dos gastrocnêmios contralaterais não apresentou diferença entre todos os grupos analisados (Figura 5H). Os gastrocnêmios contralaterais dos camundongos do grupo VF não apresentaram dano tecidual ou presença de infiltrado inflamatório, indicando que o protocolo de vacinação a partir do extrato do ferrão foi eficaz em neutralizar a atividade miotóxica sistêmica induzida pela peçonha de *P. motoro*.

Os valores de células polimorfonucleares (PMNs) não apresentaram diferenças significativas entre os camundongos do protocolo de soroneutralização ou de vacinação, tanto nos gastrocnêmios teste quanto nos contralaterais (Figuras 6A e B). Quanto ao número total de mastócitos, somente os gastrocnêmios teste do grupo SAF apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo C- (Figura 6C). Em relação aos mastócitos granulados, os grupos C+, SAD e SAF também apresentaram valores menores em relação ao grupo C- (Figura 6E). Não houve diferença entre os valores de mastócitos degranulados dos gastrocnêmios teste (Figura 6G) e entre os valores de mastócitos totais, granulados e degranulados dos gastrocnêmios contralaterais de todos os grupos (Figuras 6D, F e H).

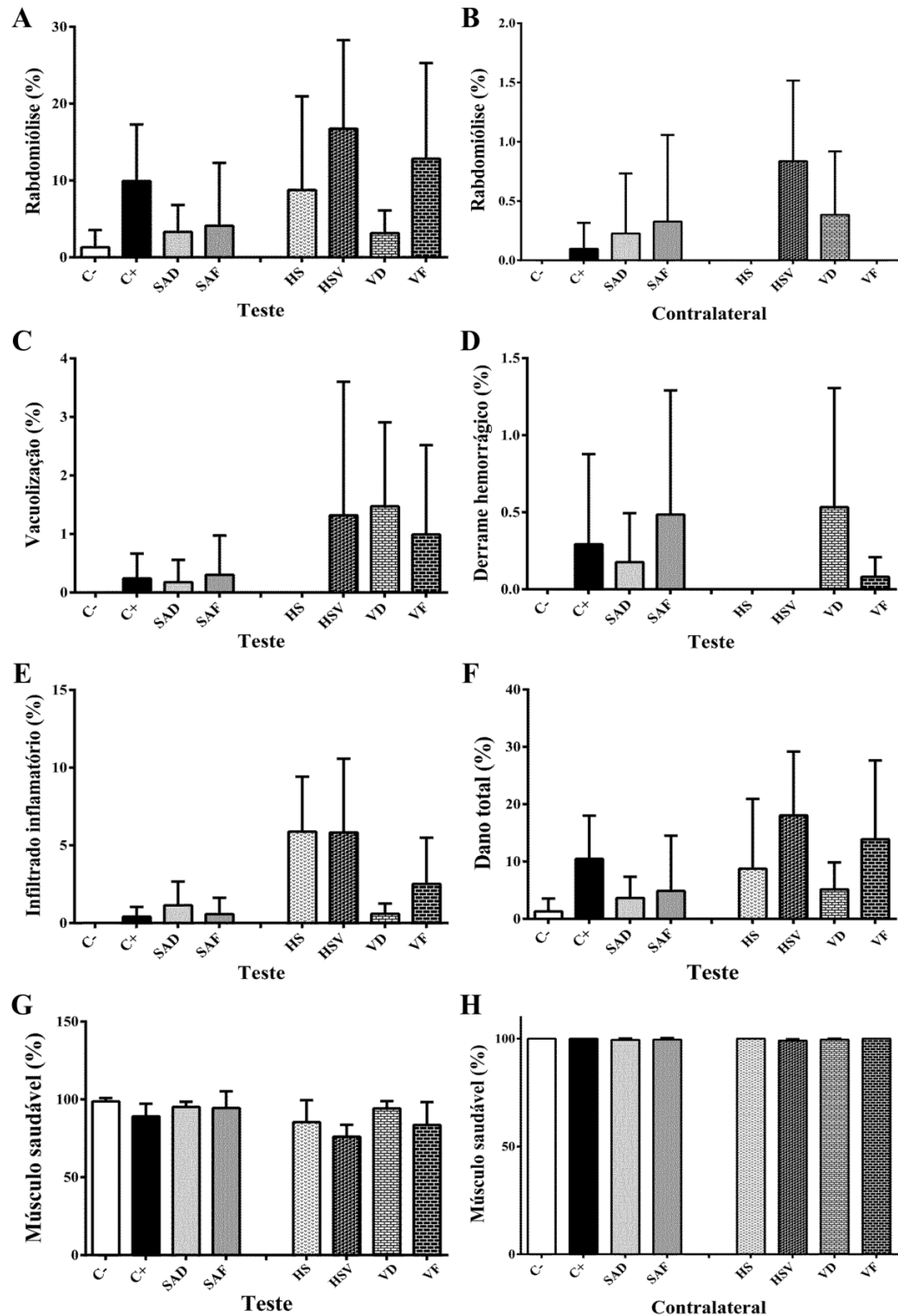


Figura 5. Análise estereológica dos gastrocnêmios teste e contralaterais dos camundongos tratados com os soros antidorso ou antiferrão e vacinados com os extratos do dorso ou do ferrão de *P. motoro*. A. Porcentagem de rabdomiólise dos gastrocnêmios teste. B. Porcentagem de rabdomiólise dos gastrocnêmios contralaterais. C. Porcentagem de vacuolização dos gastrocnêmios teste. D. Porcentagem de derrame hemorrágico dos gastrocnêmios teste. E. Porcentagem de infiltrado inflamatório agudo dos gastrocnêmios teste. F. Porcentagem de dano total dos gastrocnêmios teste. G. Porcentagem de músculo saudável dos gastrocnêmios teste. H. Porcentagem de tecido muscular saudável dos gastrocnêmios contralaterais.

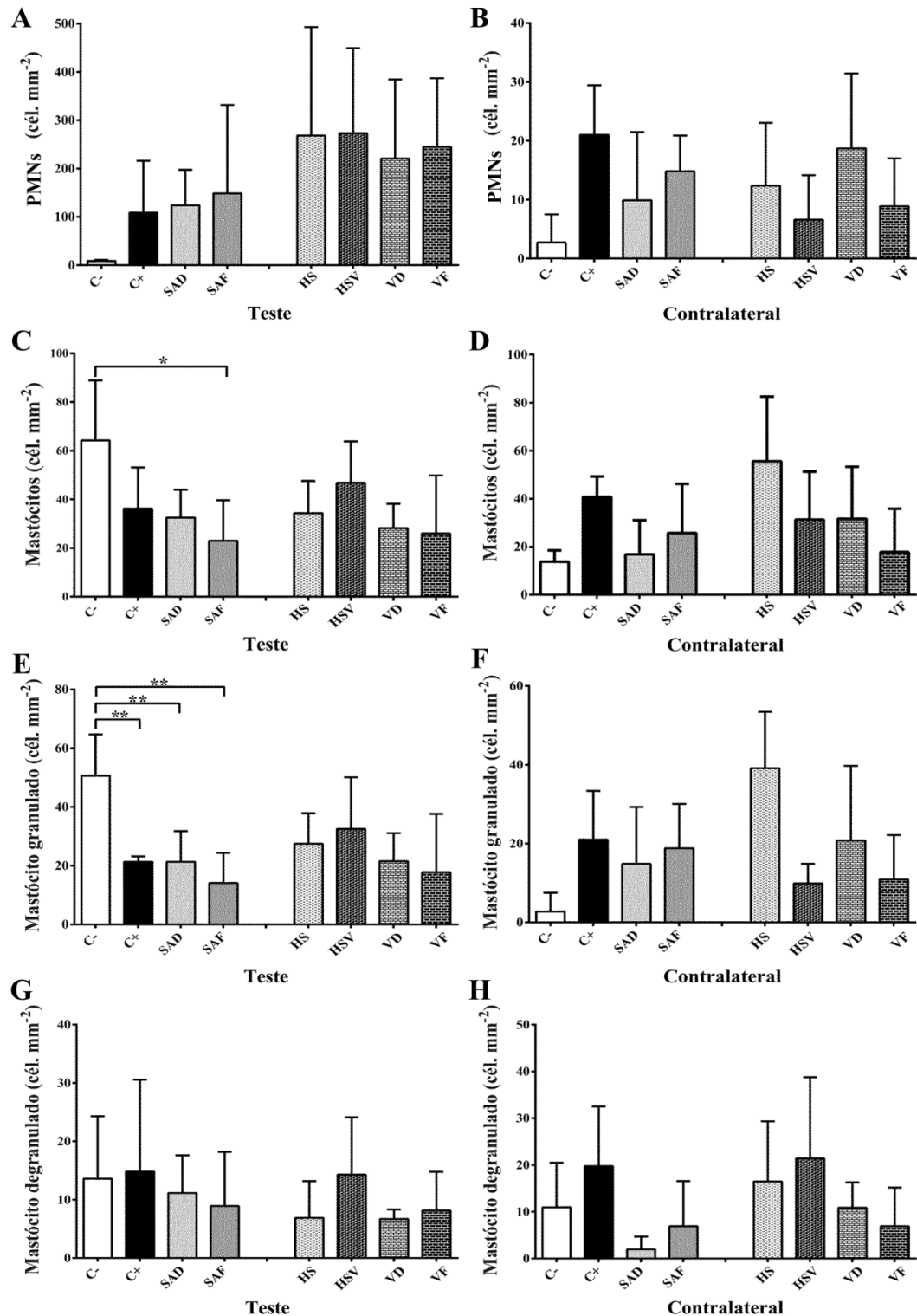


Figura 6. Valores de neutrófilos e mastócitos dos camundongos tratados com os soros hiperimunes e vacinados com os extratos do ferrão ou do dorso de *P. motoro*. A. Valores de células polimorfonucleares (PMNs) dos gastrocnêmios teste. B. Valores de células polimorfonucleares dos gastrocnêmios contralaterais. C. Valores totais de mastócitos dos gastrocnêmios teste. D. Valores totais de mastócitos dos gastrocnêmios contralaterais. E. Valores de mastócitos granulosos dos gastrocnêmios teste. F. Valores de mastócitos granulosos dos gastrocnêmios contralaterais. G. Valores de mastócitos degranulados dos gastrocnêmios teste. H. Valores de mastócitos degranulados dos gastrocnêmios contralaterais. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

3.5 Análises bioquímicas

O grupo controle positivo (C+) apresentou níveis de CK maiores em comparação ao grupo controle negativo (C-) e ao grupo tratado com o soro antidorso (SAD), e o grupo tratado com o soro antiferrão (SAF) apresentou valores maiores de CK em relação ao grupo C- (Figura 7A). O grupo vacinado com o extrato do dorso (VD) apresentou níveis maiores de PCR em relação ao grupo hidróxido, veneno e salina (HSV) (Figura 7B).

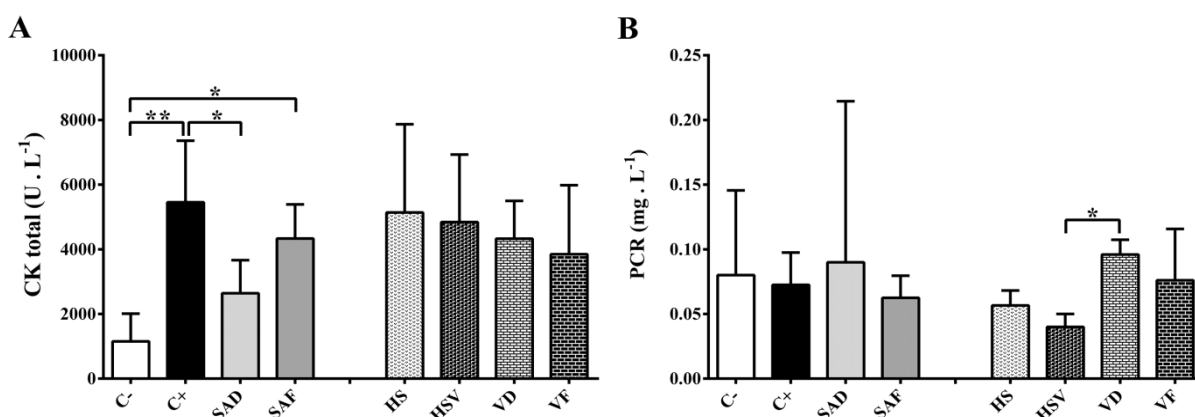


Figura 7. Análises bioquímicas dos soros dos camundongos tratados com os soros hiperimunes ou vacinados com o extrato do dorso ou do ferrão de *P. motoro*. A. Dosagem de CK (creatina cinase). B. Dosagem de PCR (proteína C reativa). * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

3.6 Citocinas

Os grupos do protocolo de soroneutralização e de vacinação não apresentaram diferenças quanto aos níveis séricos de IL-2 (Figura 8A). Os camundongos tratados com o soro antiferrão (SAF) apresentaram níveis de IL-4 e IL-6 maiores em relação aos grupos controle negativo (C-) e controle positivo (C+) (Figuras 8B e C). Os camundongos vacinados com o extrato do dorso (VD) apresentaram valores de IL-6 maiores em comparação ao grupo que recebeu hidróxido de alumínio e salina (HS) (Figura 8C). O grupo tratado com o SAF apresentou níveis maiores de IL-10 e IL-17 em relação aos grupos C-, C+ e tratado com o soro antidorso (SAD) (Figura 8D e E). O grupo VD também apresentou níveis de IL-10 maiores em comparação aos grupos HS, HSV e vacinados com o extrato do ferrão (VF) (Figura 8D). Em relação aos níveis séricos de IFN- γ e TNF- α , os grupos SAD e SAF apresentaram valores maiores em relação aos grupos C- e C+ (Figuras 8F e G). O grupo VD também apresentou níveis de TNF- α maiores em relação aos grupos HS, HSV e VF (Figura 8G). VD e VF apresentaram maiores níveis de INF- γ .

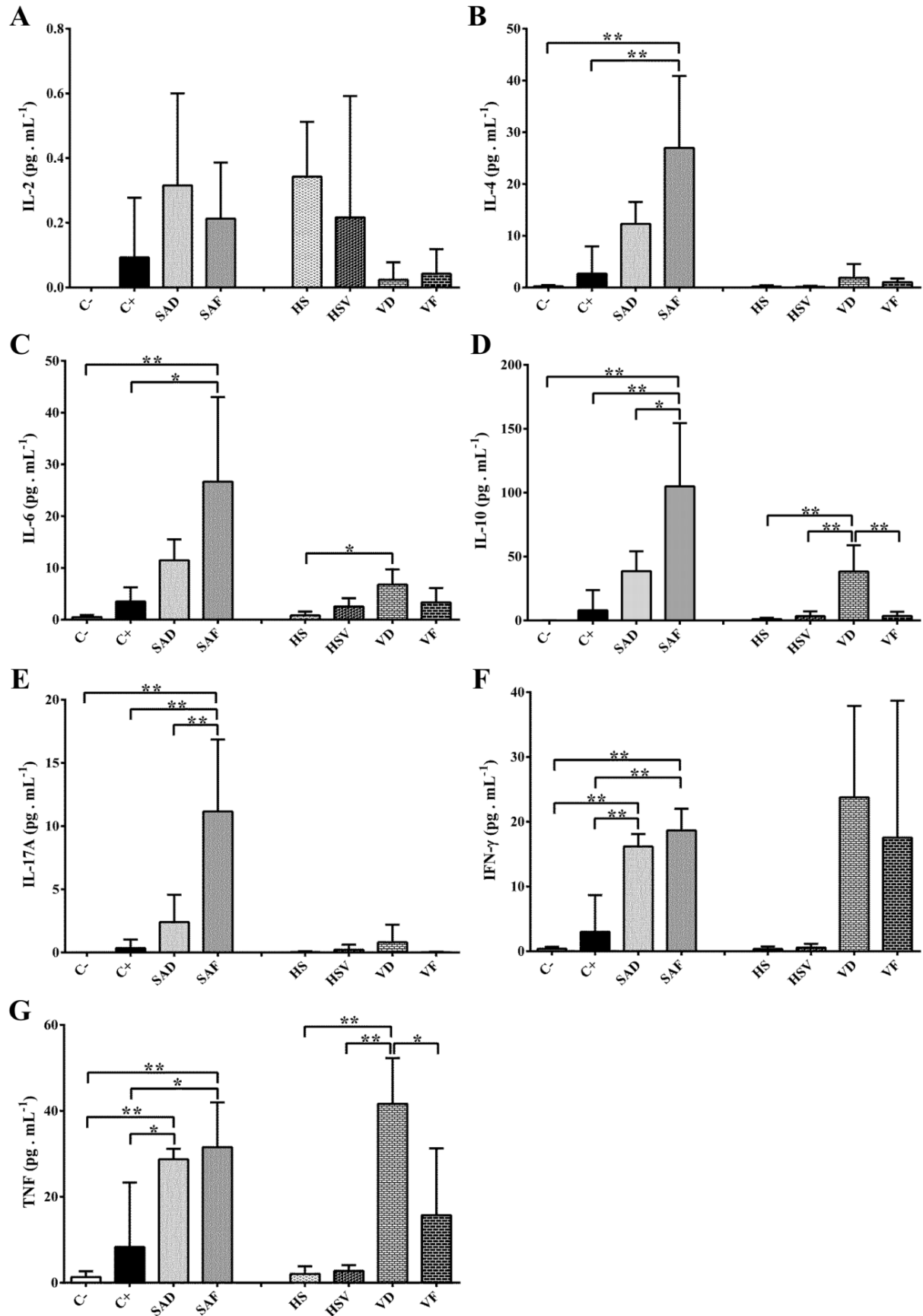


Figura 8. Níveis séricos de citocinas dos camundongos tratados com o soros hiperimunes antidorso e antiferrão de *P. motoro* ou vacinados com o extrato do dorso ou do ferrão de *P. motoro*. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

3.7 Análise dos componentes principais (PCA)

A PCA dos grupos de soroneutralização (C^- , C^+ , SAD e SAF) produziu dois componentes principais que representaram mais de 86% da variabilidade total dos dados originais (PC1=68,63 % e PC2=18,07 %) (Figura 9A). Os outros componentes (PC3, PC4 e PC5) foram negligenciados e não interpretados no presente estudo devido a sua baixa significância para a variabilidade dos dados. Os grupos foram claramente distintos sob o eixo da PC1, formando grupamentos separados. Variáveis (parâmetros) como as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A TNF e IFN- γ , células polimorfonucleares dos gastrocnêmios teste e dano total dos gastrocnêmios contralaterais apresentaram os maiores autovalores positivos, indicando que os mesmos foram os responsáveis pela separação observada dos grupos. A proximidade dessas variáveis no gráfico indica que são diretamente correlacionadas. Somente os mastócitos dos gastrocnêmios teste apresentaram autovalores negativos significantes. A direção oposta apresentada pelos mastócitos indica que são inversamente correlacionados as variáveis mencionadas anteriormente. A direção dos autovalores no gráfico (autovetores), representados pelas linhas que se dispersam a partir do centro, e apontam na direção de SAD e SAF, indicam que esses grupos foram caracterizados por valores positivos dessas variáveis, mas negativos de mastócitos. Na PC2 (18,07 % da variância explicada), as variáveis com maiores autovalores positivos foram os mastócitos dos gastrocnêmios contralaterais, dano total dos gastrocnêmios teste, células polimorfonucleares dos gastrocnêmios contralaterais e CK, característica do grupo C^+ . Somente a PCR apresentou autovalores negativos significantes na PC2.

A PCA dos grupos relacionados à vacinação com o extrato de *P. motoro* (HS, HSV, VD e VF) produziu dois componentes principais que apresentaram mais de 85% da variabilidade total dos dados originais (PC1=68,84% e PC2 17,11%) (Figura 10A). Os outros componentes também foram negligenciados e não interpretados no presente estudo. Os tratamentos foram claramente distintos sob o eixo da PC1, formando grupamentos separados. Variáveis como IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e PCR, apresentaram os maiores autovalores positivos, indicando que os mesmos foram os responsáveis pela separação observada dos grupos. A proximidade dessas variáveis no gráfico indica que são diretamente correlacionadas. Células polimorfonucleares, infiltrado inflamatório dos gastrocnêmios teste e IL-2 apresentaram autovalores negativos significantes, indicando que são inversamente correlacionados as variáveis mencionadas anteriormente. Essa descrição caracteriza

especialmente VD e, em menor proporção, VF (seguindo a mesma linha de raciocínio do parágrafo anterior). Na PC2 (17,11% da variância explicada), as variáveis com maiores autovalores positivos foram os mastócitos dos gastrocnêmios contralaterais, CK, células polimorfonucleares dos gastrocnêmios contralaterais e IL-2. Somente o dano total nos gastrocnêmios teste apresentou autovalores negativos significantes.

A análise de agrupamento hierárquico foi usada como uma técnica de reconhecimento padrão para determinar a relação entre os tratamentos. As análises efetuadas com os grupos relacionados ao soro e a imunização confirmou a separação de dois grupamentos, respectivamente: C⁻/C⁺ e SAD/SAF (Figura 9B) e HS/HSV e VD/VF (Figura 10B).

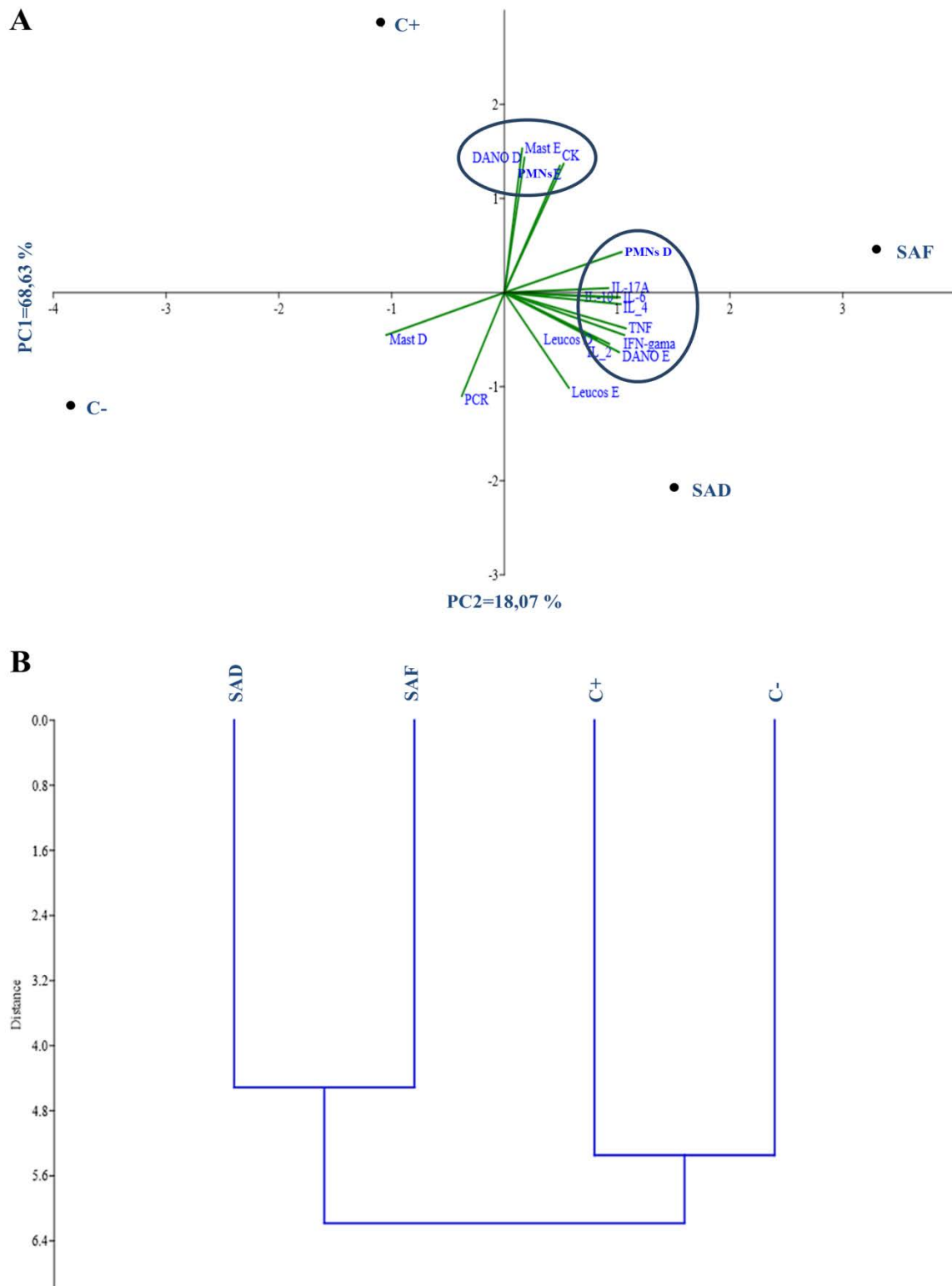


Figura 9. A. Variáveis biológicas após a análise de PCA. Os grupos estão representados pelos símbolos indicados com a sua respectiva designação (C-, C+, SAD e SAF). B. Dendrograma hierárquico para as 18 variáveis obtidas pelo método de agrupamento emparelhado (as distâncias refletem o grau de correlação entre os diferentes tratamentos). O dendrograma representado claramente segregou os grupos C-/C+ e SAD/SAF como tendo grandes distâncias Euclidianas. Dano: dano total. Leucos: infiltrado inflamatório. Mast: mastócitos. PMNs: polimorfonucleares. D: gastrocnêmio teste (direito). E: gastrocnêmio contralateral (esquerdo).

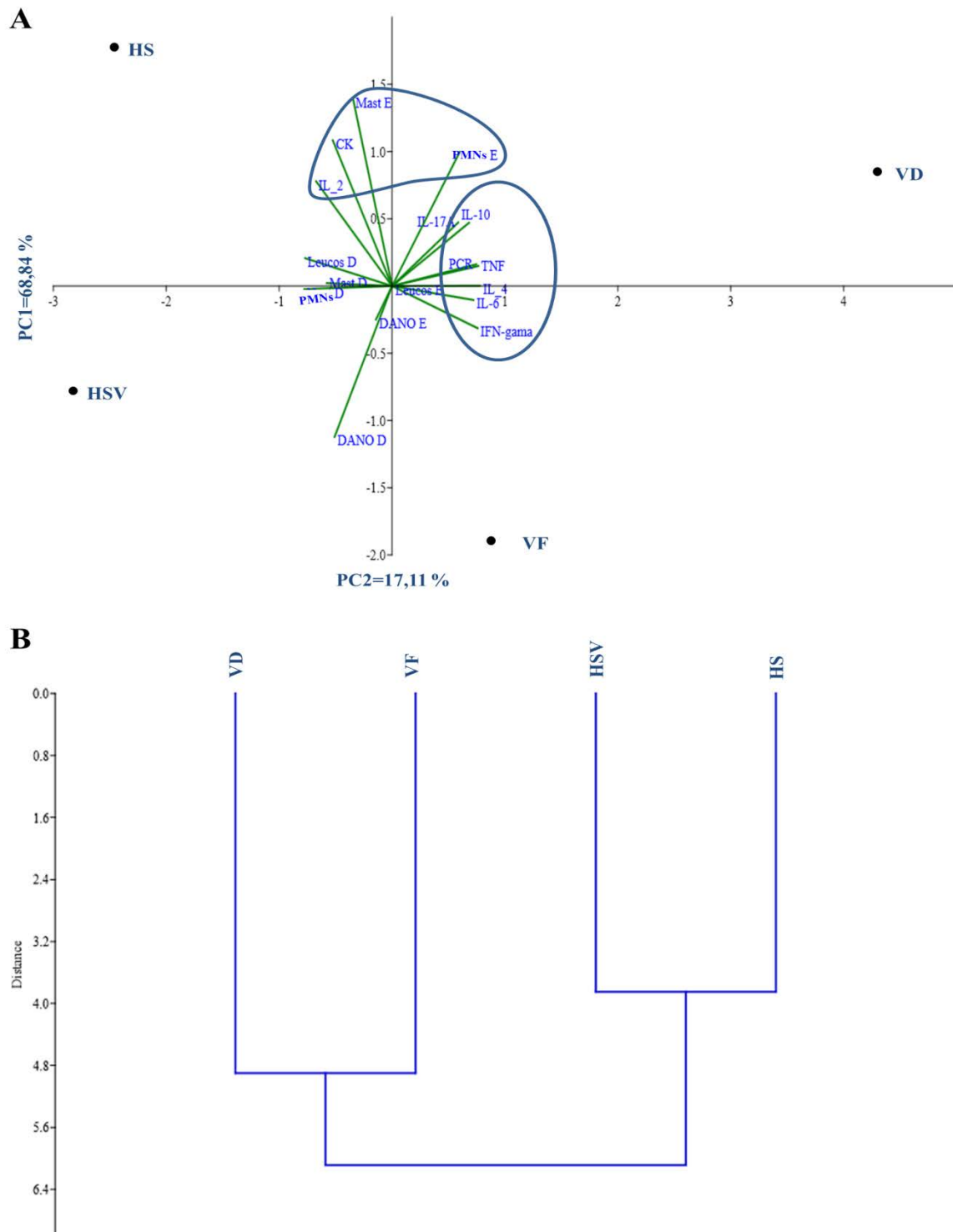


Figura 10. A. Variáveis biológicas após a análise de PCA. Os grupos estão representados pelos símbolos indicados com a sua respectiva designação (Al(OH)₃ salina, Al(OH)₃ veneno, VD e VF). B. Dendrograma hierárquico para as 18 variáveis obtidas pelo método de agrupamento emparelhado (as distâncias refletem o grau de correlação entre os diferentes tratamentos). O dendrograma representado claramente segregou os grupos HS/HSV e VD/VF como tendo grandes distâncias Euclidianas. Dano: dano total. Leucos: infiltrado inflamatório. Mast: mastócitos. PMNs: polimorfonucleares. D: gastrocnêmio teste (direito). E: gastrocnêmio contralateral (esquerdo).

4. Discussão

Um dos principais sintomas nos envenenamentos por arraias de água doce é a formação de edema no membro afetado (Haddad Jr. et al., 2004). Estudos em modelo murino apontam que a peçonha induz rapidamente ao edema, com maior volume entre quinze minutos e duas horas após a injeção da peçonha (Magalhães et al., 2006; Barbaro et al., 2007; Kimura et al., 2014; Kimura et al., 2015; Thomazi, 2016), como observado no presente estudo, onde o maior volume de edema de pata foi em 20 minutos.

Para a neutralização das atividades biológicas induzidas por peçonha de peixes, Soliani (2008) obteve, em camundongos, soros monoespecíficos para as espécies *Scorpaena plumieri*, *Thalassophryne nattereri*, *Cathorops spixii* (bagre amarelo) e *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. Pela junção de 1 mg de IgG veneno-específica de cada soro, foi produzido um soro poliespecífico, que foi avaliado frente as principais atividades tóxicas induzidas pelas peçonhas dessas mesmas espécies. Esse soro poliespecífico foi capaz de neutralizar parcialmente a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *P. gr. orbignyi*, diferentemente do presente estudo, onde observamos que os soros antidorso e antiferrão de *P. motoro* não foram capazes de neutralizar a atividade edematogênica induzida pela peçonha homóloga do ferrão. Resultados similares foram encontrados por Thomazi (2016), que imunizou camundongos com o muco do dorso de *Paratrygon aiereba* irradiado por raios gama de ^{60}Co . Após a imunização, esses camundongos foram testados frente à atividade edematogênica induzida pelo muco de *P. aiereba*, *P. orbignyi* e *Potamotrygon henlei* e os anticorpos circulantes não foram capazes de neutralizar essa atividade.

Em um estudo sobre as mudanças histopatológicas induzidas pelo extrato do ferrão de *Potamotrygon falkneri*, Antoniazzi et al. (2011) observaram, vinte e quatro horas após injeção intradérmica de 400 µg do extrato em camundongos, necrose coagulativa completa da pele, tecido subcutâneo e músculo esquelético, com uma demarcação clara da pele normal. Com a mesma dose e mesmo intervalo de tempo, porém, por via intramuscular, observamos igualmente nos camundongos a presença predominante de necrose coagulativa e, em menor grau, necrose liquefativa do tecido muscular. Diferentemente do estudo citado, observamos a presença de infiltrado inflamatório agudo intenso, edema, numerosos vasos congestos e focos de derrame hemorrágico em meio ao tecido subcutâneo dos camundongos que receberam o extrato do ferrão. As diferenças observadas podem ser devidas à forma como a peçonha foi aplicada, pois a injeção intramuscular simularia uma lesão mais severa, ou às possíveis variações (interespecies, intraespecie, dentre outras), dos diversos componentes presentes nas

peçonhas das arraias de água doce, como hialuronidase, fosfolipase A₂, serina-proteases e metaloproteases (Oliveira-Jr. et al., 2016). Metaloproteases são, normalmente, enzimas dependentes de zinco, que desempenham muitos papéis em várias peçonhas animais, como a indução de resposta inflamatória, mionecrose e hemorragia (Gutiérrez and Rucavado, 2000). A presença de derrame hemorrágico nos camundongos injetados com o extrato do ferrão provavelmente é devida à presença dessa enzima na peçonha de *P. motoro*, como observado nos estudos de venômica para as peçonhas de *Potamotrygon amandae* e *P. falkneri* (Oliveira-Jr. et al., 2016).

No presente estudo, os camundongos foram injetados com o extrato de epitélio juntamente com o muco que recobre o ferrão. O muco, secretado por células mucosas localizadas na epiderme, é considerado a primeira linha de defesa na imunidade inata dos peixes (Zhao et al., 2008) e ajuda a manter a areia ou lama aderidas por cima do disco da arraia quando esta se esconde no substrato, auxiliando na camuflagem do animal (Walker, 2003). O muco que reveste o dorso das arraias induz ao envenenamento, em camundongos, de forma semelhante ao muco do ferrão (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Lameiras et al., 2014) e pode levar à rabdomiólise sistêmica (Lameiras et al., 2014). Além disso, a presença do muco, juntamente com a peçonha, pode potencializar a necrose nos envenenamentos por arraias de água doce, como observado por Magalhães et al. (2006).

Mastócitos estão entre as primeiras células inflamatórias a entrar em contato com agentes pró-inflamatórios, uma vez que são encontrados em regiões de mucosa e na pele, próximos aos vasos. Quando ativados, liberam grânulos contendo mediadores pré-formados e armazenados, como a histamina, e sintetizam outros, como as prostaglandinas, que agem juntos na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, contribuindo, assim, para a formação de edema (Reber and Frossard, 2014). Apresentam receptores do tipo Toll, que reconhecem PAMP (padrões moleculares associados aos patógenos), DAMP (padrões moleculares associados aos danos teciduais) ou VAMP (padrões moleculares associados aos venenos) (Sandig and Bulfone-Paus, 2012; Zoccal et al., 2014). Mastócitos também secretam componentes com propriedades quimiotáticas para leucócitos, como PAF (fator de ativação de plaquetas), LTB₄ (leucotrieno B₄), além de citocinas como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 e TNF. E liberam, ainda, enzimas capazes de degradar toxinas presentes em venenos (Wernersson and Pejler, 2014).

Kimura et al. (2014), em estudo com modelo murino, apontam que a peçonha das arraias de água doce leva à resposta inflamatória intensa, induzindo à migração de leucócitos ao local da injúria, edema, angiogênese, dano tecidual e degranulação de mastócitos. Porém,

recentemente, um estudo em camundongos nocauteados para mastócitos e vários genes envolvidos na resposta inflamatória demonstrou que a neutrofilia induzida pela injeção intraplantar da peçonha de *Potamotrygon* cf. *henlei* pode ser atribuída à liberação abundante de IL-33 por cardiomiócitos, e não pelos mediadores dos mastócitos (Dos-Santos et al., 2017). Por outro lado, Kimura et al. (2015), ao elucidar o papel dos mastócitos na resposta inflamatória induzida pela peçonha de *P. motoro*, verificou, em camundongos, que o pré-tratamento no edema de pata induzido pela peçonha com drogas inibidoras de COX1 e COX2, drogas inibidoras da degranulação de mastócitos ou antagonistas de receptor histamínico diminuiu o edema e o recrutamento de leucócitos para o sítio de injeção da peçonha, mostrando que os mastócitos e a histamina são importantes na resposta à peçonha de arraia. Além disso, os autores observaram, in vitro, que a peçonha, de uma maneira dose dependente, induziu diretamente a degranulação de mastócitos, com aumento da liberação das prostaglandinas PGD2 e PGE2 e consequente diminuição da viabilidade dos mastócitos.

O estudo de Kimura et al. (2015) corrobora nossos dados, pois observamos a degranulação de mastócitos na presença da peçonha de *P. motoro*. Em lesões isquêmicas, como na necrose coagulativa observada nos locais de injeção da peçonha, as anafilatoxinas oriundas da ativação do Sistema Complemento, C3a e C5a, podem degranular mastócitos do tecido conjuntivo ao ativar os seus receptores acoplados a proteína G na superfície da célula (Erdei et al., 2004; Krystel-Whittemore et al., 2016).

A análise de PCA mostra claramente que no protocolo de soroneutralização, os mastócitos estão inversamente proporcionais aos valores de células polimorfonucleares, indicando que na presença da peçonha juntamente com o soro, provavelmente houve um aumento da degranulação dos mastócitos, diminuindo sua viabilidade no tecido, e consequentemente, aumentando o recrutamento de leucócitos para sítio inflamatório. Os anticorpos presentes no soros podem levar à formação de complexos imunes IgG/antígeno, que podem ativar mastócitos do tecido conjuntivo, fazendo com que degranulem (Fang et al., 2013). As anafilatoxinas C3a e C5a do Sistema Complemento também podem ser produzidas durante o processo de solubilização dos complexos imunes solúveis formados: anticorpos/peçonha. (Nesargikar et al., 2012).

Vale ressaltar que os soros foram ministrados integralmente, isto é, contendo os anticorpos e todas as demais proteínas séricas. A presença dessas proteínas poderia induzir uma resposta inflamatória, visto que não são proteínas endógenas, apesar de serem geneticamente idênticas, pois o soro foi produzido em Balb/c para ser administrado em Balb/c, uma linhagem isogênica. A perda da homeostase por conta dessas proteínas pode levar

a produção de citocinas de diferentes perfis de linfócitos T. Por exemplo, nos grupos de soroneutralização, houve produção de IL-2, que é uma citocina que induz à proliferação linfocitária e ativa diretamente linfócitos Treg pelos receptores constitutivos de membrana, o CD25 (Chinen et al., 2016). Consequentemente, a ativação de Treg induz à liberação de IL-10 (O'Garra et al., 2004), aumentada principalmente em SAF. Outra citocina observada em concentrações mais altas foi IL-4, característica de resposta Th2 (Stocchi et al., 2017). Esta citocina é liberada por mastócitos, que apresentaram diminuição do número tecidual após degranularem em SAF. IL-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, também estão em concentrações mais altas em SAF. Estas citocinas são liberadas por macrófagos, mastócitos, neutrófilos, dentre outras células. A IL-6 também participa da indução da resposta Th17, observada pela liberação de IL-17A (Kimura and Kishimoto, 2010). Não foram dosadas outras citocinas do perfil Th17, como a IL-17F e IL-22. Esta última é uma citocina que atua diretamente nos queratinócitos, induzindo à liberação de CXCL-8, que recruta neutrófilos (Zhang et al., 2012), presentes em grande número nos grupos de soroneutralização. Outra função da IL-6 é induzir a medula óssea a produzir e maturar neutrófilos (Summers et al., 2010), o que corrobora os dados observados no presente estudo. Outra citocina liberada nos grupos SAD e SAF foi INF- γ , característica de resposta Th1 (Jarry et al., 2017).

Por tudo que foi exposto, o edema de pata, a diminuição na população tecidual de mastócitos e os valores aumentados das citocinas IL-4, IL-6 e TNF- α nos tratamentos de soroneutralização da peçonha de *P. motoro* (SAF) poderia ser devido à interação entre os mastócitos e demais leucócitos e as proteínas presentes nos soros.

Quando verificamos os grupos controle negativo e positivo dos protocolos de vacinação, HS e HSV, respectivamente, observamos apenas uma tendência do aumento de IL-2. Apenas no grupo vacinado com extrato do dorso (VD), observa-se altos níveis de TNF- α , e baixa liberação de IL-10 (anti-inflamatória), o que indica uma reação inflamatória induzida por algum componente do veneno não neutralizado pelos anticorpos circulantes, visto que no grupo vacinado com o extrato do ferrão, essas citocinas não foram liberadas. No entanto, quando observadas as citocinas de “assinatura” dos perfis de linfócitos Th dos grupos vacinados, verifica-se a presença da citocina INF- γ e baixos níveis de IL-4, corroborando uma resposta Th1, diferente do observado em um estudo de imunização experimental com o veneno de *T. nattereri* (peixe teleósteo) em hidróxido de alumínio, no qual a resposta foi Th1 e Th2 (Grund et al., 2006). Até pouco tempo, sabia-se que adjuvantes a base de hidróxido de alumínio preferencialmente induzem respostas imunes tipo Th2 (Brewer, 2006; HogenEsch, 2012). No entanto, resultados de estudos mais recentes mostram que, de acordo com a via de

vacinação, adjuvantes à base de hidróxido de alumínio podem induzir tanto a resposta Th1 quanto a Th2 (He et al., 2015). Mediante o maior número de células polimorfonucleares e aos baixos valores de citocinas nos grupos do protocolo de vacinação, não podemos afirmar que os mastócitos estão participando efetivamente no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Assim, este recrutamento pode ser devido à liberação de quimiocinas e de outros mediadores inflamatórios.

No presente estudo, observamos, mais uma vez, a miotoxicidade sistêmica induzida pelo extrato de muco e tecido do ferrão de *P. motoro* em camundongos Balb/c, como observado por Lameiras et al. (2014), pela presença de rabdomiólise no gastrocnêmio contralateral dos animais que receberam o extrato do ferrão e aumento dos níveis de CK. O aumento de CK pode ser devido à ação de miotoxinas presentes nas peçonhas de arraias marinhas (Ben Bacha and Mejdoub, 2011) e de água doce (Oliveira-Jr. et al., 2016), como as fosfolipases do tipo A₂, que causam reação inflamatória intensa no local de inoculação da peçonha, induzindo ao dano muscular (Barbaro et al., 2007).

Barbaro et al. (2007), em estudo com camundongos, mostra que 300 µg do extrato do ferrão da arraia *P. falkneri* induz a um aumento significativo dos níveis de CK em 3 horas quando injetado por via intramuscular. No presente estudo, observamos o aumento de CK sérica em até vinte e quatro horas, demonstrando que os níveis de CK podem ficar elevados por mais tempo em camundongos. Talvez, a dose de 400 µg de extrato do ferrão não seja a mais adequada para reproduzir com fidedignidade, em modelo murino, o envenenamento por arraias em humanos, por ser elevada, ao ponto de causar rabdomiólise sistêmica. Portanto, em estudos futuros de soroneutralização de peçonha de arraia, devemos pensar em doses menores que simulem (ou se aproximem) do que seria o envenenamento em humanos. Ainda assim, verificamos que o soro antidorso foi capaz de reduzir significativamente os níveis de CK nos camundongos injetados com o extrato do ferrão, o que é promissor. O protocolo de vacinação não foi capaz de reduzir os níveis de CK. No entanto, os animais vacinados com o extrato do ferrão não apresentaram dano tecidual nos gastrocnêmios contralaterais, mostrando que houve uma proteção contra a rabdomiólise sistêmica induzida pela peçonha de *P. motoro*.

Em seu relato de caso, Masson et al. (2012) verificou que um indivíduo acidentado com arraia marinha apresentou altos níveis de proteína C reativa (PCR), uma proteína de fase aguda, sugerindo uma resposta inflamatória sistêmica. A liberação de PCR é induzida pela IL-6. No entanto, nossas análises mostram que em vinte e quatro horas, os níveis de PCR encontram-se basais. De fato, estudos de caracterização da resposta inflamatória induzida pela peçonha de arraias de água doce mostram que o pico da produção de IL-6 na pata injetada

com a peçonha é entre duas e quatro horas (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Kimura et al., 2014). A dosagem de IL-6 a partir de exudato peritoneal de camundongos injetados i.p. com peçonha de arraia também mostra seu pico em duas horas (Dos-Santos et al., 2017). Apesar da nossa dosagem ter sido feita a partir do soro e de termos desafiados os camundongos com uma dose muito acima das usadas nos trabalhos citados, estes estudos corroboram os níveis de IL-6 por nós analisados para vinte e quatro horas. É provável que o pico da produção de PCR em camundongos desafiados com peçonha de arraia de água doce siga o pico da produção de IL-6. Sendo assim, estudos sobre a cinética da produção de IL-6 e PCR em envenenamentos por arraias são necessários.

No presente estudo, optamos também por produzir o soro antiarraia a partir do extrato do dorso, uma vez que este extrato é tão imunogênico quanto o extrato do ferrão, produzindo anticorpos que reconhecem antígenos da peçonha do ferrão (Lameiras et al., 2017), e induz envenenamento semelhante ao do ferrão, em testes in vivo (Lameiras et al., 2014). Além disso, o extrato do dorso pode ser obtido em maiores quantidades e é mais fácil de se coletar, reduzindo o risco de envenenamento ao pesquisador. Porém, sob as condições experimentais adotadas, não observamos diminuição significativa do dano local induzido pela peçonha de *P. motoro* entre os grupos dos protocolos de vacinação e soroneutralização tanto com o extrato do ferrão quanto do dorso. É importante ressaltar que a vacinação com o extrato do ferrão foi capaz de neutralizar 100% da ação miotóxica sistêmica induzida pela peçonha. Sendo assim, pretendemos dar continuidade aos estudos de soroneutralização da peçonha de arraias de água doce, onde o ideal será desafiar os camundongos com doses menores de peçonha de arraia (para verificar a presença ou não da rabdomiólise sistêmica) e tratá-los com anticorpos isolados dos soros hiperimunes pelo método do ácido caprílico (Dos-Santos et al., 1989), conforme recomendado pela WHO (2016).

Agradecimentos

Este artigo é parte da tese de doutorado apresentada por JLV ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). JLV foi bolsista de doutorado pela Capes. MCS é bolsista produtividade do CNPq (303032/2016-2). Os autores também agradecem ao Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelas valiosas contribuições e por nos providenciar as condições necessárias para a realização deste estudo. Agradecemos a valiosa assistência técnica nos protocolos histológicos da Sra. Erilene Carmo dos Santos (LaMiq/UFAM).

Referências bibliográficas

- Abati, P. a. M., Torrez, P. P. Q., França, F. O. S., Tozzi, F. L., Guerreiro, F. M. B., Santos, S. a. T., Oliveira, S. M. S., Haddad Jr., V., 2017. Injuries caused by freshwater stingrays in the Tapajós River Basin: a clinical and sociodemographic study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50(3), 374-378.
- 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(2), 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(5), 676-687.
- Ben Bacha, A. G., Mejdoub, H., 2011. Proteolytic cleavage of stingray phospholipase A2: Isolation and biochemical characterization of an active N-terminal form. *Lipids in Health and Disease* 10, 124-124.
- 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(1-2), 248-254.
- Brewer, J. M., 2006. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunology Letters* 102(1), 10-15.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., 2016. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature Immunology* 17, 1322.
- Costa, J. A., 2017. Acidentes causados por arraias pintadas *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) em duas comunidades do sistema lacustre Pindaré-Mearim, Maranhão: epidemiologia, aspectos clínicos e medidas preventivas Monografia, Universidade Federal do Maranhão.
- Darlene, F. O., Phee-Kheng, C., 2013. Hot water immersion as a treatment for stonefish sting: A case report. *Malaysian Family Physician: the Official Journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia* 8(1), 28-32.
- Dos-Santos, J. C., Grund, L. Z., Seibert, C. S., Marques, E. E., Soares, A. B., Quesniaux, V. F., Ryffel, B., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., 2017. Stingray venom activates IL-33 producing cardiomyocytes, but not mast cell, to promote acute neutrophil-mediated injury. *Scientific reports* 7(7912), 1-15.
- Dos-Santos, M. C., D'império Lima, M. R., Furtado, G. C., Colletto, G. M. D. D., Kipnis, T. L., Dias Da Silva, W., 1989. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon* 27(3), 297-303.
- Dos-Santos, M. C., Diniz, C. R., A., W. P. M., Dias Da Silva, W., 1988. Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 26(2), 207-213.
- Erdei, A., Andrásfalvy, M., Péterfy, H., Tóth, G., Pecht, I., 2004. Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. *Immunology Letters* 92(1), 39-42.
- Fang, Y., Zhang, T., Lidell, L., Xu, X., Lycke, N., Xiang, Z., 2013. The immune complex CTA1-DD/IgG adjuvant specifically targets connective tissue mast cells through FcγRIIIA and augments anti-HPV immunity after nasal immunization. *Mucosal immunology* 6(6), 1168-1178.

- 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*, 2nd 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(1), 82-88.
- Gomes, H. L., Menezes, T. N., Carnielli, J. B. T., Andrich, F., Evangelista, K. S., Chávez-Olórtegui, C., Vassallo, D. V., Figueiredo, S. G., 2011. Stonefish antivenom neutralises the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom. *Toxicon* 57(7), 992-999.
- Grund, L. Z., Souza, V. M. O., Faquim-Mauro, E. L., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2006. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicon* 48(5), 499-508.
- Gundersen, H. J. G., Østerby, R., 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well! *Journal of microscopy* 121(1), 65-73.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82(9-10), 841-850.
- Haddad Jr., V., 2008. *Animais aquáticos potencialmente perigosos do Brasil: guia médico e biológico*. São Paulo.
- Haddad Jr., V., Cardoso, J. L. C., Garrone Neto, D., 2013. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 19(1), 16.
- Haddad Jr., V., Garrone-Neto, D., Lasso, C. A., Morales-Betancourt, M. A., Barriga, R., Barbarino, A., 2013. Envenenamientos causados por rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) en Brasil, con notas sobre los países vecinos (Colombia, Venezuela y Ecuador): implicaciones en la salud pública, in: Lasso, C. A., Rosa, R., Morales-Betancourt, M. A., Garrone-Neto, D., Carvalho, M. R. (Eds.), *XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte I: Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, Colombia*, pp. 343-360.
- 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(3), 287-294.
- Hammer, Ø., 2013. *PAST Paleontological Statistics Version 3.0: Reference Manual*, University of Oslo.
- He, P., Zou, Y., Hu, Z., 2015. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(2), 477-488.
- Hogenesch, H., 2012. Mechanism of Immunopotential and Safety of Aluminum Adjuvants. *Frontiers in immunology* 3(406).
- Howard, C. V., Reed, M. G., 2010. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Jarry, A., Malard, F., Bou-Hanna, C., Meurette, G., Mohty, M., Mosnier, J.-F., Labois, C. L., Bossard, C., 2017. Interferon-Alpha Promotes Th1 Response and Epithelial Apoptosis via Inflammasome Activation in Human Intestinal Mucosa. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3(1), 72-81.

- Kiernan, J. A., 2015. Histological and histochemical methods: theory and practice. Banbury, U. K., Scion Publishing Limited.
- Kimura, A., Kishimoto, T., 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology* 40(7), 1830-1835.
- Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Antoniazzi, M. M., Jared, S. G. S., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., 2014. Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Experimental Biology and Medicine* 239(5), 601-609.
- Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Távora, B. C. L. F., Faquim-Mauro, E. L., Pereira, N. A., Antoniazzi, M. M., Jared, S. G. S., Teixeira, C. F. P., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., 2015. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. *Toxicon* 103, 65-73.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R., 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of structural biology* 116(1), 71-76.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., Wood, J. G., 2016. Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in immunology* 6(620), 1-12.
- Lameiras, J. L. V., Costa, O. T. F., Dos-Santos, M. C., Duncan, W. L. P., 2013. Arraias de água doce (Chondrichthyes – Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes. *Scientia Amazonia* 2(3), 11-27.
- Lameiras, J. L. V., Costa, O. T. F., Moroni, F. T., Araújo, J. D. R., Caranhas, S. M. E., Marques, C. M. A., Dos-Santos, M. C., Duncan, W. L. P., 2014. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. *Toxicon* 77(0), 105-113.
- Lameiras, J. L. V., Moura, V. M., Dias, L. C., Santos, I. G. C., Costa, O. T. F., Dos-Santos, M. C., 2017. Cross-reactivity between *Potamotrygon motoro* antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin. *Toxin Reviews* 36(0), 1-10.
- Laufer, S. R., 2002. Head trauma release of histamine from dural mast cells alters blood-brain barrier: attenuation with zolantidine. PhD thesis, University of North Texas.
- Lopes-Ferreira, M., Barbaro, K. C., Cardoso, D. F., Moura-Da-Silva, A. M., Mota, I., 1998. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon* 36(2), 405-410.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-Da-Silva, A. M., Mota, I., Takehara, H. A., 2000. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon* 38(8), 1149-1156.
- 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. *orbignyi*. *Toxicon* 47(5), 575-583.
- Magalhães, M. R., Silva Jr, N. J., Ulhoa, C. J., 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 51(6), 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(9), 1368-1377.
- Monteiro, W. M., Oliveira, S. S., Sachett, J. D. a. G., Silva, I. M., Ferreira, L. C. L., Lacerda, M. V. G., 2016. Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49(3), 389-392.
- Nesargikar, P., Spiller, B., Chavez, R., 2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(2), 103-111.
- O'garra, A., Vieira, P. L., Vieira, P., Goldfeld, A. E., 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4(+) Tregs: limiting collateral damage. *Journal of Clinical Investigation* 114(10), 1372-1378.
- Oliveira-Jr., N. G., Fernandes, G. R., Cardoso, M. H., Costa, F. F., Cândido, E. S., Garrone-Neto, D., Mortari, M. R., Schwartz, E. F., Franco, O. L., Alencar, S. A., 2016. Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil. *Nature - Scientific reports* 6(21935), 1-14.
- Pardal, P. P. O., Gadelha, M. a. C., 2010. Acidentes por animais peçonhentos: manual de rotinas. Belém, Pará.
- 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., 2007. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon* 50(5), 688-697.
- Reber, L. L., Frossard, N., 2014. Targeting mast cells in inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 142(3), 416-435.
- Russell, F. E., 1972. Some Chemical and Zootoxicological Properties of Stingray Venom. Los Angeles, DTIC Document.
- Sá-Oliveira, J. C., Costa, E. A., Pena, F. P. S., 2011. Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. *Biota Amazônia* 1(2), 74-78.
- Sandig, H., Bulfone-Paus, S., 2012. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in immunology* 3(185).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671.
- Silva-Jr., N. J., Ferreira, K. R. C., Pinto, R. N. L., Aird, S. D., 2015. A Severe Accident Caused by an Ocellate River Stingray (*Potamotrygon motoro*) in Central Brazil: How Well Do We Really Understand Stingray Venom Chemistry, Envenomation, and Therapeutics? *Toxins* 7(6), 2272-2288.
- Soliani, F. M. B., 2008. Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- Stocchi, V., Wang, T., Randelli, E., Mazzini, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Secombes, C. J., Scapigliati, G., Buonocore, F., 2017. Evolution of Th2 responses: characterization of IL-4/13 in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and studies of expression and biological activity. *Scientific reports* 7(1), 2240.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., Chilvers, E. R., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31(8), 318-324.
- Thomazi, G. O. C., 2016. Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ⁶⁰Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba* Doctoral thesis, Universidade de São Paulo.
- Towbin, H., Gordon, J., 1984. Immunoblotting and dot immunobinding - Current status and outlook. *Journal of immunological methods* 72(2), 313-340.

- Walker, S. M., 2003. Rays - A carolrhoda nature watch book. Minneapolis, USA, Carolrhoda Books, Inc. Minneapolis.
- Wernersson, S., Pejler, G., 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology* 14, 1-17.
- Who, 2007. Rabies and Envenomings: a Neglected Public Health Issue. Report of a Consultative Meeting. Geneva, 10 January 2007, World Health Organization.
- Who, 2016. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. Geneva, 17 to 21 October 2016, World Health Organization.
- Zhang, W., Dang, E., Shi, X., Jin, L., Feng, Z., Hu, L., Wu, Y., Wang, G., 2012. The Pro-Inflammatory Cytokine IL-22 Up-Regulates Keratin 17 Expression in Keratinocytes via STAT3 and ERK1/2. *PLoS ONE* 7(7), e40797.
- Zhao, X., Findly, R. C., Dickerson, H. W., 2008. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 32(5), 500-508.
- Ziegman, R., Alewood, P., 2015. Bioactive Components in Fish Venoms. *Toxins* 7(5), 1497-1531.
- Zoccal, K. F., Bitencourt, C. S., Paula-Silva, F. W. G., Sorgi, C. A., Bordon, K. C. F., Arantes, E. C., Faccioli, L. H., 2014. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. *PLoS ONE* 9(2), e88174.

ANEXOS

1. Parecer consubstanciado sobre protocolos de pesquisas no uso de animais emitido pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, nº 018/2014.
2. Autorização emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob o protocolo no 45289-2 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO
USO DE ANIMAIS**

Número do Protocolo: 018/2014	Data de Entrada: 14/08/2014
Pesquisador Responsável: JULIANA LUIZA VARJÃO LAMEIRAS	
Título do Projeto Produção de antiveneno para <i>Potamotrygon motoro</i> (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) e verificação de sua eficácia frente às principais atividades induzidas pelo veneno desta espécie de arraia.	
Instituição Responsável: INPA	

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

ESPÉCIE	LINHAGEM	IDADE	PESO APROX.	QUANTIDADE	
				Macho	Fêmea
CAMUNDONGOS	Balb/c	21 dias	20g ± 2		36
CAMUNDONGOS	Balb/c	variável	20g ± 2		35
CAMUNDONGOS	Balb/c	21 dias	20g ± 2		16
			TOTAL		87

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 27.11.2014.

Atenciosamente,


 Maricéide de Farias Nairi
 Vice-Presidente CEUA/INPA
 PO Nº 008/2013