INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce
Paratrygon aiereba

THOMPSON DE OLIVEIRA TURIBIO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Profa. Dra. Nanci do Nascimento

Orientador:

Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade

São Paulo

2018

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce

Paratrygon aiereba

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

THOMPSON DE OLIVEIRA TURIBIO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Nanci do Nascimento

Orientador:

Prof. Dr. Delvonei Alves de Andrade

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DE OLIVEIRA TURIBIO, T. ***Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce Paratrygon aiereba***. 2018. 83 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

<p>de Oliveira Turibio, Thompson</p> <p>Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce Paratrygon aiereba / Thompson de Oliveira Turibio; orientadora Nanci Nascimento; orientador Delvonei Alves de Andrade. -- São Paulo, 2018.</p> <p>83 p.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.</p> <p>1. Paratrygon aireba. 2. Arraia. 3. Caracterização biológica. I. Nascimento, Nanci, orient. II. Alves de Andrade, Delvonei, orient. III. Título.</p>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: THOMPSON DE OLIVEIRA TURÍBIO

Título: Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce
Paratrygon aiereba

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Data: 19/04/2018

Banca Examinadora

Prof Dr.: Delvonei Alves de Andrade

Instituição: CEN-IPEN **Julgamento:** Aprovado

Prof Dr.: Patrick Jack Spencer

Instituição: CB-IPEN **Julgamento:** Aprovado

Prof Dr.: Regina Affonso

Instituição: CB-IPEN **Julgamento:** Aprovado

Prof Dr.: Daniel Carvalho Pimenta

Instituição: Instituto Butantan **Julgamento:** Aprovado

Prof Dr.: Ivo Lebrun

Instituição: Instituto Butantan **Julgamento:** Aprovado

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Profa. Dra. Nanci do Nascimento (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai Celestial por Iluminar meus passos nessa jornada.

Hipoteco os melhores adjetivos existentes em todas as línguas faladas e escritas a figura da Profa. Nanci, que mesmo sabendo das nossas limitações, não mediu esforços para cumprir com o seu dever. Profa. Nanci, a senhora mudou a minha forma de enxergar o mundo! Sou muito grato em tê-la conhecido. E o que digo sobre nossa amizade? “É nada”!!!

Penhoro aqui meus sentimentos ao Prof Heitor e a Virginia, que dividiram conosco o tempo com a Profa. Nanci. Obrigado pelo convívio.

Reitero a minha admiração aos Prof. Dr. Patrick e Prof. Dr. Delvonei, por aceitarem finalizar este trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Mônica L. Ferreira pelo auxílio nos ensaios biológicos e no mundo do intravital.

Obrigado aos Prof Dr. Bertolin, Prof Dr. André Senna e ao Fernando Moreira por nos colocarem no centro da Ciência do nosso país.

Agradeço o empenho da Profa. Dra. Josefa por tornar o meu sonho em realidade.

Remereço a equipe da UFT, que nos auxiliou no doutorado. Em especial aos Prof. Paulo Lucinda, Prof. Gilvan, Profa. Dra. Carla Seibert e Dra. Elineide Marques. Ao colaborador Everton Oliveira e ao estagiário Marco Aurélio.

Agradeço ao Zé pescador pela disposição na captura da arrais e pelo ensinamento do manuseio das mesmas. Terei que repetir esta prática!

Reitero o meu carinho a equipe de Coordenadores e da Direção da FAPAC/ITPAC Porto.

Agradeço ao *staff* do Laboratório de Biotecnologia do IPEN/Biotério nas pessoas de Glaucie Alves, Marcela Di Giacomo, Tamara Fucase e Podé (José Pedro Prezotto Neto).

Agradeço ao staff da Medicina Tropical nas pessoas do Prof. Dr. Andres Galisteo Jr. e Dra. Janaina Alves, Andrea da Costa e Jaqueline Rodrigues. Aprendi muito com vocês. Obrigado pelas aulas!

Penhoro estima ao Prof Dr. Rui Seabra, Airton L. Jr. (*in memoriam*) e Luciana C. de Barros, pela estada no CEVAP/Unesp/Botucatu.

Agradeço ao JANUS pelas recordações das datas limites.

Vida longa ao “Grupo Raia e Anexo”, nas pessoas de Gabriela, Raquel, André, Bruna, Norton, Dodó e Taitha. Vocês foram sensacionais. Aqui peço desculpas por minhas falhas neste pequeno trajeto de nossas vidas. André e Gabriela muito obrigado pelo compartilhamento de horas na bancada.

Agradeço o companheirismo dos amigos Ronyere Olegário e Cleber Decarli. Ao primeiro, muito obrigado pelos ensinamentos na base do SAS/Multivariadas, além de recordar os tempos de peraltices. Ao segundo, pelas inúmeras conversas, regadas a um bom churrasco e disputas no PES. Agora não sou mais o perdedor.

Reitero aqui minha admiração a amiga Larissa Silvestre. Obrigado pelas lições em inglês!

Agradeço aqui a minha família de Guaraí, Walter Turíbio, Zélia Maria, Walter Claudio, Georgeane, Vanessa, Geovanna, Maria Clara e aos meus avós Manoel Turíbio (este arguiu-me muito nesses anos) e Sebastiana!

Quase lá....., agradeço aqui a minha família de Porto Nacional, Sebastião Vieira, Silvânia, Tio Dito, Tia Luzia, Cynthia, Adriano, Ederson, Suiane, Gisely, Amanda, Sabrina e ao pequeno John!

Penhoro aqui minha admiração e carinho pelo meu lar, à Bruna pelo zelo e sutileza em conduzir nossa família. Às minhas meninas Barbara e Bia por mudarem a cor do meu cabelo mais cedo. E ao menino Helder, por mostrar que o mundo é mais suave!

RESUMO

TURÍBIO, Thompson de Oliveira. **Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce *Paratrygon aiereba***. 2018. 85p. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

A epidemiologia dos agravos por peixes peçonhentos é pouco relatada, apesar da elevada morbidade e relevância para a saúde. Na região central do Brasil, as bacias do Tocantins e do rio Araguaia são muito utilizadas para atividades recreativas, especialmente entre junho e agosto. Apesar da dificuldade da identificação do animal causador do acidente por parte do acidentado, a maioria dos trabalhos cita que o gênero *Potamotrygon* é o mais relacionado a estes agravos. Por outro lado, arraias do gênero *Paratrygon* embora apresentem um ferrão menor que arraias de outros gêneros, causam bastante acidentes por se camuflarem com facilidade devido a sua cor clara, se confundindo com o fundo dos rios e lagos. O objetivo foi identificar atividades biológicas do muco da arraia *Paratrygon aiereba*. Os desenhos experimentais utilizando a secreção epidérmica foram a atividade edemaciante, por meio de Pletismografia, a dinâmica da alteração no sistema microcirculatório usando a microscopia intravital, a atividade nociceptiva através de estímulos químicos, o dano celular e atividade necrosante. Analisando o comportamento da atividade edemaciante em relação ao tempo, nota-se que o efeito do edema é mais acentuado nas primeiras horas do acidente, entretanto averigua-se que após 4h do acidente esta ação tende a diminuir. O modelo proposto aponta que o tempo é um fator determinante na formação do edema ($p < 0.0001$), posto isso, realizou-se um teste para verificar se entre os tempos estudados havia diferença significativa, sendo que há uma forte significância ($p < 0.0001$), entre os volumes das patas que receberam o muco e as patas que receberam PBS. Com relação a atividade nociceptiva pode-se notar que as concentrações testes apresentaram diferença significativa em relação ao controle PBS ($p < 0,05$). Foi verificado que a atividade nociceptiva não apresentou uma relação dose dependente direta, posto que as maiores médias foram detectadas nas menores concentrações. Com relação a dinâmica do rolamento de leucócito, verificou-se que ao final dos 30 minutos do experimento, notou-se que na concentração de 25 μg de muco, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao tempo basal. Nos tempos (10, 20 e 30 minutos), ao comparar a quantidade de 12,5 μg com as concentrações de 100 μg e 200 μg , apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,0001$), sendo o efeito da concentração foi considerado extremamente significativo. Foram determinados os níveis de lesão celular com liberação de conteúdo citoplasmático, sendo que há uma significância extremamente forte ($p < 0,0001$) entre os tratamentos. Foi verificado que o muco de arraia *Paratrygon aiereba* não causou atividade necrosante no modelo e na concentração utilizada neste trabalho. Por fim, conclui-se que o muco da arraia *Paratrygon aiereba* pode causar atividade edemaciante, atividade nociceptiva, interação leucócito-endotélio e danos celulares. Entretanto, não foi verificado atividade necrosante, com o modelo experimental adotado, causado pelo muco da arraia *Paratrygon aiereba*.

Palavras-chaves: *Paratrygon aireba*; Arraia; Caracterização biológica.

ABSTRACT

TURÍBIO, Thompson de Oliveira. **Biological characterization of the epidermic mucus of freshwater stingray *Paratrygon aiereba***. 2018. 85p. Tese (Doutorado em tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

The epidemiology of the diseases by venomous fish is little reported, despite high morbidity and relevance to health. In the central region of Brazil, the Tocantins and Araguaia River Basins are widely used for recreational activities, especially between June and August. Despite the difficulty of identifying the animal causing the accident by the injured, most of the works affirms that the genus *Potamotrygon* is the most related to these diseases. On the other hand, stingrays of the genus *Paratrygon*, although presenting a stinger smaller than stingrays of other genera, its causes enough accidents by camouflaging themselves easily due to their light color, confusing with the ground of the rivers and lakes. The objective was to identify biological activities of the *Paratrygon aiereba* stingray's mucus. The effects of the edemaciant activity of stingray's mucus were evaluated, through a sample design composed of groups of six female Swiss mice (25-30 g) were inoculated with 50 μ L in the hind paws, receiving 25, 50 and 100 μ g of mucus in the right paw, and in the left paw PBS solution (negative control). The dynamics of the alteration in the microcirculatory system was determined using intravital microscopy, by transillumination of the cremaster muscle after topical application of the *Paratrygon aiereba* mucus. Administration of 20 μ L of sterile PBS was used as a control. Groups of 6 male Swiss mice (25-30 g) were inoculated with 30 μ L containing the amounts of 12.5 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 100 μ g and 200 μ g of mucus. Female Swiss mice (25-30 g) (n = 30) were placed individually under inverted glass funnels located on a reflecting surface to facilitate observation. To verify cell damage, the animals chosen for the experiment were the female Swiss mice (n = 30 animals). These were divided into 6 treatments each one with five animals, one control group and five test groups (12.5 μ g / 50 μ L, 25 μ g / 50 μ L, 50 μ g / 50 μ L, 100 μ g / 50 μ L and 200 μ g / 50 μ L). In relation to poisoning by stingray accident, the effects of mucus on necrotizing activity were studied. Groups of 6 female Swiss mice (25-30 g) were inoculated with 50 μ L of the mucus samples (200 μ g) and PBS (negative control) on the dorsum. Analyzing the behavior of the edemaciant activity in relation to the time, it is noticed that the effect of the edema is more accentuated in the first hours of the accident; however, it is found that after 4h of the accident this action tends to decrease. With regard to nociceptive activity, it can be observed that the test concentrations showed a significant difference in relation to the PBS control (p <0.05). At the end of the 30 minutes of the experiment, it was noted that there was a concentration of 25 μ g of mucus, approximately 4-fold increase over baseline time. Cellular lesion levels with cytoplasmic content release were determined, and there are an extremely strong significance (p <0.0001) between the treatments. It was verified that the mucus of the *Paratrygon aiereba* did not cause necrotic activity in the model and concentration used in this study. Finally, it is concluded that the *Paratrygon aiereba* mucus may cause edematizing activity, nociceptive activity, leukocyte-endothelium interaction and cellular damage. However, necrotizing activity caused by the mucus of the *Paratrygon aiereba* stingray was not observed.

Keywords: *Paratrygon aiereba*; Stingray; Biological characterization

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Estudos com Peixes Peçonhentos	19
2.2 Arraia Peçonhenta de Água Doce.....	21
2.3 Classificação, caracterização e distribuição geográfica das arraia dulcícola.....	25
2.4 Substâncias isoladas das Arraia	27
2.5 Epidemiologia dos acidentes com arraia dulcícola	29
2.6 Manifestações Clínicas Locais: Edema.....	32
2.7 Manifestações Clínicas Locais: Nociceção	33
2.8 Manifestações Clínicas Locais: Leucócitos Rolantes	34
2.9 Manifestações Clínicas Locais: Necrose	36
2.10 Manifestações Clínicas Locais: Dano Muscular	37
3. OBJETIVO	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MÉTODOS	41
4.1 Coleta das Arraia.....	41
4.2 Obtenção e processamento das amostras de muco e veneno	42
4.3 Dosagem de proteínas.....	43
4.4 Animais de laboratório	44
4.5 Formação de Edema	44
4.6 Atividade Nociceptiva	44
4.7 Interação Leucócito-endotélio	46
4.8 Avaliação de Dano Muscular – LDH (Desidrogenase Láctica)	46
4.9 Atividade Necrosante	48

4.10 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Dosagem de proteínas.....	49
5.2 Formação do Edema	50
5.2 Atividade Nociceptiva	55
5.3 Interação Leucócito-endotélio	56
5.4 Atividade da Desidrogenase Láctica (U/l)	60
5.5 Atividade Necrosante	61
6. DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Relação das massas moleculares das proteínas do veneno e muco de arraias Potamotrygonidae e atividade proteolítica</i>	<i>28</i>
Tabela 2: Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) do muco de <i>P. aiereba</i> coletadas em diferentes anos congelados a -20°C	49
Tabela 3: Análise de Variância para determinar a atividade edemaciante.....	53
Tabela 4: Teste de Duncan.....	54
Tabela 5: Modelo GLM com o volume da pata sendo a variável dependente.....	54
Tabela 6: ANOVA do teste de Nocicepção	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Análise estatística do tempo para a concentração de 25 µg/30 µl	81
Quadro 2: Análise estatística do tempo para a concentração de 50 µg/30 µl	81
Quadro 3: Análise estatística do tempo para a concentração de 100 µg/30 µl	82
Quadro 4: Comparação das médias através do teste de Bonferroni.....	82
Quadro 5: Comparações múltiplas via teste de Bonferroni	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ferrão da arraia <i>Paratrygon aiereba</i>	22
Figura 2: Gêneros de arraias de água doce, descritas no Brasil.....	25
Figura 3: Bacias Hidrográficas Brasileiras	26
Figura 4: Local de Coleta e o Município de Porto Nacional	41
Figura 5: Processamento das arraias <i>Paratrygon aiereba</i>	42
Figura 6: Fluxograma da obtenção do muco epidérmico da arraia <i>Paratrygon aiereba</i>	42
Figura 7: Fluxograma da obtenção do muco epidérmico da arraia <i>Paratrygon aiereba</i>	43
Figura 8: Preparo dos animais para o teste de nocicepção.	45
Figura 9: Atividade edematogênica do muco da arraia <i>Paratrygon aiereba</i> induzida em camundongos Swiss (n=24) em diferentes quantidades de muco (25, 50 e 100 µg). Cada barra representa a média e o erro padrão das leituras no pletismômetro	50
Figura 10: Atividade edemaciante em relação ao tempo. Cada ponto representa a média com o erro padrão de todos os volumes medidos, em cada tempo, nas quantidades de muco estudado.	52
Figura 11: Volume das patas testes e controle após inoculação do muco de <i>Paratrygon aiereba</i> . Cada Ponto representa a média e o erro padrão de todos os volumes medidos.	53
Figura 12: Relação Volume (ml) das patas e o tempo	54
Figura 13: Teste para verificar a Atividade nociceptiva do muco de <i>Paratrygon aiereba</i> . Cada ponto representa a média e o erro padrão da reatividade, em relação a quantidade de muco analisado.	55
Figura 14: Gráfico representativo que mostra o número de leucócitos após aplicação tópica de 30µL contendo muco de <i>Paratrygon aiereba</i> em diferentes tempos.	56
Figura 15: Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 100 µg/30µl decorrido 20 minutos.	57
Figura 16: Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 100 µg/30µl decorrido 30 minutos.	58

Figura 17:Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 50 µg/30µl decorrido 30 minutos.	59
Figura 18: Atividade da desidrogenase Láctica (U/l). Cada barra representa a média e o erro padrão da desidrogenase láctica, em relação ao tratamento.	60
Figura 19: Imagens referentes ao teste de atividade necrosante. Figura A: Controle; Figura B: Ação do muco após 24h; Figura C: Ação do muco após 48h e Figura D: Ação do muco após 72h	62

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Atividade da LDH	37
Equação 2: Preparo do reagente de trabalho	47
Equação 3: variação da Absorbância.....	47
Equação 4: Atividade desidrogenase láctica.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

°C: Grau Celsius

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrometro

ANOVA - Análise de variância

AP: Amapá

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CK – MB: Creatina Quinase (isoforma MB)

CK: Creatina Quinase

G: gramas

GLM: Modelo Geral Linear

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IPEN : Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LDH: Lactato Desidrogenase

MI: Microscopia intravital

NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺ na sua forma oxidada)

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (na sua forma reduzida)

PBS – Salina tamponada com fosfato

S: Sul

SAS: Statistical Analysis System

SIH-SUS: Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde

SIM: Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN: Sistema Nacional de Notificação e Agravos

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNAA: Sistema de Notificação específico para Acidentes por Arraias

TO: Tocantins

UFT: Universidade Federal do Tocantins

W: Oeste

ΔA : Variação de atividade

1. INTRODUÇÃO

Os animais que produzem substâncias tóxicas, por meio das glândulas produtoras de toxinas, podem ser classificados como peçonhentos ou venenosos. Quando essa mistura é usada pelo animal com a presença de aparato inoculador, passa a ser chamada de peçonha, e na ausência de aparato inoculador é chamada de veneno (OLIVEIRA, PIRES JÚNIOR, 2011).

A produção de toxinas pelos animais aquáticos é uma importante estratégia, que garante sua sobrevivência em um ecossistema competitivo. Esses animais produzem um enorme número de metabólitos, cujas combinações resultam em grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas, como peptídeos e proteínas, com propriedades bioquímicas e farmacológicas (LOPES-FERREIRA et al, 2004).

As arraias são peixes caracterizados pela presença de um a três ferrões serrilhados e mineralizados na cauda, os quais são cobertos por células epidérmicas que produzem veneno. Quando estes animais são tocados dorsalmente, o ferrão pode ser introduzido no agressor por um mecanismo de reflexo do chicote da cauda, causando lesões mecânicas severas e inoculando veneno (PEDROSO et al, 2007).

As arraias são caracterizadas pela presença de um a três ferrões na cauda, que é coberto por células epidérmicas produtoras de veneno. A localização exata desse tecido é controversa, mas sabe-se que é preferencialmente localizado em os sulcos ventrolaterais do ferrão (HALSTEAD, 1970). Embora a toxicologia das arraias seja um assunto relevante devido à alta frequência de acidentes, a literatura sobre a morfologia dos o aparelho de veneno desses animais é muito escasso (LIU et al., 2001; PEDROSO et al, 2007)

A epidemiologia dos agravos por peixes peçonhentos é pouco relatada, apesar da elevada morbidade e relevância para a saúde (HADDAD JR. et al., 2004). Um fato comum às vítimas deste tipo de agravo é a demora em procurar atendimento médico, seja pelo fato de estarem localizadas em áreas distantes dos estabelecimentos de saúde ou por utilizarem a medicina popular como primeira opção terapêutica (MONTEIRO-DOS-SANTOS, 2012). Na maioria desses casos,

após o surgimento de complicações locais, como necrose e infecções secundárias é que os acidentados procuram os serviços de saúde (TORREZ et al., 2015).

Segundo a Portaria nº 1.271/14 do Ministério da Saúde, o acidente com animal peçonhento é de notificação compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional (BRASIL, 2014). Este tipo de agravo deve ser informado ao Sistema Nacional de Notificação e Agravos (SINAN) via preenchimento da ficha de notificação de acidentes por animais peçonhentos (BRASIL, 2007).

Sobre esta ficha, merece destaque o fato de que não há um campo específico para acidentes provocados por peixes, sendo de responsabilidade do profissional de saúde a especificação do acidente por arraia no campo “Outros”. No entanto, são contemplados com campos específicos os agravos por serpente, aranha, escorpião, abelha e lagarta.

Os agravos por animais peçonhentos também podem ser registrados via SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), SIH-SUS (Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde) e o SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade). No entanto, o SINAN é o único sistema nacional que possui um módulo específico para tratar de agravo com animal peçonhento (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

Na região central do Brasil, as bacias do Tocantins e do rio Araguaia são muito utilizadas para atividades recreativas, especialmente entre junho e agosto, devido aos baixos níveis de água, formando praias que atraem turistas. E neste cenário que os acidentes com arraias são mais frequentes (DA SILVA JR. FERREIRA; PINTO; AIRD; 2015).

Embora sejam comuns os acidentes nas regiões Norte e Centro-Oeste do país e de haver relatos de acidentes por arraias de água doce na região Sudeste, acredita-se que estes ocorram em todo o território nacional, pelo fato desses animais apresentarem ampla distribuição geográfica do Brasil. Apesar disso, esses agravos não recebem a mesma atenção dispensada para os casos de ofidismo e outros animais peçonhentos (GARRONE NETO et al., 2007; SÁ-OLIVEIRA, COSTA, PENA, 2011; HADDAD JR. et al., 2012).

Trabalhos sobre os acidentes com arraias de água doce são encontrados na literatura, como os casos de acidentes de aquaristas (SCHIERA, 2002; HADDAD JR., 2004, HADDAD JR., 2007) e acidentes com arraias entre

pescadores no município de Araguacema-TO (GARRONE NETO et al., 2005). Há relatos de que as espécies de arraias mais envolvidas nestes episódios são *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi* (MAGALHÃES et al., 2006; LASSO et al, 2006, CONCEIÇÃO et al., 2009).

Apesar da dificuldade da identificação do animal causador do acidente por parte do acidentado, a maioria dos trabalhos cita que o gênero *Potamotrygon* é o mais relacionado a estes agravos, o que pode ser explicado pela distribuição geográfica mais ampla destes animais. Sabe-se que a possibilidade de acidente com arraias *Potamotrygon* é maior pelo fato do ferrão ser mais robusto, contudo, a cor negra da arraia facilita a sua visualização pelo banhista.

Por outro lado, raias do gênero *Paratrygon* embora apresentem um ferrão menor que arraias de outros gêneros, causam bastantes acidentes por se camuflarem com facilidade devido a sua cor clara, se confundindo com o fundo dos rios e lagos.

A documentação detalhada dos acidentes é precária, pois acredita-se que os casos sejam subnotificados nos programas de epidemiologia das unidades municipais do país. Esses pontos são importantes, uma vez que contribuem para a falta de conhecimento sobre o assunto e, conseqüentemente, para a falta de justificativa estatística para a produção do soro, embora os acidentes sejam incapacitantes e potencialmente fatais (BOCHNER; STRUCHINER, 2002; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010; SÁ-OLIVEIRA, COSTA, PENA, 2011).

Mesmo apresentando ampla distribuição geográfica e de reconhecida importância médica, constata-se escassez de dados em vários aspectos sobre este animal, como a epidemiologia dos acidentes, a composição e mecanismo de ação do veneno, dentre outros. Os resultados desta pesquisa contribuirão sobremaneira para uma terapia eficaz e até mesmo na produção do soro antiveneno para os acidentes com as arraias.

Os principais sintomas e sinais locais do envenenamento por arraias, como dor, inflamação, edema, necrose, infecções secundárias e atividades antimicrobianas foram elucidados em estudos já realizados para arraias dos gêneros *Potamotrygon* e *Plesiotrygon*, no entanto ainda são poucos os trabalhos para o gênero da *Paratrygon*.

Em suma, vários estudos com arraias de água doce foram desenvolvidos nos últimos anos, mas muitas questões ainda não foram elucidadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estudos com Peixes Peçonhentos

Os acidentes gerados pelos animais aquáticos marinhos e fluviais são muito comuns e, a maioria deles, ocorre de maneira ocasional gerando processos dolorosos como necroses, mutilações, perda de movimento e até morte. A sintomatologia dos acidentes gerados por peixes marinhos é amplamente conhecida, entretanto, ainda são poucos os estudos de caracterização dos acidentes provocados por peixes de água doce (SARMIENTO, 2015).

O muco epidérmico de alguns peixes e dentre eles o de arraias pode exibir atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de agentes infecciosos (MOZUMDER, 2005; HELLIO et al., 2002). Subramanian, Ross e MacKinnon (2008) estudaram o muco produzido pelos peixes *Salvelinus alpinus*, *Cyprinus carpio*, *Melanogrammus aeglefinus* e *Myxine glutinosae* verificaram a inibição do crescimento de linhagens de *Salmonella entérica* C610. Segundo Bragadeeswaran e colaboradores (2011), o muco dos peixes *Cynoglossus arel* e *Arius caelatus* inibiram o crescimento de patógenos humanos.

Assim, o muco de peixes pode representar uma grande fonte de novos compostos farmacológicos, que podem ser úteis como ferramentas de investigação e agentes terapêuticos (CHURCH e HODGSON, 2002). Os mucos de peixe são pouco estudados apesar do grande número de espécies, talvez devido ao fato de serem altamente sensíveis ao calor, pH, liofilização, armazenamento, congelamento e descongelamento repetido (BAUMANN et al., 2014).

Recentemente Sarmiento e colaboradores (2015) estudaram a ação do veneno do bagre *Pimelodus maculatus*, que induziu efeitos nociceptivos e edematogênicos, ademais causou alterações na permeabilidade vascular em doses de 30 a 100 µg/animal. Além disso, o veneno de *P. maculatus* causou alterações significativas nos níveis de CK e suas Isoenzima CK-MB em camundongos.

Rajeshkuma e colaboradores (2015) encontraram evidências de que o veneno de *Dasyatis sephen*, arraia marinha, possui atividade antitumoral, sugerindo que a sua ação inicia a morte de células de câncer por diminuição da

proliferação celular. Deste modo, os venenos de arraias marinhas podem ser utilizados como fonte de agentes antitumorais após purificação.

Os estudos relacionados ao muco de peixe podem contribuir para compreensão de processos fisiológicos induzidos pelo envenenamento e a descoberta de novas drogas, sem mencionar o desenvolvimento de formas mais eficazes para tratar as lesões causadas por estes animais.

2.2 Arraias Peçonhentas de Água Doce

Os venenos de animais têm sido considerados uma excelente matéria prima para a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas. Há muitas pesquisas sobre as atividades e componentes de venenos de animais terrestres, como os de cobras, escorpiões e aranhas, mas existem poucos estudos com venenos de animais marinhos e aquáticos (KING, 2015).

A maior parte destes venenos é composta por muitos constituintes, dos quais as enzimas, pequenos peptídeos, e proteínas são estudadas quanto à bioatividade. No entanto, apesar de haver mais de 2000 espécies de peixes venenosos, os venenos de peixes têm pouca descrição na literatura até o momento. A maioria dos estudos tem explorado o veneno total (bruto) ou as frações do veneno, revelando ampla atividade farmacológica, dentre elas: cardiovascular, neuromuscular, citotóxica, inflamatória, e atividades nociceptivas (ZIEGMAN e ALEWOOD; 2015).

Vários estudos já foram desenvolvidos sobre o gênero *Potamotrygon*, arraias de água doce. Estes achados são referentes ao habitat (RIBEIRO, 2006; MARTIN, 2004), a sua dieta (GARRONE NETO E HADDAD JR, 2010), e a epidemiologia do acidente (MASSON, ORMONDE e CARVALHO, 2012; GARRONE NETO e HADDAD JR, 2010). Porém são reduzidos os estudos destinados a elucidar o mecanismo de ação dos venenos produzidos pelas arraias, em relação à inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (VENNILA et al. 2011; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2012).

As arraias são peixes dotados de toxinas, devido a isso a interação com humanos pode ocorrer de forma negativa (GARRONE-NETO e HADDAD Jr. 2010), principalmente no Tocantins onde o banho em lagos e rios representa uma das principais formas de lazer da população e movimenta o turismo e consequentemente a economia da região.

Segundo Magalhães et al (2008), os poucos estudos com venenos de peixes decorrem da dificuldade da sua extração, além dessas substâncias serem termolábeis. Até o presente momento, a maioria dos estudos envolvendo venenos é referente à caracterização da atividade biológica dos animais terrestres.

Constata-se pelos relatos acima apenas venenos de arraias dos gêneros *Potamotrygon* e *Plesiotrygon* têm sido estudados. Assim, pesquisas que tragam

conhecimento sobre a atividade biológica de venenos do gênero *Paratrygon* serão inéditas e contribuirão sobremaneira para o entendimento do mecanismo de sua ação no organismo.

As arraias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae. Este grupo é monofilético e é composto por quatro gêneros: *Paratrygon dumeril* (gênero basal), *Potamotrygon*, *Plesiotrygon* e *Helyotrygon* (CARVALHO et al., 2003).

Entre as espécies, apenas *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Paratrygon aiereba* tem ampla distribuição e são encontradas em mais de uma bacia hidrográfica. O grupo encontra-se em diversos habitats, incluindo praias, florestas inundadas com rochoso, argila inferior e lagos (CHARVET-ALMEIDA et al., 2002; CARVALHO et al., 2003, SILVA, UIEDA, 2007).

De forma geral, as arraias possuem de um a quatro ferrões ósseos, de formato retrosserrilhado (Figura 1), localizados na cauda e posicionados de forma que a resposta defensiva destes animais seja eficaz quando há um estímulo, como no caso de uma pisada inadvertida ou manipulação sem o devido cuidado. Nesses casos, as arraias desferem ferroadas, que resultam na penetração do agulhão no corpo da vítima (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010).

Figura 1: Ferrão da arraia *Paratrygon aiereba*.
Fonte: Gabriela Ortega Coelho Thomazi

Os ferrões apresentam estrutura rígida e são recobertos por um epitélio, que possui grandes quantidades de células glandulares produtoras de toxina, cuja composição e mecanismo de ação ainda não foram totalmente elucidados. Além disso, o dorso destes animais é frequentemente coberto por muco, que também apresenta atividade tóxica (GARRONE NETO, CORDEIRO, HADDAD JR., 2005; MAGALHÃES et al., 2006; GARRONE NETO et al., 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

As características do ferrão favorecem o ferimento, pois além de penetrar na pele da vítima com grande facilidade, a bainha que o recobre é danificada durante a irrupção deste, expondo as células glandulares da peçonha. Quando o ferrão é retirado da vítima, o ferimento se amplia devido à maior laceração dos tecidos, facilitando a absorção da toxina, ocasionando sintomas e sinais nas vítimas (HALSTEAD, 1966; 1970; CHURCH; HODGSON, 2002).

Como o ferrão é recoberto por muco e este possivelmente é composto por um número de componentes imunogênicos, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, acredita-se que a presença de um ou vários desses compostos podem aumentar a gravidade dos ferimentos causados pelos ferrões de arraias de água doce (CONCEIÇÃO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2006, CONCEIÇÃO et al, 2011).

A dor aparece imediatamente após a ferroadada, inicialmente no local do ferimento e depois se estende por todo o membro acidentado. É descrita como dor intensa e desproporcional ao tamanho da lesão (HALSTEAD, 1970; LAMEIRAS et al., 2013).

Além disso, febre, frio, sudorese, náuseas, vômito, agitação e taquicardia são alguns efeitos sistêmicos manifestados nas vítimas. Infecções bacterianas são também associadas a estas lesões, além de edema, eritema, necrose e vasculite (HADDAD JR., 2003; FINO et al., 2015; TORREZ et al., 2015; DA SILVA JR. et al., 2015).

As infecções secundárias, frequentemente observadas após as injúrias por arraias, podem ser causadas tanto por microrganismos encontrados no ambiente onde o animal se encontra (na água ou solo) como no próprio animal. E a extensão da infecção pode ser determinada pela quantidade de microrganismos e sua patogenicidade (HADDAD; CARDOSO; GARRONE; 2013).

Domingos et al. (2011), provaram que o muco das arraias e a água do rio de onde elas são coletadas transportam bactérias potencialmente patogênicas e multirresistentes, com possibilidade de causar infecção secundária severa em feridas adquiridas nestes acidentes.

As lesões letais ocorrem raramente, exceto quando o ferrão atinge órgãos vitais ou em decorrência de complicações (MEYER, 1997; TORREZ et al., 2015). Segundo Haddad Jr. (2003), embora sejam raros os casos comprovados de mortes provocadas por arraias de água doce, é possível que estes aconteçam devido aos processos graves de necrose de pele e altos índices de infecções.

Torrez e colaboradores (2015) descreveram dois casos de tétano e necrose local após a ferroadada por arraia, sendo que em um dos casos foi observado sepse severa, evoluindo para choque séptico e morte. Em ambos os casos, a procura pelo atendimento médico decorreu mais de uma semana da data do evento e a história vacinal era desconhecida.

A abordagem terapêutica nos casos de acidentes por peixes peçonhentos é sintomática, baseia-se na utilização de analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos. Também é recomendada a imersão do membro afetado em água quente para o controle da dor, pelo fato do veneno ser termolábil, além de limpeza intensa da ferida, uso de anestésicos locais, profilaxia para o tétano, radiografia de tecidos moles para descartar a possibilidade de retenção de parte do ferrão, além do debridamento de áreas necróticas (ATKINSON et al., 2006; TORREZ et al., 2015).

Estudos recentes em animais indicam que o uso de anti-histamínicos e anti-inflamatórios não-esteroides são eficazes no combate à inflamação decorrente deste tipo de envenenamento (KIMURA et al., 2015).

2.3 Classificação, caracterização e distribuição geográfica das arraias dulcícolas

As arraias dulcícolas compõem a família *Potamotrygonidae* que apresenta suas espécies distribuídas em quatro gêneros: *Potamotrygon*, *Heliotrygon*, *Paratrygon* e *Plesiotrygon*, sendo os dois últimos monoespecíficos. Análises cladísticas das características morfológicas destas arraias indicam que *Potamotrygon* e *Paratrygon* são grupos irmãos, enquanto *Plesiotrygon* distingue-se dos demais por corresponder a um gênero primitivo (SANTOS, 1987).

As Arraias de água doce apresentam corpo arredondado, podendo atingir grandes proporções. A cauda do gênero *Potamotrygon* é normalmente do tamanho do corpo, robusta e com ferrões na sua porção mediodistal. As arraias *Paratrygon*, de alcunha “raia maçã”, apresenta uma cauda curta e afilada com ferrões na parte basal. E por fim, as arraias *Plesiotrygon*, as quais se caracterizam pela cauda longa com ferrões na parte medial (GARRONE NETO e HADDAD Jr, 2009).

Figura 2: Gêneros de arraias de água doce, descritas no Brasil.

Segundo Halstead (1970) o ferrão é recoberto por uma bainha de tegumento que está associado a células glandulares de veneno e a uma área cuneiforme de tegumento pelo qual entra em contato com o resto do corpo do animal. As células glandulares do veneno são encontradas nos sulcos ou ranhuras ventrolaterais dos ferrões, sendo separadas uma das outras. Desta forma o ferrão pode ser banhado por muco e veneno originado das áreas cuneiformes.

Os três gêneros são encontrados na bacia amazônica, sendo *Plesiotrygon iwamae* restrita a esta bacia, enquanto *Paratrygon aiereba* também ocorre no rio Orinoco na Venezuela. A distribuição geográfica mais ampla é de

Potamotrygon que, além das onze espécies encontradas na bacia amazônica, inclui outras quatro, aparentemente endêmicas, no rio Paraguai e no baixo e médio rio Paraná (ROSA, 1985).

Figura 3: Bacias Hidrográficas Brasileiras
 Fonte: Murilo Raphael Dias Cardoso

2.4 Substâncias isoladas das Arraias

Os animais aquáticos peçonhentos e venenosos desenvolveram a estratégias de produzir substâncias para captura e defesa, sendo que estas podem ser utilizados na indústria farmacológica, com a produção de princípios ativos de interesse médicos. (KOZLOV et al., 2006)

Santos et al (2011) relata que o muco e o veneno da arraia *P. cf. henlei* indicaram o processo inflamatório, ao passo que o muco apresentou atividade antimicrobiana.

Haddad et al (2004) relatou em seu estudo epidemiológico as atividades caseinolítica, gelatinolítica e hialuronidase foi identificada no veneno de *Potamotrygon de falkneri*.

Barbaro et al. (2007) estudando extratos de tecido de arraias marinhas *Dasyatis guttata* e de água doce *Potamorygon falkneri*, observou atividades edemaciante, gelatinolítico, caseinolítico e fibrinogenolítica em ambos os extratos. A atividade nociceptiva foi verificado em ambos os extratos de tecidos; no entanto *P. falkneri* apresentou atividades maiores que *D. guttata*.

Kimura et al (2011) comprovaram que os acidentes com arraias promovem reação inflamatória, com o envolvimento de eicosanóides, recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas e quimiocinas.

Conceição et al (2007) isolaram o biopeptídeo ativo chamado *Porflan*, da arraia *P. gr. Orbignyi*. Este peptídeo apresentou interações com os fosfolípidios da membrana, sugerindo que essas toxinas estão diretamente envolvidas nos processos inflamatórios de uma ferroadada de arraia.

Conceição et al (2012) descreveram pela primeira vez a presença de um polipeptídeo bioativo isolado do muco de uma arraia *P. cf. henlei*. Este peptídeo foi responsável pela atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *M. luteus* e *C. tropicalis*.

Magalhães et al (2008) purificou, pela primeira vez, a proteína hialuronidásica oriunda da arraia *P. motoro*, sendo que esta enzima apresenta características semelhantes de enzimas do veneno de diferentes organismos e exibiu alta afinidade pelo ácido hialurônico.

Magalhães (2017) desenhou um experimento para a peçonha de *P. falkneri* testando frente às atividades enzimáticas de fosfolipase, hialuronidase, 5'nucleotidase, fosfodiesterase, L-aminoácido oxidase e atividades proteolíticas de

colagenase, elastase, substratos cromogênicos de azocaseína e azoalbumina e atividade fibrinogenolítica. A peçonha apresentou resultados positivos para a maioria dos ensaios, com exceção de fosfodiesterase, L-aminoácido oxidase e atividade fibrinogenolítica, sendo que hialuronidase foi a enzima com maior atividade, seguida das enzimas proteolíticas, indicando a participação destas enzimas na fisiopatologia do envenenamento de plaquetas, aumento da permeabilidade vascular, edema e morte e ainda pode ser responsável pelo quadro de nefrotoxicidade exibido no envenenamento causado por estas espécies.

Thomazi (2016) descreveu em seu trabalho, que a maioria dos trabalhos, a identificação da massa molecular das proteínas bioativas do muco e do veneno de arraias foram realizadas através do método de eletroforese SDS-Page (Tabela 1).

Tabela 1: Relação das massas moleculares das proteínas do veneno e muco de arraias Potamotrygonidae e atividade proteolítica

Autores	Espécie/amostra	Eletroforese (SDS-Page)	Atividade Proteolítica
Haddad Jr. et al., 2004.	<i>Potamotrygon falkneri</i> (veneno)	12, 25 e 70kDa.	<u>Caseinolítica</u> : entre 200 e 100kDa. <u>Gelatinolítica</u> : entre 200 e 80kDa. <u>Hialuronidásica</u> : 84kDa.
Magalhães et al., 2006.	<i>Potamotrygon scobina</i> (veneno)	15, 25, 45kDa.	
MonoQ	<i>Potamotrygon orbignyi</i> (veneno)	15, 25, 45 e 66kDa.	
Barbaro et al., 2007.	<i>Potamotrygon falkneri</i> (veneno)	18 e 22kDa; entre 43 e 84kDa.	<u>Caseinolítica</u> : 83kDa. <u>Gelatinolítica</u> : 83kDa. <u>Hialuronidásica</u> : entre 41 e 65kDa. <u>Fibrinogenolítica</u> : 83kDa.
Magalhães et al., 2008.	<i>Potamotrygon motoro</i> (veneno)		<u>Hialuronidásica</u> : 79kDa.
Monteiro-dos-Santos et al., 2011.	<i>Potamotrygon henlei</i> (veneno e muco)	15, 40, 50 e 70kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : entre 18 e 60kDa.
Lameiras et al., 2014.	<i>Potamotrygon motoro</i> (muco dorso)	10, 15, 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : 6, 41 e 58kDa.
	<i>Potamotrygon motoro</i> (muco ferrão)	10, entre 27 e 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : acima de 58kDa.
	<i>Plesiotrygon iwamae</i> (muco dorso/ferrão)	16, entre 15 e 20, 41kDa.	<u>Gelatinolítica</u> : 6 e 40kDa.

Fonte: Tomazi, 2016

2.5 Epidemiologia dos acidentes com arraias dulcícolas

Os acidentes com peixes peçonhentos podem ser classificados como acidentes sarcotóxico e acantotóxico, sendo o primeiro provocado pela ingestão de toxinas presentes em órgãos ou tecidos e o segundo, por mordeduras ou ferroadas (SAÚDE, 2001).

No acidente acantotóxico o peixe introduz na vítima o ferrão, geralmente serrilhado e envolvido por bainha de tegumento, sob o qual estão as glândulas de veneno, que geralmente, encontram-se associadas aos raios ossificados das nadadeiras peitorais, dorsais ou caudais e na base dos ferrões (LIMA e FERREIRA, 2000).

Haddad Jr e colaboradores (2012) aplicaram um questionário a uma comunidade de pescadores no estado de São Paulo, na qual que 16% dos entrevistados apresentaram envenenamento por arraias todos indicaram: dor intensa e úlceras os principais sintomas. Aproximadamente metade dos acidentados usou apenas medidas de tratamentos populares.

Já Monteiro-dos-Santos (2014) ao entrevistar 25 sujeitos acidentados por arraias, no estado do Tocantins, descreve que 84% pertencia ao sexo masculino, sendo a idade média dos sujeitos de 47 anos, estando 20% em idade acima de 60 anos e 56% entre 41 a 60 anos. Entre as profissões declaradas, as mais frequentes foram lavrador (36%) e pescador (28%) e o número de acidentes variou de 1 a 11 acidentes entre os entrevistados.

Sá-Oliveira e seu grupo (2011) constataram que a maior prevalência de acidentes por arraias em Macapá-AP ocorre em pessoas do sexo masculino, nos membros inferiores e no verão. A terapêutica mais utilizada pela população vitimada, segundo a pesquisa, foi a popular com o uso de urina, ervas e óleos.

Segundo dados do SINAN (2014), no município de Porto Nacional-TO, foram registrados 69 casos de acidentes por arraias entre os anos de 2009 a 2014. Em 2015, Da Silva Jr. e equipe relataram um caso grave de acidente com *Potamotrygon motoro* em Santa Fé do Araguaia- TO.

Como não se dispõe de antiveneno específico o tratamento dos acidentes por peixe no Brasil é sintomático. O procedimento mais usual, pelos

profissionais de saúde, para os acidentados por arraias é o debridamento, seguido de uso de dreno e aplicação de anatoxina tetânica (PARDAL, 2002).

Como até o presente momento não há um tratamento específico para pessoas que sofreram acidentes com arraias, a literatura sugere que a terapia consista em analgésicos, antipiréticos e administração de anti-inflamatórios. Indica também a utilização de antibióticos para prevenir a infecção secundária (DEHGHANI et al, 2009; HADDAD Jr et al, 2004; DOMINGOS et al, 2011)

Os acidentes causados por animais aquáticos apresentam registros esparsos e pouco conclusivos em termos de epidemiologia, relatos dos sinais e sintomas e medidas terapêuticas empregadas nos envenenamentos (PARDAL, 2010; HADDAD Jr, 2003).

Segundo Lameiras (2013) na região norte os acidentes provocados por arraias são de difícil notificação, devido ao aspecto geográfico de seus municípios. Isto é, locais de difícil acesso aos serviços de saúde pública, o que favorece adoção dos mais variados tipos de tratamentos populares em vez da procura por auxílio médico, contribuindo para falta de notificação e ocorrência silenciosa.

Neste sentido Gualberto; Mendonça; Dos Santos (2016) propuseram um Sistema de Notificação específico para Acidentes por Arraias (SNAA) para registrar os acidentes ocorridos no Estado do Amazonas, com o intuito de auxiliar os órgãos competentes na tomada de decisões sobre o controle e prevenção dos acidentes.

Segundo Sá-Oliveira (2011), a literatura reforça a necessidade de as autoridades públicas atentarem para a subnotificação dos acidentes por arraias e para a proposição de medidas que estimulem estudos de terapêutica adequada e qualificação pertinente dos profissionais de saúde.

Castro e colaboradores (2016) descreveram 60 pacientes acidentados por arraias registrados no SINAN de Porto Nacional – TO entre 2009 e 2013, verificou-se que em 49 casos (81,7%) foram notificados como sendo do sexo masculino, com faixa etária entre 21 a 31 anos. A maioria dos casos, 54, correspondente a 90%, aconteceram na zona urbana. Em relação aos sintomas, 59 das notificações (98,3 %), apresentaram manifestação clínica local.

Paralelamente, Passos e outros (2016), retrataram o perfil epidemiológico das pacientes vítimas de acidentes por arraias atendidos no Hospital Público de Porto Nacional/TO, no período de 2012 a 2015. Esses pesquisadores constataram que o número de atendimentos com essa

especificidade aumentou nesse período em relação aos anteriores. A maior ocorrência foi observada entre indivíduos na faixa etária entre 31 a 40 anos (26,4%), do sexo masculino (75,55%) e residentes na zona urbana (100%). Verificou-se ainda que o intervalo de tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico foi de 0 a 1 hora (51,1%); a região anatômica mais atingida foi o pé (93,3%). Todos os indivíduos tiveram manifestações locais (100%) e a maioria sem manifestações sistêmicas (95,5%) manifestações clínicas mais relatadas foram a dor e o edema (53,4%) e todos os procedimentos terapêuticos adotados foram baseados na sintomatologia dos pacientes.

As manifestações clínicas locais dos acidentes por arraias mais evidentes são caracterizadas por dor intensa que se acentua nas primeiras horas. No local da ferida apresenta-se com eritema, edema, ardência (OLIVEIRA, 2015; MONTEIRO-DOS-SANTOS et al, 2011; MAGALHAES et al. (2006).

Nas manifestações clínicas gerais podem ser registradas os sintomas sistêmicos, como por exemplo, febre, mialgia, tonturas, vômito e dor de cabeça (PARDAL, 2003; HADDAD Jr et al, 2004; GARRONE-NETO, HADDAD Jr, 2010).

2.6 Manifestações Clínicas Locais: Edema

Edema é definido como acúmulo de líquido no espaço intersticial. A compreensão dos mecanismos formadores de edema é complexa e, em muitas situações, incompleta. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos, envolvidos na formação do edema permite uma racionalização terapêutica na busca dos melhores resultados possíveis (COELHO, 2004).

O edema induzido por veneno/muco se caracteriza por ser de aparecimento imediato, isto se deve ao aumento da permeabilidade microvascular causado por componentes edemaciante do veneno/muco, agregando o extravasamento de sangue, devido à ação dessas substâncias sobre a microcirculação (MOURA, AGUIAR, CARVALHO, 1998).

Clinicamente, o edema local é também de aparecimento imediato e, dependendo do grau de envenenamento, pode estender-se da zona da picada, chegando a alcançar áreas consideráveis de uma extremidade ou região durante períodos prolongados. A maioria dos componentes edematogênicos dos venenos provavelmente induz inflamação de maneira indireta, liberando ou induzindo a liberação de uma variedade de autocóides no organismo (GUTIERREZ, LOMONTE, 2009).

Segundo Kimura e colaboradores (2014) o envenenamento causado por arraia de água doce provoca uma intensa reação local, que pode levar à formação de necrose. A caracterização de atividades inflamatórias induzidas por arraias dulcícolas é raramente descrita na literatura. Assim, estes desenharam um experimento, com modelagem animal, que comprovou a capacidade do veneno de *Potamotrygon motoro* em induzir o edema.

2.7 Manifestações Clínicas Locais: Nocicepção

O sistema nervoso sensorial é a parte do sistema nervoso responsável pela análise dos estímulos provenientes do meio ambiente externo e interno do organismo. Os receptores nervosos periféricos para a dor foram ao longo do tempo se desenvolvendo, facilitando a condução nervosa após estímulos de alto limiar, sempre com o objetivo de evitar situações desagradáveis, manter as funções fisiológicas e preservar a vida (PERL, 2011).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é uma experiência subjetiva e individual associada a manifestações físicas, cognitivas, culturais e psicológicas. Em outras palavras, “é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão real ou potencial de tecidos, ou descrita em termos de tal lesão”.

A sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo que indica a presença de um estímulo lesivo e que aciona respostas protetoras apropriadas. Dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Precisamente, a dor é um resultado subjetivo da nocicepção, a qual é definida como processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER, TREEDE, 2008)

Para Basbaum et al. (2009) a nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores.

Para Ursin (2014) o dano tecidual provoca o estímulo nociceptivo, disparando um discreto conjunto de órgãos sensoriais periféricos. Esses nociceptores são as terminações de fibras nervosas de pequeno diâmetro que podem ser minimamente mielinizadas (fibras A δ) ou não mielinizadas (fibras C). Os nociceptores podem ser ativados por várias formas de energia, incluindo mecânica, eletromagnética, elétrica, térmica e estímulo químico.

Com relação à dor/nocicepção, as toxinas presentes no veneno e muco das arraias dulcícolas induzem a liberação de mediadores inflamatórios pelo tecido lesado, os quais podem contribuir para o efeito da nocicepção, sendo que a dor parece estar associada principalmente à ação direta das toxinas em nociceptores,

pois a sensação de dor inicia imediatamente após o acidente (CURY e PICOLO, 2009).

Mondin (2007) relatou que as peçonhas do muco e do ferrão do bagre *C. spixii* induziram nocicepção, quando injetados individualmente ou juntos, sendo que a peçonha do muco mostrou ser mais potente que o do ferrão.

Para Barbaro et al. (2007) os extratos oriundos das arraias *D. guttata* e *P. falkneri* apresentam proteases que podem contribuir para a degradação de proteínas e componentes da matriz extracelular, favorecendo o estabelecimento das injúrias.

Magalhães e colaboradores (2006) verificaram uma relação dose dependente no efeito da nocicepção, utilizando veneno das arraias *P. cf. scobina* e *P. gr.orbigny*.

2.8 Manifestações Clínicas Locais: Leucócitos Rolantes

A microscopia intravital (MI) é uma poderosa ferramenta utilizada na área biomédica para a observação e imageamento *in vivo* de sistemas biológicos, com importante aplicação no estudo das interações leucócito-endotélio que ocorrem na microcirculação de diversos tecidos animais sob condições normais e patológicas (PINTO et al, 2015).

No estudo e avaliação das atividades leucocitárias em eventos micro circulatórios, em condições normais e patológicas, a medição da velocidade e a contagem dos leucócitos rolantes e aderidos às paredes dos vasos sanguíneos é de vital importância para o desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias (DOS SANTOS et al, 2008).

Nesse tipo de estudo, a medida de velocidade e a contagem dos leucócitos rolantes e aderidos às paredes dos vasos sanguíneos são realizadas a partir de imagens obtidas da técnica de microscopia intravital (RAY, 2010).

Os recentes avanços na microscopia intravital, têm ajudado a expandir a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que estão na base da navegação leucocitária no espaço extravascular. Os estudos com microscopia intravital em camundongos e zebrafish, como modelos de inflamação, têm contribuído para a compreensão da dinâmica e organização espacial da migração dirigida de neutrófilos. A tecnologia de imagem intravital forneceu conhecimentos

novos sobre os mecanismos e as cinéticas da locomoção de células imunes no espaço intersticial de vários órgãos (WENINGER, BIRO e JAIN, 2014).

Desde 1839 quando iniciaram os trabalhos com microscopia intravital, esta técnica representa um dos melhores métodos para visualizar em tempo real uma grande quantidade de processos vasculares biológicos (RIUS, SANZ, 2015).

O músculo utilizado como modelo experimental é o cremaster, que é derivado dos músculos interno oblíquo e transversal *abdominus*, como os testículos descem através do canal inguinal, possui a função de apoiar (grego: *cremaster* = suspender) e manter a temperatura dos testículos. Após a exposição do músculo *cremaster* é possível observar a microcirculação *in vivo*, uma vez que o procedimento experimental pode ser concluído em menos de 1 hora. A temperatura corporal do animal deve ser mantida a 37°C (BAGHER e SEGAL, 2011).

Segundo Rodrigues e Granger (2015) o aumento na permeabilidade microvascular e interações leucócito-endotélio são dois parâmetros fundamentais no processo inflamatório, ocorrendo alterações nas barreiras do endotélio vascular, assim como a migração de leucócitos circulantes nos tecidos inflamados.

Para Fox e colaboradores (2010) a primeira etapa do processo de transmigração de leucócitos é o rolamento que ocorre quando leucócitos ativados rolam ao longo da superfície endotelial. A velocidade desse processo é uma etapa crucial para a adesão de leucócitos, visto que reduz drasticamente antecedendo a adesão.

O aumento da permeabilidade vascular associada ao dano do endotélio é responsável pela ocorrência de edema tecidual, que pode ser dramático em determinados órgãos como o cérebro. Estímulos inflamatórios de curta duração estão associados com o recrutamento e ativação de leucócitos. Além disso, o endotélio pode ser ativado por autacóides locais, como a bradicinina, que medeiam a quebra da barreira célula-célula, aumentando a permeabilidade (SUKRITI et al., 2014).

Monteiro dos Santos et al. (2011), utilizando a metodologia da microscopia intravital, do músculo cremaster, verificaram que aplicação tópica de 100 µg de muco e veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei* induziu um aumento do recrutamento celular caracterizado pelo elevado número de leucócitos.

2.9 Manifestações Clínicas Locais: Necrose

As alterações vasculares causadoras de edema e hemorragias são responsáveis por um grande aumento no volume do líquido intersticial, com consequente aumento da pressão intracompartimental que leva à necrose do tecido muscular. Os acidentes causados por peixes geram ferimentos com diversos sintomas, como dor intensa, necrose cutânea, bolhas, ulcerações e febre (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

O padrão de úlcera resultante pode ser característico com grandes necroses, que parte do ponto central onde penetra o ferrão, formando novas áreas, lembrando os círculos concêntricos semelhantes a uma cebola cortada longitudinalmente (GARRONE NETO e HADDAD Jr, 2009).

Pardal (2002), relatou que várias pessoas acidentadas por arraias tiveram complicações, sendo que a mais frequente foi necrose seguida de infecções locais. PEDROSO et al. (2007) mostraram que no ferrão das espécies de água doce existe um maior número de células secretoras de proteína, de dois tipos diferentes, distribuídos por toda a epiderme. Segundo eles estas diferenças poderiam influenciar nos envenenamentos por arraias de água doce, que são, geralmente, mais graves e apresentam maior porcentagem de necrose que os acidentes causados por arraias marinhas.

Magalhães e colaboradores (2008) descreveram que, em torno da ferida aparecem eritema e edema, caracterizando a primeira fase do envenenamento. Em seguida, surge uma necrose central, causando, na área afetada, flacidez do tecido.

Antoniazzi et al (2011) mencionaram que, seis horas após a inoculação do veneno da *Potamotrygon falkneri*, surgem focos de necrose em células epidérmicas basais e, que em 24 horas, é possível observar necrose da pele, do tecido subcutâneo e do músculo esquelético. Os pesquisadores confirmaram, nesse estudo, a capacidade do veneno em induzir necrose em tão pouco tempo.

Lameiras (2013), sugere a presença de componentes proteolíticos capazes de degradar a matriz extracelular e de fosfolipases no muco/veneno das arraias de água doce que contribuem para a necrose local, uma característica destes acidentes.

Barbaro et al. (2007) comparando os extratos de tecido e muco da arraia marinha *Dasyatis guttata* e da arraia de água doce *Potamotrygon falkneri*,

observaram que somente o extrato de *P. falkneri* apresentou miotoxidade, verificada pela dosagem de CK total, sendo capaz de induzir necrose e letalidade quando testado em camundongos Swiss.

Oliveira Júnior e colaboradores (2016), estudando as arraias *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*, descreveram que a sintomatologia desses acidentes se dá por processos inflamatórios podendo progredir até a necrose e úlceras. O envenenamento por arraias pode causar danos permanentes às vítimas, como amputações de membros e necrose local, levando a uma lenta recuperação da vítima após o acidente, acarretando dificuldades socioeconômicas. Por fim, o autor confirma que as proteínas presentes no veneno/muco são responsáveis por dano tecidual, como necrose, levando consequentemente, a uma dor elevada.

2.10 Manifestações Clínicas Locais: Dano Muscular

Segundo Baptistella (2009) a lactato desidrogenase (LDH) catalisa a oxidação reversível do lactato para piruvato com o cofator NAD⁺. A concentração de LDH nos eritrócitos é 150 vezes maior do que no plasma, sendo assim, uma hemólise leve é detectada por aumento nos níveis desta enzima no soro. É uma enzima presente em vários tecidos, em particular no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado e eritrócitos, mas também nos rins, osso e pulmões.

O exame de sangue LDH ou DHL – Desidrogenase Láctica tem aplicação em várias situações, é uma enzima que se eleva quando ocorre um dano na célula do organismo. Quando alguma doença ou lesão danifica as células, a LDH pode ser liberada na corrente sanguínea e aumentará o teor de LDH no sangue. Níveis altos de LDH no sangue indicam danos celulares agudos ou crônicos.

A LDH está presente praticamente em todos os órgãos e tecidos do organismo, inclusive no tecido muscular, e sua atividade catalítica no soro é devido à presença de várias isoenzimas. A atividade da LDH é determinada de acordo com a seguinte reação.

Equação 1: Atividade da LDH

O aumento de LDH pode estar relacionado com lesões musculares de etiologias variadas e deficiência de vitamina E, selênio e mioglobinúria. Normalmente, a LDH aumenta menos rapidamente do que a CK, porém mantém seus valores elevados por mais tempo. É uma enzima que se apresenta como um bom indicador de lesão muscular (GONZÁLES e SILVA, 2006).

Chan, Moriwak e De Rosa (2013) descrevem que nos ensaios de dano celular, a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) tem sido utilizada como principal marcador de lise celular. O teste baseia-se na redução de NAD a NADH pela LDH. Nos desenhos experimentais, a LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato, enquanto o NADH é oxidado para NAD⁺, sendo que a atividade catalítica é determinada pela velocidade de desaparecimento do NADH, ou seja, quanto maior a liberação da enzima e consequentemente a perda da integridade da membrana, maior a atividade da enzima.

A lactato desidrogenase é uma enzima tetramétrica que apresenta cinco isoenzimas (LDH1: Coração, hemácias e rins; LDH2: coração e sistema retículo endotelial; LDH3: pulmões e outros órgãos; LDH4: placenta e pâncreas e LDH5: fígado e músculo esquelético), que catalisam a conversão do lactato a piruvato em todos os tecidos. Essas isoenzimas são encontradas em concentrações variadas nesses tecidos. A atividade sérica de LDH não é bastante específica, entretanto, dano muscular, hepático e hemólise, são as maiores causas da sua elevação (LIMA JÚNIOR, 2008).

A LDH é uma enzima que não somente funciona como enzima de ligação entre o metabolismo de proteínas e carboidratos, mas também serve como indicadora de condições fisiológicas ou estruturais alteradas. Esta enzima desempenha um papel importante em condições de estresse ocasionado por agentes químicos (ISAIAS, 2006).

Barbaro e colaboradores (2007) verificaram uma atividade miotóxica do extrato epidérmico de *P. falkneri* que induziu uma notável liberação de CK.

O veneno bruto de *P. maculatus* induziu um aumento da concentração sérica de CK em relação à solução salina, indicando a presença de lesões musculares nos camundongos após a administração do veneno bruto de *P. maculatus* (SARMIENTO et al, 2015).

O presente estudo representa a primeira investigação dos efeitos *in vivo* do muco da arraia dulcícola *P. aiereba*, provendo informações com aplicações na clínica e terapia do acidente com este animal.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Identificar atividades tóxicas presentes no muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba* em camundongos *Swiss*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar atividade edemaciante causado pelo muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba*
- Avaliar a atividade nociceptiva causado pelo muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba*
- Avaliar a interação leucócito-endotélio causado pelo muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba*
- Avaliar os danos celulares causado pelo muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba*
- Avaliar atividade necrosante causado pelo muco da arraia de água doce *Paratrygon aiereba*

4. MÉTODOS

4.1 Coleta das Arraias

As arraias *Paratrygon aiereba* foram coletadas no Ribeirão do Carmo, afluente do rio Tocantins no município de Porto Nacional – TO, coordenadas geográficas: 10°42,271”S 48°30,337”W, com o auxílio de um pescador da região.

Figura 4: Local de Coleta e o Município de Porto Nacional

A captura dos animais foi realizada com a Licença Ambiental n.º 6781-1/2014, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

Todos os animais capturados (n=25) foram depositados na Coleção de Peixes do Laboratório de Ictiologia Sistemática da Universidade Federal do Tocantins (UFT) Campus da cidade de Porto Nacional – TO, sob o tombo UNT-14304.

A experimentação animal foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN – Protocolo n.º126/2013.

4.2 Obtenção e processamento das amostras de muco e veneno

A extração do muco das arraias *Paratrygon aiereba* foi realizada no Laboratório de Ictiologia da UFT/Porto Nacional – TO, por meio de raspagem do epitélio que recobre o dorso (muco) e armazenados a -20°C até o momento do uso (MONTEIRO-DOS-SANTOS et al., 2011).

Figura 5: Processamento das arraias *Paratrygon aiereba*.

Figura 6: Fluxograma da obtenção do muco epidérmico da arraia *Paratrygon aiereba*.

Figura 7: Fluxograma da obtenção do muco epidérmico da arraia *Paratrygon aiereba*.

Foi realizado um *pool* do muco de todas as arraiaas capturadas. As amostras são diluídas em salina e centrifugadas por 15 minutos a 1190 X g e o sobrenadante, filtrado com filtro de 0,22 µm.

4.3 Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelos seguintes métodos: Bradford (1976) e leitura no aparelho *Nanovue* (*NanoDrop 2000*, *ThermoScientific*, USA).

O método de Bradford foi utilizado para verificar a concentração de proteínas do veneno e muco total, utilizando albumina bovina como padrão. Em um tubo de ensaio 100 µL da amostra foi diluído em 1 mL de solução de Bradford. Após a incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente foi realizada à leitura da absorbância das amostras a 595 nm. Os testes foram realizados em triplicata e foi considerada a média dos resultados.

A dosagem da concentração de proteínas dos picos coletados foi realizada no aparelho *Nanovue*. É aplicado no aparelho 2 µL de amostra no aparelho, este volume equivale a 1mg/mL e água destilada foi utilizada como branco.

4.4 Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (para os ensaios de edema, nocicepção, dano celular e necrose) e machos (desenho experimental do tipo interação leucócito-endotélio), pesando entre 20 a 25g, provenientes do Biotério do IPEN.

Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*.

A manipulação destes animais, antes e durante os ensaios, foi balizado agrades das normas de cuidados de animais de laboratórios e com os princípios de ética e experimentação animal.

4.5 Formação de Edema

O efeito da atividade edemaciante do muco de arraia foi avaliado, através de um desenho amostral constituído por quatro (4) grupos contendo seis (6) camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g), em que foram inoculadas com 50 µL nas patas posteriores, recebendo 25, 50 e 100 µg de muco na pata direita, e na pata esquerda solução PBS (controle negativo). Os resultados foram expressos pela diferença entre o volume da pata experimental e controle, medidos por pletismômetro (*Plethysmômetro* 7140, Ugo Basile, IT). O volume das patas foi medido após 0 minuto, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24h por Pletismografia (KIMURA et al., 2014).

4.6 Atividade Nociceptiva

Para os ensaios nociceptivos foram utilizados cinco (5) grupos de camundongos da linhagem *Swiss*, fêmeas (n=6/grupo), pesando entre 20 e 22 g, provenientes do Biotério do IPEN e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia do Butantã, com água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12h. Os animais foram mantidos em gaiolas com isolador nas condições de umidade, luminosidade e temperatura ideais.

Para avaliação da atividade nociceptiva camundongos *Swiss* fêmeas foram colocados individualmente sob funis de vidro invertidos localizados sobre

uma superfície refletora para facilitar a observação. Após um período de adaptação de pelo menos 10min, os animais receberam injeção intraplantar, na pata posterior e esquerda com 30 μ L das amostras de muco (12,5, 25, 50, 100, 200 μ g) e PBS (controle negativo) e colocados individualmente sob funis de vidros localizados sobre uma superfície refletora para facilitar a observação (HUNSKAAR et al. 1985).

Após a injeção das diferentes doses, foi medida a reatividade considerada como o tempo gasto, em segundos, em que os animais lambem ou mordem a pata injetada, durante 30min de avaliação experimental. A fim de avaliar as diferentes respostas relacionadas à indução de dor neurogênica (expressa de 0-5min após a injeção) e a dor inflamatória (expressa de 15-30min após a injeção).

Figura 8: Preparo dos animais para o teste de nocicepção.

Os resultados foram expressos como o tempo de reatividade dos animais e representa a média de dois diferentes experimentos adicionadas do desvio-padrão.

4.7 Interação Leucócito-endotélio

A dinâmica da alteração no sistema microcirculatório foi determinada utilizando-se microscopia intravital, por transiluminação do músculo cremaster após a aplicação tópica do muco da *Paratrygon aiereba*. A administração de 20 µL de PBS estéril foi utilizada como controle.

Foram utilizados 05 (cinco) grupos de camundongos *Swiss* machos (n=6/grupo) pesando entre 25 a 30 g.

Foram inoculadas soluções com 30 µL com diferentes concentrações de muco por grupo animal: 12,5 µg, 25 µg, 50µg, 100 µg e 200 µg. Além do grupo controle, onde foi inoculada apenas solução de PBS estéril (controle negativo).

Os camundongos *Swiss* foram previamente anestesiados com xilazina a 0,4% (Coopazine®, Schering-Plough) e posteriormente a anestesia foi mantida com 0,2 g/kg de hidrato de cloral, então, o músculo cremaster foi exposto para análise microscópica *in situ* como descrito por Baez (1973) e Lomonte et al. (1994). Os animais foram mantidos em uma placa termostaticamente regulada para a temperatura de 37°C, que inclui uma plataforma transparente, na qual o tecido a ser transiluminado, neste caso o *cremaster*, é colocado.

Após a estabilização da microcirculação, o número de células em *rolling* e os leucócitos que aderem às vênulas pós-capilares são contados após a aplicação tópica do muco, até 40 min. As contagens e alterações morfo-fisiológicas no *cremaster* e no sistema microvascular são acompanhados em um microscópio óptico (Axiolab, Carl-Zeiss), acoplado a uma câmera fotográfica (Coolpix 990-Nikon) equipada com objetiva de x10/025 e 1.6 optovar, conforme Santos e colaboradores (2011).

4.8 Avaliação de Dano Muscular – LDH (Desidrogenase Láctica)

Portanto, para verificar o dano muscular, utilizou-se o desenho experimental desenvolvido por Caproni (2009), em que se empregou o *kit* LDH *Liquiform* da

Labtest para quantificar o dano muscular ocasionado pelo muco da *Paratrygon aiereba*.

Os animais escolhidos para o experimento foram os camundongos Swiss fêmeas (n= 30 animais). Estes foram divididos em seis tratamentos, cada um com cinco animais, sendo um grupo controle e cinco grupos testes (12,5 µg/50µl; 25 µg/50µl; 50 µg/50µl; 100 µg/50µl e 200µg/50µl).

Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com o muco da *P. aiereba* em solução salina 0,9%. Após um período de 3 horas, realizou-se a coleta de sangue, via plexo retro orbital e posterior separação do plasma.

Para verificar a presença de LDH no plasma coletado utilizou-se um reagente denominado Reagente de Trabalho, preparado da seguinte maneira:

Reagente de trabalho = Reagente 1 + Reagente 2 em que:

Equação 2: Preparo do reagente de trabalho

- I. **Reagente 1:** contém NADH 360 µmol/L e azida sódica 15 mmol/L
- II. **Reagente 2:** contém tampão 250 mmol/L, piruvato de sódio 6 mmol/L e azida sódica 15 mmol/L

Com o reagente de trabalho pronto, adicionou-se 2 µL da amostra de plasma a cada 100 µL do reagente em poços predeterminados e procedeu-se as leituras (Biochrom libra S22) após 1 min. (A1) e 2 min. (A2) a 340 nm. Ao término das leituras foi realizado o cálculo da Atividade. Para o cálculo da Atividade, utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$\Delta A \text{ Teste} = \left(\frac{A1 - A2}{2} \right)$$

Equação 3: variação da Absorbância

A1 = Absorbância inicial

A2 = Absorbância final

$$\text{Atividade desidrogenase Láctica} = \Delta A \text{ teste} \cdot 8095$$

Equação 4: Atividade desidrogenase láctica

4.9 Atividade Necrosante

Com relação ao envenenamento por acidentes de arraias, foram estudados os efeitos do muco na atividade necrosante. Grupos de 6 camundongos *Swiss* fêmeas (25-30 g) foram inoculadas 50 μ L das amostras de muco (200 μ g) e PBS (controle negativo), no dorso. Os pelos do dorso dos animais foram retirados para facilitar o inóculo das soluções de muco via intradérmica.

Após 24h, 48h e 72h, os animais foram eutanasiados através da administração intraperitoneal de superdosagem de ketamina e xilazina. Em seguida, a pele foi removida e estendida entre as placas de vidro e a área necrosante medida.

4.10 Análise Estatística

A comparação entre os valores quantitativos foi realizada pelo teste de análise de variância - ANOVA, verificando a homogeneidade de variâncias. Foram consideradas significativas as comparações cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p < 0.05$). As estimativas estatísticas foram desenvolvidas pelo pacote estatístico *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad software*, Inc San Diego, Califórnia, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Dosagem de proteínas

A figura 07 mostra dados da dosagem de proteínas realizada pelo método de Bradford (1976) em amostras de muco coletadas em diferentes anos. Foi observado que a dosagem de proteínas do muco filtrado a 0,22 μm em anos diferentes tiveram resultados muito próximos, isto mostra, que as proteínas não degradaram ao longo dos anos e que o processamento das amostras tem reprodutibilidade. A concentração de proteínas no material coletado apenas no filtro de 8 μm é quase o dobro da concentração de proteínas encontradas nas amostras 0,22 μm , mostrando que o filtro apesar de esterilizar o material, retira proteínas da amostra. Dessa forma, o material escolhido para desenvolver este trabalho foi o muco filtrado a 8 μm a vácuo. O material coletado nos anos de 2014 e 2015 foi utilizado pelo grupo em outros experimentos.

Tabela 2: Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) do muco de *P. aiereba* coletadas em diferentes anos congelados a -20°C

Amostra	Abs (595 nm)	Resultado ($\mu\text{g/mL}$)
Muco filtrado com filtros de 0,22 μm coleta ano 2014	0,200	359,920
Muco filtrado com filtros de 0,22 μm coleta ano 2015	0,205	369,535

5.2 Formação do Edema

Os efeitos da atividade edemaciante do muco de arraia *Paratrygon aiereba* foram avaliados, sendo que o efeito da quantidade de muco (25, 50 e 100 μg) não foi diagnosticado ($p > 0.05$). O comportamento da concentração pode ser visualizado através da Figura 9.

Figura 9: Atividade edematogênica do muco da arraia *Paratrygon aiereba* induzida em camundongos Swiss ($n=24$) em diferentes quantidades de muco (25, 50 e 100 μg). Cada barra representa a média e o erro padrão das leituras no pletismômetro

O modelo proposto através da técnica ANOVA Two-way aponta que o tempo é um fator determinante na formação do edema ($p < 0.0001$), posto isso, realizou-se um teste para verificar se entre os tempos estudados havia diferença significativa.

Verificou-se que ao fixar a concentração, o efeito do tempo era significativo em relação à formação do edema. Na concentração de 25 μg foi possível verificar que o tempo 0 (zero) foi diferente significativamente em relação aos tempos (0.5 h, 1h, 2h e 4h) ($p < 0.0001$) e apresentou o mesmo comportamento que o tempo de 24h ($p > 0.9999$).

Outro ponto verificado, descreve que os tempos 0.5h, 1h, 2h e 4h apresentaram a mesma diferença significativa em relação ao tempo de 24 h ($p < 0.0001$) (Quadro 1).

Avaliando a concentração de 50 µg, nota-se que há uma diferença significativa entre os tempos 0 e 0.5h, 0 e 1h e 0 e 2h ($p < 0.0001$) e entre os tempos 0h vs 24h, 1h vs 24h ($p < 0.0001$) (*Quadro 2*).

O padrão temporal foi observado para a concentração de 100µg/30µl, uma vez que os tempos iniciais (0.5 h, 1h, 2h) foram estatisticamente diferente do tempo 0 e 24h (*Quadro 3*).

Analisando o comportamento da atividade edemaciante em relação ao tempo (Figura 10), nota-se que o efeito do edema é mais acentuado nas primeiras horas da inoculação, entretanto averigua-se que após 4h do acidente esta ação tende a diminuir nas concentrações estudadas.

Figura 10: Atividade edemaciante em relação ao tempo. Cada ponto representa a média com o erro padrão de todos os volumes medidos, em cada tempo, nas quantidades de muco estudado.

Para verificar a diferença de volume entre as patas testes (direita) e patas controles (esquerda), foi desenhado o procedimento *PROC GLM*, do software SAS, que permite especificar qualquer grau de interação (efeitos cruzados) e efeitos aninhados. Além disso, através do conceito de estimabilidade, o procedimento GLM pode fornecer testes de hipóteses para os efeitos de um modelo linear (*Figura 11*).

Figura 11: Volume das patas testes e controle após inoculação do muco de *Paratrygon aiereba*. Cada Ponto representa a média e o erro padrão de todos os volumes medidos.

Nota-se que após a análise de variância, o modelo adotado apontou para uma forte significância ($p < 0.0001$), entre os volumes das patas que receberam o muco e as patas que receberam PBS (*Tabela 3*).

Tabela 3: Análise de Variância para determinar a atividade edemaciante.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de quadrado	Quadrado Médio	F	P
Modelo	6	0.01754167	0.00292361	18.23	<.0001
Erro	65	0.01042361	0.00016036		
Total	71	0.02796528			

Ainda assim, realizou-se o teste de Duncan para confirmar a hipótese de que as patas injetadas com muco de *Paratrygon aiereba* apresentariam um volume maior do que as patas controles (Tabela 4)

Tabela 4: Teste de Duncan

Agrupamento Duncan	Médias	N	Tipo
A	0.1611	36	Direita
B	0.1325	36	Esquerda

Nota: Médias com mesma letra não apresentam diferença significativa

Sugere-se com isso que a atividade edemaciante do muco da arraia *Paratrygon aiereba* apresenta-se fortemente nas primeiras horas do acidente.

Realizou-se também a estatística descritiva dos resíduos padronizados, tendo como variável dependente o volume das patas dos camundongos (patas teste e patas controles). É possível verificar que este modelo apresentou forte significância para a variação dos volumes das patas ($P > F$) (Tabela 5)

Tabela 5: Modelo GLM com o volume da pata sendo a variável dependente

Fonte	Graus de liberdade	Tipo I SS	Quadrado Médio	F	P>F
Tempo	5	0.0028	0.0005	3.5	0.0073
Patras	1	0.0147	0.0147	91.88	>.0001

Nota-se pela *Figura 12*, que o volume das patas da direita (teste) apresenta maior variação em relação ao volume das patas da esquerda em todos os tempos analisados (0h, 0.5h, 1h; 2h; 4h; 24h).

Figura 12: Relação Volume (ml) das patas e o tempo

5.2 Atividade Nociceptiva

Com relação à atividade nociceptiva pode-se notar na *Figura 13* e na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** que as concentrações testes a apresentaram diferença significativa em relação ao controle PBS ($p < 0.05$).

Figura 13: Teste para verificar a Atividade nociceptiva do muco de *Paratrygon aiereba*. Cada ponto representa a média e o erro padrão da reatividade, em relação a quantidade de muco analisado.

Para avaliar a atividade nociceptiva, diferentes doses do muco foram injetadas intraplantarmente. PBS foi utilizado como controle negativo. A reatividade foi expressa como o tempo (em s) para animais lambem e/ou morder a pata injetada durante um período de 30 min.

Foi verificado que a atividade nociceptiva não apresentou uma relação dose dependente direta, posto que as maiores médias foram detectadas nas menores concentrações.

Tabela 6: ANOVA do teste de Nocicepção

Fonte de variação	Soma de quadrado	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F	P
Concentração	5575	5	1115	39.41	P=0.0014
Indivíduos	698.5	4	174.6	6.172	P=0.0021
Erro	565.8	20	28.29	-	-
Total	6839	29	-	-	-

5.3 Interação Leucócito-endotélio

A Figura 14 representa o efeito da alteração da microcirculação em decorrência da aplicação do muco da arraia *P. aiereba* no músculo cremaster de camundongos, utilizando microscopia intravital.

Figura 14: Gráfico representativo que mostra o número de leucócitos após aplicação tópica de 30µL contendo muco de *Paratrygon aiereba* em diferentes tempos.

Percebe-se que no tempo basal (0 min) não houve diferença estatística ($p > 0.9999$) entre as concentrações estudadas. Além disso, as concentrações de 12,5 µg e 25 µg não apresentaram significância no tempo de 10 minutos.

Nos tempos (10, 20 e 30 minutos), ao comparar a quantidade de 12,5 µg com as concentrações de 100 µg e 200µg, apresentaram diferenças estatísticas

($p < 0,0001$). Então, foi verificado que o efeito da concentração foi considerado extremamente significativo.

A aplicação tópica de muco induziu um aumento de recrutamento celular caracterizada pelo número de leucócitos rolantes (*Figura 15*).

Figura 15: Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 100 µg/30µl decorrido 20 minutos.

As fotografias foram obtidas a partir de imagens digitalizadas no monitor do computador. Estes dados são representativos de observações em seis camundongos analisados em dias diferentes.

Figura 16:Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 100 µg/30µl decorrido 30 minutos.

As fotografias foram obtidas a partir de imagens digitalizadas no monitor do computador. Estes dados são representativos de observações em seis camundongos analisados em dias diferentes.

Figura 17: Leucócitos rolantes após aplicação tópica de 50 $\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ decorrido 30 minutos.

As fotografias foram obtidas a partir de imagens digitalizadas no monitor do computador. Estes dados são representativos de observações em seis camundongos analisados em dias diferentes.

Ao final dos 30 minutos do experimento, notou-se que na concentração de 25 μg de muco, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao tempo basal.

5.4 Atividade da Desidrogenase Láctica (U/l)

Foi determinado os níveis de lesão celular com liberação de conteúdo citoplasmático, sendo que há uma significância extremamente forte ($p < 0,0001$) entre os tratamentos (Figura 18).

Figura 18: Atividade da desidrogenase Láctica (U/l). Cada barra representa a média e o erro padrão da desidrogenase láctica, em relação ao tratamento.

Para comparar cada par de médias (tratamentos), foi desenhado o método de comparação múltipla proposto por Fisher e usualmente chamado de teste ou procedimento de Bonferroni.

Com isso, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os tratamentos controle/tratamento 12,5 µg/30 µl, Controle/tratamento 200 µg/30 µl, tratamento 12,5 µg/30 µl/tratamento 200 µg/30 µl e tratamento 50 µg/30 µl/tratamento 100 µg/30 µl (Quadro 5).

5.5 Atividade Necrosante

Foi verificado que o muco de arraia *Paratrygon aiereba* não causou atividade necrosante no modelo e na concentração utilizada neste trabalho (Figura 19).

Figura 19: Imagens referentes ao teste de atividade necrosante. Figura A: Controle; Figura B: Ação do muco após 24h; Figura C: Ação do muco após 48h e Figura D: Ação do muco após 72h

6. DISCUSSÃO

A formação de edema é uma consequência comum aos processos inflamatórios cutâneos e é dependente de um sinergismo entre mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo, com consequente extravasamento de líquidos e de células plasmáticas que acumulam nos espaços intercelulares. Outra consequência da permeabilidade capilar alterada no local do acidente é o extravasamento de leucócitos no tecido (BRAIN e WILLIAMS, 1985; LIMA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2006).

Essas alterações locais, com referência à atividade edemaciante ou edematógena, foram verificadas através da figura 6 e tabela 1, em que se constatou um aumento no volume das patas testes (aquelas que receberam concentrações de muco) em relação às patas controles.

Estes resultados sugerem que existem proteases no muco, que contribuem para a degradação de proteínas e componentes presentes na matriz extracelular, favorecendo o estabelecimento do edema, corroborando com os achados de Lameiras (2013) que ao analisar os extratos de muco do ferrão das arraias *P. motoro* e *P. iwamae* verificou a presença de componentes capazes de degradar gelatina, sugerindo que as proteases presentes nos extratos, podem contribuir para a destruição da matriz extracelular, acarretando em lesão local causada pelo muco.

Thomazi (2016), verificou que tanto o muco quanto o veneno de *Paratrygon aiereba* são imunogênicos, estimularam a produção de anticorpos, e que esta capacidade antigênica provavelmente se deve ao fato que venenos animais, inclusive de peixes, são compostos por uma variedade de proteínas e peptídeos biologicamente ativos.

Para Sosa-Rosales et al. (2005) os venenos de peixe são conhecidos por induzir edema intenso em camundongos. Em seus estudos Barbaro et al. (2007) demonstraram que o muco da arraia dulcícola *Potamotrygon falkneri* e da arraia marinha *Dasyatis guttata* induziram atividade de edema após 15 minutos de injeção, fato semelhante ao encontrado neste trabalho, em que os maiores volumes de edema foram entre os tempos de 30 min a 2h.

Já Magalhães e colaboradores (2006) verificaram que o veneno de *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. Orbignyi* provocaram um edema máximo durante os primeiros 30 minutos, apresentando uma acentuada diminuição após quatro horas da injeção. Com relação à diminuição do volume de edema, os dados de Magalhães e pesquisadores (2006) corroboram com as informações deste trabalho, haja vista que a atividade edematógena teve sua redução após as 4h de inoculação do muco.

Monteiro-dos-santos et al.(2011) verificaram, que após a injeção subplantar de veneno e muco de *Potamotrygon cf. henlei*, ocorreu o surgimento de edema da pata, com uma resposta significativa e padrões semelhantes a este trabalho, com um ápice do edema nos primeiros 30 minutos e uma queda acentuada após 3 horas.

O principal sintoma associado às lesões deste acidente é a dor imediata de grande intensidade após a picada, sendo que a dor persiste após 2 horas, pelo menos. Os outros sintomas descritos são a parestesia local, edema, eritema e hemorrágico e áreas de necrose (HADDAD et al., 2004).

Em seus estudos Kimura et al.(2014) observaram que o veneno de *Potamotrygon motoro stingray* estimula a atividade edemaciante. O edema foi observado após 15 minutos da injeção de veneno, com um pico máximo aos 30 minutos, e uma diminuição após 4h.

Lima e pesquisadores (2003) estudando o veneno do *Thalassophryne nattereri* verificaram que a resposta máxima, em relação ao teste de edema, foi observada em 2 horas após a injeção de veneno em comparação com o grupo controle ao longo de 48 h.

Para Kimura e colaboradores (2014), essa variação em relação à duração da resposta ao edema, induzida pelo veneno de diferentes arraias, pode ser, além das diferenças interespecíficas entre venenos, as diferenças nas técnicas de medição, à perda de atividade venenosa causada pela termolabilidade, demonstrando a necessidade de extrema cuidado no armazenamento destas toxinas.

Para a variação em relação à duração da resposta ao edema induzida por veneno de arraias pode ser, além de diferenças interespecíficas entre venenos/muco ou diferenças nas técnicas de medição, devido à perda de atividade

de veneno causada pela temperatura (MAGALHÃES et al. 2006, KIMURA et al. 2014).

Santos et al. (2014) descreveram que os sinais mais frequentes são de dor, edema e necrose decorrentes dos acidentes com arraias. Outros registros importantes foram que a dor foi mais comumente observada a partir de 60 minutos após o acidente com a arraia, e que o ferimento cicatriza em períodos superiores a 20 dias após o acidente. Os presentes resultados também foram observados entre populações acidentadas em Tocantins.

As informações, referentes à atividade nocicepção deste trabalho, não apresentaram uma relação de dose dependente do muco de *Paratrygon aiereba*, diferindo da maioria dos trabalhos realizados com os vários gêneros de arraias dulcícolas. Entretanto, pode-se verificar que as diferentes concentrações do muco de *Paratrygon aiereba*, diferiu significativamente do grupo controle. Posto isso, pode-se inferir a presença de substâncias no muco, capazes de ativar os nociceptores.

Estes dados são corroborados pelos resultados de BARBARO et al. (2007), que detectaram atividade nociceptiva do muco de *Potamotrygon falkneri*, em que a injeção de venenos de arraia na pata direita do camundongo induziu o ato de lamber a pata durante 30 minutos, que atingiu o seu máximo em 25 µg de proteína do veneno, e estabilizando depois.

Entretanto MONTEIRO-DOS-SANTOS et al.(2011) estudando *Potamotrygon cf. henlei*, verificaram que a resposta nociceptiva observada após a injeção de veneno e muco no camundongo foi semelhante em todas as amostras, que atingiu o seu máximo a 100 µg de proteínas.

Para Barbaro et al. (2007) o muco e veneno de arraias possuem enzimas capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, favorecendo o estabelecimento da ferida.

Segundo Magalhaes et al. (2006) o veneno das arraias *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. Orbignyi* desenvolve resposta nociceptiva podendo estar associada ao aumento do rolamento e adesividade de leucócitos ao endotélio de camundongos.

A formação de edema é uma característica comum dos processos inflamatórios cutâneos e depende de um sinergismo entre mediadores que

aumentam a permeabilidade vascular e aqueles que aumentam o fluxo sanguíneo (BRAIN e WILLIAMS, 1985).

Para Cermeño et al. (2005) a dor, o eritema e o sangramento da ferida foram as manifestações clínicas mais frequentes no seu trabalho. A dor, que ocorre alguns minutos após a punção, espalha-se rapidamente e aumenta até se tornar insuportável, sendo que pescadores relataram que a intensidade máxima da dor ocorre aproximadamente uma hora após a lesão. O recrutamento celular começou aos 10 min após a aplicação tópica, conforme observado por Monteiro-dos-Santos et al. (2011).

Os dados deste trabalho são corroborados com os de Magalhães et al. (2006), que estudando as propriedades biológicas e bioquímicas de veneno das arraias *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbignyi*, verificaram que após a aplicação do veneno, o mesmo aumentou o número de leucócitos rolantes.

Um estudo com o extrato de espinhos do peixe *Porichthys porosissimus* demonstrou que aplicação tópica de 25 e 50 µg do extrato de espinhos induziu um aumento do recrutamento celular caracterizado pelo número de rolamento de leucócitos, sendo que para ambas as doses testadas o pico de recrutamento celular foi a 40 minutos de experiência (LOPES-FERREIRA et al., 2014 a).

Ainda nesta linha, os dados deste trabalho são coerentes com os observados de Lopes-Ferreira (2014b), que estudando o veneno do peixe *Pseudoplatystoma fasciatum* averiguou que a aplicação tópica de concentrações diferentes de veneno induziu um aumento da mobilização celular caracterizado por um número aumentado de leucócitos.

Smthi et al. (2004) evidenciaram que o veneno das arraias *P. cf. scobina* e *P. gr. orbignyi* originam processos inflamatórios locais, bem como alterações no nível microcirculatório de camundongos, revelados por microscopia intravital. Essa situação levaria a liberação no local da picada de mediadores vasoativos, como citocinas.

Ramos et al. (2009) avaliou os efeitos inflamatórios das proteínas do veneno e do muco *Cathorops spixii* (bagre amarelo) na microcirculação no músculo cremaster do camundongo por microscopia intravital. A aplicação tópica do veneno e do muco induziram mudanças no ambiente microcirculatório.

Conceição et al. (2009) relataram em seu estudo que a aplicação tópica do peptídeo Porflan isolado do veneno de *Potamotrygon gr. orbignyi* produziu um

aumento no número de leucócitos rolantes em vénulas. Os bioensaios caracterizaram esses peptídeos com uma atividade potente em um ambiente microcirculatório, sugerindo que essas substâncias são uma nova classe de toxinas de peixes, diretamente envolvidas nos processos inflamatórios de uma ferroadada de arraia.

Optou-se neste trabalho por utilizar o biomarcador LDH em relação a CK, para auxiliando na prevenção da ocorrência de possíveis danos musculares e processos inflamatórios severos. Os marcadores encontrados com mais frequência são a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). Estas moléculas são analisadas, pois são de origem citoplasmática e não possuem capacidade de migrar do citosol para a região intersticial dos músculos e corrente sanguínea.

O aumento das concentrações séricas e plasmáticas do CK e LDH permite a compreensão do extravasamento dessas substâncias, consequentes das lesões de membrana celular (WILLOUGHBY, MCFARLIN e BOIS, 2010).

As toxinas encontradas no tecido que cobrem os ferrões de *P. falkneri* foram capazes de causar danos locais severos, caracterizados principalmente por necrose precoce. A associação da ação dessas toxinas com o trauma mecânico causado pelo ferrão pode explicar a necrose local e as sequelas graves observadas em humanos feridos por arraias de água doce (ANTONIAZZI et al., 2011).

Para Masson et al. (2012) os níveis excessivamente elevados de CK no soro reforçam a ideia de que se deve atribuir mais importância aos acidentes de arraias, independentemente da magnitude das feridas externas, uma vez que possuem um elevado grau de poder para ferir o tecido.

Ação proteolítica também foi observada, porém, sem causar necrose, embora possam aparecer casos com tais características, mesmo que esporadicamente, na clínica com os acidentados (HADDAD Jr. e MARTINS, 2006). Para Haddad (2000, 2007) a necrose ocorre geralmente por infecções secundárias causadas por ações bacterianas.

Para Kirchhoff e colaboradores (2014) há uma mudança quantitativa do veneno durante a maturidade da arraia, diagnosticada através dos padrões cromatográficos observados, bem como os compostos de veneno de baixo peso molecular que não variam entre os estádios de maturidade. Entretanto, os estudos preliminares de Barbaro et al. (2007) e Haddad et al. (2004) indicaram que algumas

atividades enzimáticas registradas com veneno de arraias dulcícolas estavam relacionadas a analitos de alto peso molecular.

Aires (2018), em comunicação oral, relatou que em seu trabalho o muco da arraia *P. aiereba* apresentou atividade significativa contra fosfolipídios A2. Estes, segundo Magalhães (2017) podem estar diretamente ligadas a ação local do envenenamento uma vez que podem apresentar, além das proteases que têm um papel bem conhecido nas reações do envenenamento potencializando a ação local.

Thomazi (2017) detalhou que o muco irradiado a 2kGy foi eficaz em estimular a produção de anticorpos específicos, estas imunoglobulinas são capazes de reconhecer algum composto do muco que é responsável pela atividade edematogênica, pois no muco deve haver a presença de agente responsável pelo edema que é antigênico.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho evidenciou que os acidentes por arraia *Paratrygon aiereba* constituem um importante agravo de saúde para a população, tanto para quem faz o uso das águas para o lazer ou para o trabalho.

Analisando o comportamento da atividade edemaciante em relação ao tempo, nota-se que o efeito do edema é mais acentuado nas primeiras horas do acidente, entretanto averigua-se que após 4h do acidente esta ação tende a diminuir. O modelo proposto aponta que o tempo é um fator determinante na formação do edema ($p < 0.0001$), pois há diferença significativa ($p < 0.0001$), entre os volumes das patas testes e controles.

Com relação a atividade nociceptiva pode-se notar que as concentrações testes apresentaram diferença significativa em relação ao controle PBS ($p < 0,05$). Foi verificado que a atividade nociceptiva não apresentou uma relação dose dependente direta, posto que as maiores médias foram detectadas nas menores concentrações.

Com relação a dinâmica do rolamento de leucócito, percebeu-se que ao final dos 30 minutos do experimento, notou-se que na concentração de 25 μg de muco, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao tempo basal. Nos tempos (10, 20 e 30 minutos), ao comparar a quantidade de 12,5 μg com as concentrações de 100 μg e 200 μg , apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,0001$), sendo o efeito da concentração foi considerado extremamente significativo.

Atestou-se os níveis de lesão celular com liberação de conteúdo citoplasmático, sendo que há uma significância extremamente forte ($p < 0,0001$) entre os tratamentos (concentração).

Foi verificado que o muco de arraia *Paratrygon aiereba* não causou atividade necrosante no modelo e na concentração utilizada neste trabalho.

Os resultados deste evidenciaram os efeitos locais, como consequência principal do acidente por arraia *Paratrygon aiereba*. Sendo o tratamento do agravo assintomático, sugere-se que inicialmente seja lavada a área da ferroadada, seguida do debridamento do ferimento, finalizando com o uso de antibióticos e analgésicos.

Os dados obtidos sugerem ainda que a inativação das toxinas é a única forma de dirimir as consequências do acidente, com a produção de soro para atenuar os efeitos locais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L.A.; LIRA, M. S.; JARED, S. G.; NETO, D. G.; JARED, C.; BARBARO, K. C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 297-303, 2011.

ATKINSON, P. R. T., BOYLE, A., HARTIN, D., MCAULEY, D. Is hot water immersion an effective treatment for marine envenomation? **Emerg Med J.**, Jul; v. 23, n. 7, p. 503–508, 2006.

BABTISTELLA, M. F. Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatinina e lactato desidrogenase em equinos submetidos a diferentes intensidades de exercícios. Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente. Vol. XII, n.13, p.33-42, 2009

BARBARO KC, LIRA MS, MALTA MB, SOARES SL, GARRONE NETO D, CARDOSO JLC, SANTORO ML, HADDAD JR V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**. 50:676–87. 2007

BAUMANN, K., CASEWELL, N. R., ALI, S. A., JACKSON, T. N., VETTER, I., DOBSON, J. S., FRY, B. G. A ray of venom: Combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*). **Journal of proteomics**, 109, 188-198. 2014.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009

BAGHER, P., SEGAL, S.S. Regulation of blood flow in the microcirculation: Role of conducted vasodilation. **Acta Physiol**. 2011.

BOCHNER, R., STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n. 3, p. 735-746, 2002.

BRAIN, S.D., WILLIAMS, T.J. Inflammatory mechanisms of inflamed-tissue factor. **Agents Actions**.3, 348–356. 1985.

BRAGADEESWARAN, S.; PRIYADHARSHINI, S.; PRABHU, K.; RANI, S.R.S.. Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arela* and *Arius caelatus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**.305-309.2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1.271, de 6 de junho de 2014. Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. **Diário Oficial da União** n.º 108, Seção 1, p. 67-69, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Sinan: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora do Ministério da Saúde, 2. ed., Brasília, 2007.

CARVALHO, M. R., N. R. LOVEJOY & R. S. ROSA.. **Potamotrygonidae (river stingrays)**. Pp. 22-28. In: Reis, R.E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS. 2003. 729p.

CASTRO, T. A.; AIRES, R. S.; TURÍBIO, T. O.; NEVES, A. C. D.; GEMELLI, T. F.; ARAÚJO, R.O. PACIENTES ACIDENTADOS POR RAIAS REGISTRADOS NO SINAN DE PORTO NACIONAL - TO ENTRE 2009 E 2013. In: Josefa Moreira do Nascimento -Rocha; Raquel Silva Aires; André Moreira Rocha; Anne Caroline Dias Neves; Ronyere Olegário Araújo; Thiago Moreira rocha. (Org.). COLETÂNEA CIENTÍFICA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS: Utilizando o DATASUS Como Ferramenta de Investigação. 1ed.Porto Nacional: FAPAC/Itpac Porto Nacional, 2016, v. 2, p. 173-180.

CERMEÑO, J. R., CERMEÑO, J. J., SALAZAR, N., DE SALAZAR, N. G. (2005). Rayismo: aspectos epidemiológicos y clínicos. Estado Bolívar, Venezuela. Kasmera, 33(1), 46-51. Kasmera v.33 n.1 Maracaibo jun. 2005

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ROSA, R.S.; RINCÓN, C. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. Shark News;14:1–2.2002

CHURCH J.E.; HODGSON W.C.. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**;8:1083–93. 2002

COELHO, E.B. Mecanismos de formação de edemas. **Medicina**.;37:189-98.2004

CONCEIÇÃO, K., KONNO, K., MELO, R. L., MARQUES, E. E., HIRUMA-LIMA, C. A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. orbignyi. **Peptides**, 27(12), 3039-3046. 2006.

CONCEIÇÃO, K., SANTOS, J. M., BRUNI, F. M., KLITZKE, C. F., MARQUES, E. E., BORGES, M. H., LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. orbignyi freshwater stingray venom. **Peptides**, 30(12), 2191-2199. 2009.

CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; ISMAEL SILVA JR, P.; SOARES, A. B.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. henlei. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1368-1377, 2011.

CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; ISMAEL SILVA JR., P.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. *Potamotrygon* cf. *henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 821-829. 2012.

CURY, Y.; PICOLO, G. Venenos Animais, Dor e Analgesia. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. 2ª Ed. Editora Sarvier. 2009.

DEHGHANI H, SAJJADI MM, RAJAIAN H, SAJEDIANFARD J, PARTO P. Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by Himantura gerrardi venom. **Toxicon**, 54, 881–6, 2009.

DA SILVA, N.J., JR.; FERREIRA, K.R.C.; PINTO, R.N.L.; AIRD, S.D. **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. 2015.

DOMINGOS, M. O., FRANZOLIN, M. R., DOS ANJOS, M. T., FRANZOLIN, T. M. P., ALBES, R. C. B., DE ANDRADE, G. R., LOPES, R. J. L., BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**, v. 58, p. 147–153, 2011.

FINO, P., ONESTI, M. G., FELLI, A., SCUDERI, N. Clinical Examination and treatment of aleg ulcer caused by a stingray puncture. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.14, n. 2, p.183-6, 2015.

FOX DA, GIZINSKI A, MORGAN R, LUNDY SK. Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium. **Rheumatic diseases clinics of North America**. 36(2):311-23. 2010

GARRONE NETO, D., CORDEIRO, R. C., HADDAD JR, V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, Tocantins, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 21, 795-803. 2005

GARRONE NETO, D., HADDAD JR., V., VILELA, M. J. A., UIEDA, V. S.. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do alto rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**, 7(1): 205-208. 2007

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

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

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Perfil Bioquímico no Exercício. In: Introdução àBioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande doSul. 2006.

GUALBERTO, R.M.; MENDONÇA, A.P.; DOS SANTOS, M.C.. Uma Contribuição para a Notificação de Acidentes com Arraias: Desenvolvimento de um Sistema Web para Gerir as Notificações.**Journal of Health Informatics**, v. 8, n. 2, 2016.

GUTIÉRRE, J. M.; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. IN: In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2nd. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2009. cap. 30, p.295-313.

HADDAD JUNIOR V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**,36(5):591-7. 2003.

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

Haddad Jr, V., & Martins, I. A. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. **Toxicon**, 47(8), 838-843.2006.

HADDAD Jr, V. Animais Aquáticos Potencialmente Perigosos do Brasil: Guia Médico e Biológico. São Paulo; Editora Roca, 2007.

HADDAD Jr, Vidal et al. Trauma and envenoming caused by stingrays and other fish in a fishing community in Pontal do Paranapanema, state of São Paulo, Brazil: epidemiology, clinical aspects, and therapeutic and preventive measures. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 238-242, 2012.

HADDAD, V., JR.; CARDOSO, J.L.C.; GARRONE NETO, D. Injuries by marine and freshwater stingray: History, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, 19, 1–10. 2013

HALSTEAD, B. W. Poisonous and venomous marine animals of the world. Washington, D. C. **United States Government Printing Office, Vertebrates**, vol. 3, p.997, 1970.

HALSTEAD, B. W. Venomous marine animals of Brazil. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 33, p. 126, 1966.

HELLIO, C., PONS, A.M., BEAUPOIL, C., BOURGOUGNON, N., GAL, Y.L.. Antimicrobial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 20, 214–219. 2002

HUNSKAAR, S., FASMER, O.B., HOLE, K.,. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods** 14, 69–76. 1985.

International Association for the Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da Dor)- IASP. Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos. USA: IASP; 2010. 418p

ISAIAS, A.C.; FIORINI, M.P.; GIRARDI, L.; SILVA, M.R.A.. Estudo Eletroforético de Lactato Desidrogenase (LDH) em *Astyanax bimaculatus* provenientes de lagoas de mineração / São José dos Campos-SP. In : Encontro de Iniciação Científica e

Encontro de Pós-Graduação: Programas e Resumos, 19 e 20 de outubro . São José dos Campos: Univap, 2006.

KIMURA, L. F. ; PREZOTTO-NETO, J. P. ; SANTORO, M. L. ; BARBARO, K. C. Local inflammation induced by *Potamotrygon* Mottley stingray venom in mice and their blockade by Indomethacin and Dipyrone. XXVI Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2011

KIMURA, L. F., PREZOTTO-NETO, J. P., TAVORA, B.C.L.F., FAQUIM-MAURO, E. L., PEREIRA, N. A., ANTONIAZZI, M.M., JARED, S.G., TEIXEIRA, C. F. P., SANTORO, M. L., BARBARO, K. C. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygonmottley* stingray venom in mice. **Toxicon**, vol. 103, p. 65-73, 2015.

KIMURA, L. F., PREZOTTO-NETO, J.P., ANTONIAZZI, M.M., JARED, S.G., SANTORO, M. L., BARBARO, K.C., 2014. Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygonmottley* stingray venom in mice. **Experimental Biology and Medicine**, 239, p. 601-609, 2014.

KIRCHHOFF, K. N., KLINGELHOFER, I., DAHSE, H., MORLOCK, G., WILKE, T. Maturity-related changes in venom toxicity of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*. **Toxicon**, v. 92, p. 97-101, 2014.

KING, G. *Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics*. **Royal Society of Chemistry**: London, UK, 2015.

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

LAMEIRAS, J.L.V. Perfis protéicos, enzimáticos e miotoxicidade induzidos pelos venenos das arraias amazônicas *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello & Thorson, 1987 e *Potamotrygon mottley* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes Potamotrygonidae). 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LAMEIRAS, J. L. V., DA COSTA, O. T. F., DOS SANTOS, M. C., DUNCAN, W. L. P. Arraias de água doce (*Chondrichthyes – Potamotrygonidae*): biologia, veneno e acidentes. **Revista Scientia Amazonia**, v. 2, n. 2, 2013.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LASSO, C.A., J.S. USMA-OVIEDO, F. VILLA, M.T. SIERRA-QUINTERO, A. ORTEGA-LARA, L.M. MES, M.A. PATINO, O.M. LASSO-ALCALÁ, M.A. MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A. A.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties

of the Brazilian Potamotrygon stingrays: Potamotrygon cf. scobina and Potamotrygon gr. orbignyi. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006.

LIMA, L. A. F. D.; FERREIRA, M. L. Estudo clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe Thalassophryne nattereri (niquim); Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish Thalassophryne nattereri (niquim). **An. bras. dermatol.** v. 75, n. 4, p. 435-443. 2000.

LIMA-JUNIOR, F.F. **Determinação das concentrações de lactatodesidrogenase e fosfatase alcalina no soro e no fluido abdominal de cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) para classificação das efusões e diferenciação entre fluidos neoplásicos e não neoplásicos.** 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ.

LIU, X.P., ZHANG, K.L., YU, Y.J., FANG, L.H., WANG, H.Q., SUN, Y.Z. Observation on microstructure and ultrastructure of the venomous gland in stingray (*Dasyatis laevis* CHU). **Acta Zoologica Sinica** 47 (2), 221–225. 2001

LOPES-FERREIRA, M., EMIM, J.A., OLIVEIRA, V., PUZER, L., CEZARI, M.H., ARAUJO, M.S., JULIANO, L., LAPA, A.J., SOUCCAR, C., MOURA-DA-SILVA, A.M. Kininogenase activity of Thalassophryne nattereri fish venom. **Biochem. Pharmacol.** 68, 2151–2157. 2004.

LOPES-FERREIRA, Mônica et al. Clinical manifestations and experimental studies on the spine extract of the toadfish *Porichthys porosissimus*. **Toxicon**, v. 86, p. 28-39, 2014a.

LOPES-FERREIRA, Mônica et al. First report of interruption of mast cell degranulation and endothelial cells activation by anti-inflammatory drugs controlling the acute response provoked by *Pseudoplatystoma fasciatum* fish venom. **Toxicon**, v. 90, p. 237-248, 2014b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ictismo. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos SAÚDE/ASCOM/PRE/FUNASA, A. D. C. E. E.E. Brasília. 81-85 p. 2001.

MAGALHÃES, K. W., LIMA, C., PIRAN-SOARES, A. A., MARQUES, E. E., HIRUMA-LIMA, C. A., LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: Potamotrygon cf. scobina and Potamotrygon gr. orbignyi. **Toxicon**, 47(5), 575-583. 2006.

MAGALHÃES, M. R.; DA SILVA JR, N. J.; ULHOA, C. J. A hyaluronidase from Potamotrygon motoro (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. **Toxicon**, v. 51, n. 6, p. 1060-1067, 2008.

MAGALHÃES, Marta Regina. Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri*. 2017. vii, 97 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Animal)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

MASSON A.A.; ORMONDE, C.P.H.A.; CARVALHO J.L.V.. Rhabdomyolysis secondary to an accident with marine stingray (Dasyatis family). **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.18.n3. 2012

MARTIN, R.A. **Evolution and Zoogeography of freshwater elasmobranchs with notes on their conservation**. In: Biology of conservation of freshwater elasmobranchs (MARTIN, A., MacKINLEY, D. Eds.). Int. Cong. Biol. Fish. Manaus, 2004.

MARTIN, R. A.. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs: a review. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 85: 1049-1073. 2005

MEYER, P.K. Stingray injuries. *Wilderness Environ. Med.* 8, 24-28. 1997

MONDIN, A. C. **Caracterização toxicológica de venenos do bagre marinho *Cathorops spixii* (Ariidae)**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORALES-BENTACOURT, K. GONZÁLEZ-OROPERA, M.P. QUICENO, A. FERRER & F. SUAREZ. Peces de la estrella fluvial Inírida: ríos Guaviare, Inírida, Atabapo y Orinoco (Orinoquía colombiana). **Biota Colombiana**, 10(1-2): 89-122. 2009.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J. Toxicidade da peçonha de arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* (*Chondrichthyes Potamotrygonidae*) em relação ao sexo e fases do desenvolvimento ontogenético (jovem e adulto). Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO, 2012.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J., CONCEIÇÃO, K., SEIBERT, C. S., MARQUES, E. E., SILVA JR., P. I., SOARES, A. B., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. *International Immunopharmacology*, v. 11, p. 1368–1377, 2011.

MOURA, R. S., AGUIAR, A. S., MELGAREJO, A. R., & DE CARVALHO, L. C.. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, 36(5), 771-780. 1998.

MOZUMDER, M.M.H. Antimicrobial Activity in Fish Mucus from Farmed Fish. **Norwegian College of Fishery Science**, University of Tromsø, Norway..2005

NELSON, J. S. *Fishes of the World*. 4th. New Jersey, USA: 2006. 601

OLIVEIRA, N. B.; JÚNIOR, O. R. P. Venenos e peçonhas animais: aplicações tecnológicas e Biopirataria. In 6º amostra de produção científica da pós-graduação lato sensu da PUC de Goiás (p. 20). Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Retrieved from [www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/NATIELA BEATRIZ DE OLIVEIRA E OSMINDO RODRIGUES PIRES JÚNIOR.PDF](http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/NATIELA_BEATRIZ_DE_OLIVEIRA_E_OSMINDO_RODRIGUES_PIRES_JUNIOR.PDF). 2011.

OLIVEIRA, L.P... Avaliação da citotoxicidade do extrato do ferrão de arraia *Potamotrygon falkneri* (Myliobatiformes: Potamotrygonidae). 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, N. G., FERNANDES, G.R., CARDOSO, M.H.;CANDIDO, E.S; GARRONE NETO, D.; MORTARI, M.R.; SCHWARTZ, EF, FRANCO, OL; ALENCAR, S. A. Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil. **Scientific reports**. 2016; 6:1-13

PARDAL, P.P.O. Aspectos clínicos e epidemiológicos dos acidentes por arraias nos distritos de Mosqueiro e Outeiro, Belém-Pará-Brasil. 2002.

PARDAL, P.P.O. **Ictismo por arraia**. In Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. Cardoso, J.L.C. et al. São Paulo: Sarvier, 2010.

PASSOS, A. P; PIMENTA, M. A.; THOMAZI, G. O. C.; AIRES, R. S.; TURÍBIO, T. O. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES VÍTIMAS DE ACIDENTES POR RAIAS ATENDIDOS NO HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO NACIONAL/TO, 2012 A 2015. In: Josefa Moreira do Nascimento -Rocha; Raquel Silva Aires; André Moreira Rocha; Anne Caroline Dias Neves; Ronyere Olegário Araújo; Thiago Moreira rocha. (Org.). COLETÂNEA CIENTÍFICA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS: Informação Científica Baseada em Evidências. 1ed.Porto Nacional: FAPAC/Itpac Porto Nacional, 2016, v. 1, p. 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. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 688-97, 2007.

PERL, E. R. Pain mechanisms: A commentary on concepts and issues. *Progress in Neurobiology*, v. 94, p. 20-38, 2011.

PINTO, C. H. V., DA SILVA, B. C. G., DE LIMA FREIRE, P. G., BERNARDES, D., TAVARES, J. C., & FERRARI, R. J. Deconvolução Cega Aplicada à Correção de Artefatos de Movimento em Imagens de Vídeo de Microscopia Intravital para Detecção Automática de Leucócitos. **Revista de Informática Teórica e Aplicada**, 22(1), 52-74. 2015.

RAMOS, A. D., CONCEIÇÃO, K., SILVA, P. I., RICHARDSON, M., LIMA, C., & LOPES-FERREIRA, M. Specialization of the sting venom and skin mucus of *Cathorops spixii* reveals functional diversification of the toxins. **Toxicon**, 59(6), 651-665. 2012

RAJESHKUMAR, R. K., VENNILA, R., KARTHIKEYAN, S., PRASAD, N. R., ARUMUGAM, M., VELPANDIAN, T., BALASUBRAMANIAM, T. Antiproliferative activity of marine stingray *Dasyatis sephen* venom on human cervical carcinoma cell line. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 21(1), 41. 2015.

RAY, N. A concave cost formulation for parametric curve fitting: Detection of leukocytes from intravital microscopy images. In **Image Processing (ICIP), 2010 17th IEEE International Conference on** (pp. 53-56). IEEE. 2010.

RIBEIRO, D. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

RODRIGUES SF, GRANGER DN. Blood cells and endothelial barrier function. **Tissuebarriers**. 3(1-2). 2015.

ROSA, RS. Systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Tese Doutorado. College of William and Mary, 1985.

RIUS, C., SANZ, M. J. Intravital Microscopy in the Cremaster Muscle Microcirculation for Endothelial Dysfunction Studies. **Methods in Mouse Atherosclerosis**, 357-366. 2015.

MONTEIRO DOS SANTOS, J; SEIBERT, C.S.; ARAÚJO, GC.; BERTOLIN, A.O.; MARQUES, E.E. Habitat de arraia em rios e o perigo de acidentes Valorado pelo acidente na bacia Tocantins Araguaia. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 24-38, 2014

SANTOS, E. peixes de água doce: vida e costumes dos peixes do Brasil. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987.

SÁ-OLIVEIRA, J.C.; COSTA, E.A.; PENA, F.P.S.. Acidentes por raias (Potamotrygonidae) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 1, n. 2, p. 74-78, 2011.

SARMIENTO, B. E.C. Caracterização dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a sintomatologia dos acidentes gerados pelo peixe *Pimelodus maculatus* (Siluriforme: Pimelodidae) e avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso do ferrão. 2015.

SARMIENTO, B. E., RANGEL, M., GONÇALVES, J. C., PEREIRA, L., REGO, S., CAMPOS, L. A., SCHWARTZ, E. F. First report of the characterization of the pathophysiological mechanisms caused by the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (order: Siluriformes). **Toxicon**, 101, 55-62. 2015.

SCHIERA, A., BATTIFOGLIO, M. L., SCARABELLI, G., CRIPPA, D.. Stingray injury in a domestic aquarium. **International journal of dermatology**, 41(1), 50-51. 2002

SILVA, T.B.; UIEDA V.S. Preliminary data on the feeding habits of the freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Biota Neotropica**, v7 (n1). 2007.

SOSA-ROSALES, J.I., PIRAN-SOARES, A.A., FARSKY, S.H., TAKEHARA, H.A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish. **venom. Toxicon** 45, 155–161. 2005.

SMITH, M.L., SPERANDIO, M., GALKINA, E.V., LEY, K. Autoperfused mouse flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P-selectin and E-selectin. **J. Leukoc. Biol.** 76, 985–993. 2004

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N.W.; MACKINNON, S.L..Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Pasesa*

SUKRITI S, TAUSEEF M, YAZBECK P, MEHTA D. Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary circulation**. 4(4):535-51. 2014.

THOMAZI, G. O. C. Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2016.

TORREZ PPQ, QUIROGA MM, SAID R, ABATI PAM, FRANÇA FOS. Tetanus After Envenomations Caused By Freshwater Stingrays. **Toxicon**. 97:32-35. 2015

URSIN, H. Brain sensitization to external and internal stimuli. **Psychoneuroendocrinology**, 42, 134-145. 2014.

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

ZIEGMAN, R.; ALEWOOD, P. Bioactive Components in Fish Venoms. **Toxins**, 7, 1497-1531. 2015

WENINGER, W., BIRO, M., & JAIN, R.. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. **Nature Reviews Immunology**, 14(4), 232-246. 2014.

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

WILLOUGHBY, D. S., MCFARLIN, B. BOIS, C. Interleukin-6 Expression After Repeated Bouts of Eccentric Exercise. **Int J Sports Med**, 24(2), 15–21. 2010.

ANEXOS

Quadro 1: Análise estatística do tempo para a concentração de 25 µg/30 µl

Teste de Fisher	Diferença de Médias	Significante?	Sumário	P Valor
0 vs. 0.5 h	-0.04	Sim	****	<0.0001
0 vs. 1 h	-0.04167	Sim	****	<0.0001
0 vs. 2 h	-0.035	Sim	****	<0.0001
0 vs. 4 h	-0.02333	Sim	****	<0.0001
0 vs. 24 h	0	Não	ns	>0.9999
0.5 h vs. 1 h	-0.001667	Não	ns	0.7617
0.5 h vs. 2 h	0.005	Não	ns	0.3641
0.5 h vs. 4 h	0.01667	Sim	**	0.0032
0.5 h vs. 24 h	0.04	Sim	****	<0.0001
1 h vs. 2 h	0.006667	Não	ns	0.2273
1 h vs. 4 h	0.01833	Sim	**	0.0013
1 h vs. 24 h	0.04167	Sim	****	<0.0001
2 h vs. 4 h	0.01167	Sim	*	0.0364
2 h vs. 24 h	0.035	Sim	****	<0.0001
4 h vs. 24 h	0.02333	Sim	****	<0.0001

Quadro 2: Análise estatística do tempo para a concentração de 50 µg/30 µl

Teste de Fisher	Diferença de Médias	Significante?	Sumário	P Valor
0 vs. 0.5 h	-0.035	Sim	****	<0.0001
0 vs. 1 h	-0.03333	Sim	****	<0.0001
0 vs. 2 h	-0.02833	Sim	****	<0.0001
0 vs. 4 h	-0.01	Não	ns	0.0718
0 vs. 24 h	-0.006667	Não	ns	0.2273
0.5 h vs. 1 h	0.001667	Não	ns	0.7617
0.5 h vs. 2 h	0.006667	Não	ns	0.2273
0.5 h vs. 4 h	0.025	Sim	****	<0.0001
0.5 h vs. 24 h	0.02833	Sim	****	<0.0001
1 h vs. 2 h	0.005	Não	ns	0.3641
1 h vs. 4 h	0.02333	Sim	****	<0.0001

1 h vs. 24 h	0.02667	Sim	****	<0.0001
2 h vs. 4 h	0.01833	Sim	**	0.0013
2 h vs. 24 h	0.02167	Sim	***	0.0002
4 h vs. 24 h	0.003333	Não	ns	0.5446

Quadro 3: Análise estatística do tempo para a concentração de 100 µg/30 µl

Teste de Fisher	Diferença de Médias	Significante?	Sumário	P Valor
0 vs. 0.5 h	-0.045	Sim	****	<0.0001
0 vs. 1 h	-0.03833	Sim	****	<0.0001
0 vs. 2 h	-0.04167	Sim	****	<0.0001
0 vs. 4 h	-0.02167	Sim	***	0.0002
0 vs. 24 h	-0.005	Não	ns	0.3641
0.5 h vs. 1 h	0.006667	Não	ns	0.2273
0.5 h vs. 2 h	0.003333	Não	ns	0.5446
0.5 h vs. 4 h	0.02333	Sim	****	<0.0001
0.5 h vs. 24 h	0.04	Sim	****	<0.0001
1 h vs. 2 h	-0.003333	Não	ns	0.5446
1 h vs. 4 h	0.01667	Sim	**	0.0032
1 h vs. 24 h	0.03333	Sim	****	<0.0001
2 h vs. 4 h	0.02	Sim	***	0.0005
2 h vs. 24 h	0.03667	Sim	****	<0.0001
4 h vs. 24 h	0.01667	Sim	**	0.0032

Quadro 4: Comparação das médias através do teste de Bonferroni

Comparações do teste de Bonferroni	Significante?	Sumário	Valor de P ajustado
12,5 ug vs. 25 ug	Sim	*	0.0479
12,5 ug vs. 50 ug	Sim	**	0.0023
12,5 ug vs. 100 ug	Sim	*	0.0257
12,5 ug vs. 200ug	Sim	*	0.0329
25 ug vs. 50 ug	Não	ns	0.4738
25 ug vs. 100 ug	Não	ns	0.1148
25 ug vs. 200ug	Não	ns	0.08

50 ug vs. 100 ug	Não	ns	0.7207
50 ug vs. 200ug	Sim	**	0.0081
100 ug vs. 200ug	Não	ns	>0.9999
12,5 ug vs. PBS	Não	ns	0.0586
25 ug vs. PBS	Sim	*	0.0476
50 ug vs. PBS	Sim	**	0.0045
100 ug vs. PBS	Sim	*	0.0316
200ug vs. PBS	Sim	*	0.0291

Nota: ns: Não Significante estatisticamente a $p < 0.05$.

Quadro 5: Comparações múltiplas via teste de Bonferroni

Comparações Múltiplas via Teste de Bonferroni	Significância	Sumário	P value ajustado
Controle/[12,5 µg/30µl]	Não	ns	0.4056
Controle/[25µg/30µl]	Sim	****	<0.0001
Controle/[50 µg/30µl]	Sim	****	<0.0001
Controle/[100 µg/30µl]	Sim	****	<0.0001
Controle/[200 µg/30µl]	Não	ns	0.386
[12,5 µg/30µl]/ [25µg/30µl]	Sim	****	<0.0001
[12,5 µg/30µl]/ [50µg/30µl]	Sim	**	0.0084
[12,5 µg/30µl]/ [100µg/30µl]	Sim	**	0.0026
[12,5 µg/ 30µl]/[200µg/ 30µl]µg	Não	ns	>0.9999
[25µg/30µl]/[50 µg/30µl]	Sim	**	0.0079
[25µg/30µl]/[100/30µl]	Sim	*	0.0248
[25µg/30µl]/[200 µg/30µl]	Sim	****	<0.0001
[50 µg/30µl]/[100/30µl]	Não	ns	>0.9999
[50 µg/30µl]/[200 µg/30µl]	Sim	**	0.0089
[100/30µl]/[200/30µl] µg	Sim	**	0.0028

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**PEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**