



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS – UFT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE

**PEIXES PEÇONHENTOS E A INTERAÇÃO COM O HOMEM:
O ACIDENTE E SUAS CONSEQUENCIAS**

Janaina Cardoso dos Santos

PALMAS –TO
2016

JANAINA CARDOSO DOS SANTOS

**PEIXES PEÇONHENTOS E A INTERAÇÃO COM O HOMEM:
O ACIDENTE E SUAS CONSEQUÊNCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Fundação Universidade Federal do Tocantins – UFT, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Simone Seibert
Co-Orientadora: Dr^a. Mônica Lopes Ferreira

PALMAS- TO
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237p Santos, Janaina Cardoso dos .
PEIXES PEÇONHENTOS E A INTERAÇÃO COM O HOMEM: O
ACIDENTE E SUAS CONSEQUÊNCIAS. / Janaina Cardoso dos
Santos. – Palmas, TO, 2016.
85 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Ciências do Ambiente, 2016.

Orientadora : Dr^a. Carla Simone Seibert

Coorientadora : Dr^a. Mônica Lopes Ferreira

1. Peixes venenosos. 2. Ictismo. 3. Veneno. 4. Acidentes. I. Título

CDD 628

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde
que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica
da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS – UFT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE

TERMO DE APROVAÇÃO

JANAINA CARDOSO DOS SANTOS

PEIXES PEÇONHENTOS E O HOMEM:
O ACIDENTE E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente - Ciamb, Universidade Federal do Tocantins, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Carla Simone Seibert
Orientadora – Ciamb, UFT

Prof. Dra. Elineide Marques
Membro Interno – Ciamb, UFT

Prof. Dra. Gessi Carvalho de Araújo
Membro Externo – Departamento de Medicina, UFT

Prof. Dr. Victor Alberto Tagliacollo
Membro suplente – Ciamb, UFT

Palmas, 30 de junho 2016.

Agradecimentos

A SEDUC-TO, pelo incentivo ao aprimoramento profissional.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

A Professora Dr^a. Carla Simone Seibert, pela paciência, carinho, apoio e incentivo ao aprimoramento profissional.

A Dr^a. Mônica Ferreira Lopes e a Dr^a. Carla Lima do Instituto Butantan pela colaboração e orientação neste, e em outros trabalhos desenvolvidos. Assim como a equipe do Laboratório de Imunorregulação pelo companheirismo e carinho em me receber e acompanhar nos experimentos.

A professora Dr^a. Elineide Eugênio Marques e ao Núcleo de Estudos Ambientais - Neamb/UFT, pelo apoio nas coletas de campo.

Ao Everton Oliveira, biólogo técnico do laboratório de ictiologia sistemática do Campus de Porto Nacional, pelo apoio na catologação das arraia.

Ao colega biólogo Anderson Brito Soares, indispensável na identificação das arraia.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de arraias.

Quadro 2 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de bages ou mandis.

Quadro 3 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe escorpião.

Quadro 4 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe leão.

Quadro 5 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe manteiga.

Quadro 6 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe pedra.

Quadro 7 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe sapo ou niguin.

Quadro 8 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe diabo.

Quadro 9 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe soldado.

Quadro 10 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe vespa.

Quadro 11. Quadro resumo com nome popular e científico dos peixes peçonhentos, características do aparelho inoculador das toxinas, quadro clínico e atividades biológicas desencadeadas pelo veneno.

Quadro 12. Quadro resumo das moléculas isoladas do veneno bruto de algumas espécies de peixes peçonhentos.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Mapa da distribuição dos peixes venenosos.

Figura 2: Ferrões de arraia de água doce (*Potamotrygon cf. henlei*).

Figura 3. Ferrões de *Thalassophryne nattereri*.

Figura 4: Espinho opercular de *Porichthys porosissimus*.

Figura 5. Manifestação clínica do envenenamento por *Thalassophryne nattereri*.

Figura 6. Necrose e debridamento de lesão causada por peixe pedra.

Figura 7. Lesão no terceiro dedo causado por *Porichthys porosissimus* através do espinho opercular.

CAPÍTULO 2

Figura 1: Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB), Coleção de peixes da Fundação Universidade Federal do Tocantins.

Figura 2: Pontos de coleta de arraias - reservatório da Usina Hidrelétrica do Lajeado – Porto Real, município de Porto Nacional-TO.

Figura 3: Sequência da extração do veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*.

Figura 4. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal.

Figura 5. Leucócitos aderidos em vênulas pós-capilares do músculo cremaster.

Figura 6. O rolamento de leucócitos induzido na microcirculação pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* depende de sinais derivados da ligação de IL-33 ao receptor ST2.

Figura 7. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal.

Figura 8. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal.

Figura 9. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz a produção de IL-33 e KC na cavidade peritoneal.

Figura 10. Os tratamentos alteram o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Espécies de peixes venenosos e a epidemiologia dos acidentes	17
1.2 Aparelho inoculador.....	26
1.3 Quadro clínico.....	29
1.4 Tratamentos.....	32
1.5 Propriedades químicas e biológicas	33
1.6 O impacto social nos acidentes	40
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 2	53
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1 Coleta das arraias.....	56
2.2 Extração da peçonha	57
2.3 Animais.....	58
2.4 Protocolo experimental	58
2.5 Tratamentos e neutralizações.....	59
2.6 Avaliação por microscopia Intravital do rolamento de leucócitos.....	60
2.7 Quantificação da migração de leucócitos na cavidade peritoneal	60
2.8 Quantificação de quimiocina	61
2.9 Análise estatística	61
3. RESULTADOS	61

3.1 Padronização da concentração de proteínas do veneno de <i>Potamotrygon cf. henlei</i>	62
3.2 Indução do rolamento de leucócitos na microcirculação pelo veneno de <i>Potamotrygon cf. henlei</i>	64
3.3 Recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal induzida pelo veneno de <i>Potamotrygon cf. henlei</i>	66
3.4 O veneno de <i>Potamotrygon cf. henlei</i> induz a produção de KC na cavidade peritoneal	69
3.5 Os tratamentos alteram o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, induzido pelo veneno de <i>Potamotrygon cf. henlei</i>	70
4. DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

As regiões neotropicais possuem uma riqueza maior de espécies de peixes quando comparadas às regiões temperadas (LOWE-MCCONNELL, 1999), o que pode ser constatado por combinações de fatores geológicos, climáticos e ecológicos, além dos processos evolutivos e históricos (LOWE-MCCONNELL, 1999; RICKLEFS, 2004; BOULTON *et al.*, 2008). Possuindo cerca de 8.000 espécies, a região Neotropical é conhecida por apresentar a maior diversidade e riqueza de espécies de peixes do planeta (LAMMERT & ALLAN, 1999; SCHAEFER, 2000; REIS *et al.*, 2003; KAVALCO & PAZZA, 2007), das quais aproximadamente 5.000 pertencem à ictiofauna das águas continentais da América do Sul (REIS *et al.*, 2003).

O Brasil dispõe da maior rede hidrográfica do mundo, apresentando por isso um alto grau de diversidade e elevada complexidade, com características de ecossistemas bastante diferenciados, o que propicia o desenvolvimento de múltiplas espécies da flora e da fauna aquática (COSTA, 2006; GIL *et al.*, 2007). Esse conjunto de ecossistemas aquáticos comporta parte da rica biodiversidade brasileira, que segundo Godinho (1993) é a ictiofauna mais diversificada do planeta. A exemplo disso está a bacia Amazônica, que possui o maior número de espécie de peixes de todos os sistemas fluviais existentes (VARI & MALABARBA, 1998; REIS *et al.*, 2003; GRANADO-LORENCIO *et al.*, 2007).

Toda essa diversidade biológica possibilita a presença de um grande número de animais que podem ocasionar acidentes pelo encontro com humanos, através de seus venenos (HADDAD JR., 2000). Os animais, assim como outros seres vivos, desenvolveram ao longo da evolução estratégias de sobrevivência para defender-se, defender seu território e até mesmo sua prole. A produção de toxinas por animais é uma excelente estratégia que garante sua sobrevivência, nos mais variados ecossistemas.

As toxinas animais tem se tornado, há alguns anos, um alvo frequente de pesquisas científicas, no entanto, essas pesquisas concentram-se em venenos de animais terrestres como serpentes (MARQUER *et al.*, 2011), escorpiões (XIE *et al.*, 2014), aranhas (ALLAH *et al.*, 2011), lacraias (CAI *et al.*, 2013) entre outros. Em contraste, são poucos os estudos sobre os venenos produzidos por peixes.

Os peixes produzem uma variedade de metabólitos, dos quais resultam em combinações que formam diversas estruturas químicas e complexas moléculas, como peptídeos e proteínas com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelos venenos de animais terrestres (RUSSELL *et al.*, 1971;

MATSUBARA SHIBAO *et al.*, 2013; SHIBAO *et al.*, 2015). As pesquisas realizadas utilizando toxinas provenientes de animais aquáticos demonstram que elas dispõem de substâncias com distintas atividades farmacológicas (OLIVEIRA *et al.*, 1990; NUIJEN *et al.*, 1999; RINEHART *et al.*, 2000; CVETKOVIC *et al.*, 2002; VAN-KESTEREN *et al.*, 2002).

Peixes de importância toxicológica podem ser diferenciados em venenosos ou peçonhentos. Os venenosos adquirem suas toxinas incorporando veneno de plantas, algas ou outros organismos através da cadeia trófica ou possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos (MINISTERIO DA SAÚDE, 2001), como exemplos temos o baiacu, a garoupa, barracuda e a bicuda. Já os peixes peçonhentos possuem glândulas especializadas na secreção de substâncias tóxicas e algumas espécies podem possuir um aparato especializado na inoculação do veneno (POUGH *et al.*, 2008). No Brasil não há relatos de acidentes fatais com peixes peçonhentos, no entanto, estes podem ser responsáveis por acidentes graves que levam a diversos graus de morbidade (HADDAD JR., 2000).

A maioria das famílias e gêneros de peixes peçonhentos possuem representantes em rios e mares brasileiros (HADDAD JR *et al.*, 2000), e os que mais causam acidentes são as arraias (HADDAD JR., 2004), os bagres (HADDAD JR., 2000), o peixe-escorpião (FIGUEIREDO & MENEZES, 1978; HADDAD JR. *et al.*, 2003) e o niquim (AUTO, 1992; ALMEIDA & ROCHA, 1989; FONSECA & LOPES, 2000; HADDAD JR *et al.*, 2003; FACÓ *et al.*, 2005).

Apesar da existência de trabalhos na literatura sobre a toxicidade dos peixes, em especial sobre as arraias, pouco ainda se conhece sobre as toxinas desses animais, seus efeitos no organismo humano e seus tratamentos. Esta falta de informação acerca das toxinas acaba por afetar o modo como estão sendo tratados os agravos por peixes no Brasil, principalmente pelas arraias da família Potamotrygonidae. Fatores como a produção de pequenas quantidades de veneno, a ineficácia dos métodos de extração destas toxinas e a dificuldade para capturar o animal, representam algumas das dificuldades encontradas nesta área de pesquisa.

No intuito de elucidar possíveis diferenças na gravidade dos acidentes provocados por peixes, em especial as arraias, neste estudo foi utilizado dois processos de análise: 1) revisão de literatura sobre os acidentes humanos provocados por peixes; e 2) estudo experimental para investigar a importância da resposta imunológica induzida pelo veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*.

Desse modo, o presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, o primeiro aponta o conhecimento científico acerca dos acidentes provocados por peixes. E o

segundo investiga o eixo IL-33/ST2 na resposta inata dependente de mástocitos induzida pelo veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, v. 2, p. 49-51, 1989.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Revista da Escola de Ciências Médica de Alagoas**, v. 5, p. 35-36, 1992.

BOULTON, A. J., L.; BOYERO, A. P.; COVICH, M.; DOBSON, S.; LAKE & R. PEARSON. Are tropical streams ecologically different from temperate streams? In: Dudgeon, D. (Ed). **Tropical stream ecology**. USA: Elsevier, 2008. Cap. 9, p. 257-284.

COSTA, M. C.; **Caracterização da assembléia de peixes da sub-bacia do rio Claro e suas relações com os padrões de ocupação humana no sudoeste do Estado de Goiás – Brasil**. Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2006.

CVETKOVIC, R. S.; FIGGIT, D. P.; PLOSKER, G. L. ET- 746. **Drugs**, v. 62, p. 1185-1192, 2002.

FACÓ, P. E.; BARBOSA, P. S.; BEZERRA, G. P.; MARTINS, A. M.; GUIMARÃES, J. A.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceara State (1992). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 479-482, 2005.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Brasil – II. Teleostei (1)**. Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 34-95, 1978.

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 75, p. 435-443, 2000.

GIL, A. S. B.; OLIVEIRA, A. L. R.; BOVE, C. B. Listagem florística das *Cyperacea* hidrófilas da região do alto e médio Rio Araguaia, Goiás, Mato Grosso e Tocantins, Brasil - Parte I. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 101-110, 2007.

GODINHO, A.L. E os peixes de Minas em 2010? **Ciência Hoje**, v. 16, n. 91, p. 44-49, 1993.

GRANADO, L. C.; LOBÓN, C. J.; ARAUJO, L. C. R. M. Floodplain lake .sh assemblages in the Amazon River: directions in conservation biology. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 679-692, 2007.

HADDAD JR. V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento**. São Paulo: Editora Rocca, 2000. p. 145.

HADDAD JR. V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Repor of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 45, p. 221-223, 2003.

HADDAD, JR. V.; NETO, D. G.; DE PAULA NETO, J. B.; DE LUNA MARQUES, F. P.; BÁRBARO, 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, p. 287-294, 2004.

KAVALCO, K. F. & R. PAZZA. Aspectos biogeográficos de componentes da ictiofauna da América Central. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 147-153, 2007.

LAMMERT, M.; ALLAN, J. D. Environmental Auditing: Assessing Biotic Integrity of Streams: Effects of Scale in Measuring the Influence of Land Use/Cover and Habitat Structure on Fish and Macroinvertebrates. **Environmental Management**, v. 23, p. 257-270, 1999.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999. 534p.

NUIJEN, B.; BOUMA, M.; HENRAR, R.; MANADA, C.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. **Anticancer Drugs**, v. 10, p. 879-886, 1999.

OLIVERA, B. M.; RIVIER, J.; CRAIG C.; CECILIA, A. R.; CORPUZ, G. P.; ABOGADIE, F.; MENA E. E.; WOODWARD, S. R.; HILLYARD, D. R.; CRUZ, L. J. Diversity of Conus neuropeptides. **Science**, v. 249, p. 257-263, 1990.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **CHECK List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742 p.

RICKLEFS, R. E. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. **Ecology Letters**, v. 7, p. 1-15, 2004.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, p. 1-27, 2000.

RUSSELL, F. E. **Poisonous Marine Animals**. New York: TFH Publications, 1971.
SANTOS, J. M.; 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.

SCHAEFER, S. **Fishes of inundated tropical savannas: diversity and endemism in the serrania Huanchaca of eastern Bolivia**. The American Museum Center for Biodiversity and Conservation. p. 1-25, 2000.

VAN KESTEREN, C.; TWELVES, C.; BOWMAN, A.; HOEKMAN, K.; LOPEZ-JAZARO JIMENO, J.; GUZMÁN, C.; MATHOT, R. A.; SIMPSON, A.; VERMORKEN J. B.; SMYTL, J.; SCHELLENS, J. H.; HILLEBRAND, M. J.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacology of the novel marine-derived anticancer agent ecteinascidin 743 administered as a 1- and 3-h infusion in a phase I study. **Anticancer Drugs**, v. 13, p. 381-393, 2002.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. **Neotropical Ichthyology: an Overview**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. 1-11 p.

SHIBAO, P. Y. *THALASSOPHRYNE*; ANJOLETTE, F. A.P.; LOPES, N. P.; Eliane C. ARANTES, E. C. First serine protease inhibitor isolated from *Rhinella schneideri* poison. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 30, p 1-5, 2015.

MATSUBARA, F. H.; GREMSKI, L. H.; MEISSNER, G. O.; CONSTANTINO, L. E. S.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brownspider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, p. 147-158, 2013.

POUGH, H. F.; JANIS, M. C.; HEISER B. J.; **A vida dos vertebrados**. 4° Ed. São Paulo. Atheneu Editora. 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2° ed. Brasília. Fundação Nacional de Saúde. 2001.

MARQUER, C.; FRUCHART-GAILLARD, C.; LETELLIER, G.; MARCON, E.; MOURIER, G.; ZINN-JUSTIN, S.; MÉNEZ, A.; SERVENT, D.; GILQUIN, B. Structural model of ligand-G protein-coupled receptor (GPCR) complex based on experimental double mutant cycle data: MT7 snake toxin bound to dimeric hM1 muscarinic receptor. **Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31661-75, 2011.

XIE, C.; LI, *THALASSOPHRYNE*; XU, L.; YU, C.; CAO, Z.; LI, W.; WU, Y. Kv1.3 potassium channel-blocking toxin Ctri9577, novel gating modifier of Kv4.3 potassium channel from the scorpion toxin family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 444, p. 406–410, 2014.

ALLAH, D. S.; MODDASSIR, A. Z. M.; SHER, A. K.; IMRAN, H.; ZAHID, A. M.; SHAHID, M.; NASIR, A. S. Spider toxin (Hvt) gene cloned under phloem specific RSs1 and RolC promoters provides resistance against American bollworm (*Heliothis armigera*). **Biotechnol Letters**, n. 33, p. 1457–1463, 2011.

CAI, M.; CHOI, S.; SONG, B. K.; SON, I.; KIM, S.; YANG, E J. *Scolopendra subspinipes mutilans* attenuates neuroinflammation in symptomatic hSOD1^{sup.G93A}.sup. mice. **Journal of Neuroinflammation**, v.10, n. 131, p.2-9, 2013.

PEIXES PEÇONHENTOS: APARATO INOCULADOR, QUADRO CLÍNICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Janaina Cardoso dos SANTOS^{1*}

¹Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Palmas, TO

*email: janaina.foco@gmail.com

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os acidentes humanos envolvendo peixes, no intuito de elucidar possíveis diferenças na gravidade dos acidentes, seu quadro clínico e tratamento empregado. Para tanto, faremos a comparação entre as espécies selecionadas para esse estudo em relação ao aparelho inoculador de veneno, o quadro clínico apresentado pelos acidentados, os tratamentos empregados e as propriedades químicas e biológicas do veneno. Para elaboração desta revisão foi realizado levantamento bibliográfico na base de dados CAPES, Sciverse Hub, Sciverse Science Direct, Sciverse Scopus, Scirus e Pubmed. Foram utilizadas as palavras chaves tanto em português como em inglês: acidentes, peixes, envenenamento e ictismo, com as quais foram encontradas 346 publicações, do período de 1961 a 2016, das quais 96 foram utilizadas como referências bibliográficas para compor a revisão. Os resultados apontam que os acidentes por animais do ambiente aquático são um importante agravo à saúde, principalmente ao trabalhador da pesca, provocando, em alguns casos, incapacidade temporária para o trabalho.

Palavras-chave: peixes peçonhentos, acidentes, envenenamento, ictismo.

Abstract

This study aimed to carry out a review of literature on human accidents involving fish in order to elucidate possible differences in the severity of accidents, their clinical and employee treatment. Therefore, we will compare the species selected for this study in relation to the inoculant device poison, the clinical picture presented by the victims, employees treatments and chemical and biological properties of the venom. For preparation of this review was carried out literature in CAPES database SciVerse Hub, SciVerse Science Direct, SciVerse Scopus, Scirus and Pubmed. key words were used in both Portuguese and English: accidents, fish, poisoning and ictismo with which were found 346 publications, from 1961 to 2016, of which 96 were used as references for inclusion in the review. The results show that the accidents from aquatic animals are an important health problem, particularly in the fishing worker, causing, in some cases, temporary incapacity for work.

Keywords: venomous fish, accidents, poisoning, ictismo.

CAPÍTULO 1

PEIXES PEÇONHENTOS: APARATO INOCULADOR, QUADRO CLÍNICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

1. INTRODUÇÃO

A distribuição global dos peixes peçonhentos é ampla, porém ocorre uma concentração mais significativa nos trópicos (HASLSTEAD, 1966). Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes venenosos têm representantes nos mares e rios brasileiros (HADDAD JR., 2003). Devido à diversidade de peixes venenosos, a interação do homem com o ambiente aquático pode ocasionar acidentes. Segundo Pardal (1993), a intoxicação local ou geral causada pela peçonha de peixes, inoculada por mordedura ou por ferroadas, bem como o envenenamento devido à ingestão de peixes venenosos por natureza ou em consequência de decomposição é denominado de ictismo.

O ictismo é classificado segundo o Ministério da Saúde (2001), como ativo e passivo. De modo geral, os ativos ocorrem quando as pessoas entram no meio ambiente destes animais ou manuseiam os mesmos, quer seja na retirada dos anzóis, das redes de pesca ou quando acidentalmente são comprimidos pelos pés e mãos humanas. O ictismo ativo pode ser produzido por peixes peçonhentos (acantatóxicos) e não peçonhentos. Os peixes considerados peçonhentos ou acantatóxicos são todos os que possuem glândulas epidérmicas de veneno associados com esporões localizados nas nadadeiras dorsais, peitorais e/ou na cauda. São representados por 40 espécies no Brasil, entre estes estão as arraias, bagres, mandis, peixes-escorpião, niquins e moréias.

Os peixes não peçonhentos causam acidentes traumáticos ou vulnerantes, geralmente ocasionados por dentes, rostros e acúleos que ao contato com o corpo humano causam lesões de extensão e profundidade variáveis como os causados por piranhas e tubarões. Existem ainda os peixes pequenos que podem penetrar em orifícios humanos (candiru) e os peixes elétricos que podem liberar descargas elétricas quando em contato com o corpo humano, como o poraquê e a arraia treme-treme (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; HADDAD, JR. 2003).

O ictismo passivo pode ser produzido por peixes venenosos (sarcotóxicos) ou não venenosos. Os acidentes sarcotóxicos ocorrem por ingestão de peixes e frutos do

mar que possuem venenos (baiacus, por exemplo) ou peixes contaminados por bactérias, dinoflagelados e produtos químicos prejudiciais a saúde humana (mercúrio, por exemplo), segundo Ministério da Saúde (2001).

O estudo sobre os acidentes causados por animais aquáticos no Brasil apresenta comunicações esparsas e pouco conclusivas em termos de epidemiologia, relato dos sinais e sintomas e medidas terapêuticas empregadas (HADDAD, JR. 2003).

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os acidentes humanos envolvendo peixes, no intuito de elucidar possíveis diferenças na gravidade dos acidentes, seu quadro clínico e tratamento empregado. Para tanto, faremos a comparação entre as espécies selecionadas para esse estudo em relação ao aparelho inoculador de veneno, o quadro clínico apresentado pelos acidentados, os tratamentos empregados e as propriedades químicas e biológicas do veneno.

Para elaboração desta revisão foi realizado levantamento bibliográfico na base de dados CAPES, Sciverse Hub, Sciverse Science Direct, Sciverse Scopus, Scirus e Pubmed. Foram utilizadas as palavras chaves tanto em português como em inglês: acidentes, peixes, envenenamento e ictismo, com as quais foram encontradas 346 publicações, do período de 1961 a 2016, das quais 96 foram utilizadas como referências bibliográficas para compor a revisão.

1.1 Espécies de peixes venenosos e a epidemiologia dos acidentes

Existem varias espécies de arraias distribuídas tanto nas costas tropicais quanto em águas temperadas (incluindo as espécies marinhas e de água doce). As espécies com maior incidência de acidentes e registros científicos são: *Potamotrygon cf. scobina*, *Potamotrygon gr. orbignyi*, *Potamotrygon falkneri*, *Potamotrygon cf. henlei*, *Potamotrygon motoro* e *Dasyatis guttata*, demonstradas no quadro 1.

As arraias são peixes de hábitos bentônicos, geralmente ficam escondidas no fundo do rio, cobertas por areia e lama. Não atacam o ser humano, mas quando pisadas acidentalmente, a arraia em um movimento defensivo utiliza sua cauda em forma de chicote para livrar-se de seu agressor (MAGALHÃES *et al.*, 2006). Nessa movimentação da cauda, é introduzido o ferrão na vítima, pois há na nadadeira caudal ferrões retro serrilhados responsáveis por causar várias lesões principalmente em mãos e pés de pescadores, populações ribeirinhas e banhistas (GARONE *et al.*, 2005; HADDAD JR. *et al.*, 2004).

Quadro 1 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de arraias.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	IMAGEM
ARRAIAS	<i>Potamotrygon cf. scobina</i> (água doce)	 <p data-bbox="970 499 1238 528">Fonte: SANTOS, 2015</p>
	<i>Potamotrygon gr. orbignyi</i> (água doce)	 <p data-bbox="970 768 1238 804">Fonte: SANTOS, 2015</p>
	<i>Potamotrygon falkneri</i> (água doce)	 <p data-bbox="884 1070 1326 1111">Fonte: GARRONE NETO <i>et al.</i>, 2007</p>
	<i>Potamotrygon cf. henlei</i> (água doce)	 <p data-bbox="970 1350 1238 1386">Fonte: SANTOS, 2015</p>
	<i>Potamotrygon motoro</i> (água doce)	 <p data-bbox="884 1630 1326 1662">Fonte: GARRONE NETO <i>et al.</i>, 2007</p>
	<i>Dasyatis guttata</i> (marinho)	 <p data-bbox="922 1937 1286 1971">Fonte: LAMEIRAS <i>et al.</i>, 2013</p>

Uma grande variedade de espécies venenosas de bagres marinhos e de água doce é encontrada em redes de pesca, muitas vezes, aumentando o risco dos acidentes (HADDAD JR., 2003; HADDAD JR., 2008). Estes são responsáveis por causar muitos acidentes envolvendo pescadores profissionais e moradores ribeirinhos. A maioria dos acidentes ocorre nas mãos das vítimas, devido à manipulação incorreta do animal ou nos pés devido as vítimas pisarem no peixe que pode estar enterrado a beira mar ou rio (HADDAD JR. & LASTÓRIA, 2005). As duas espécies aqui trabalhadas, *Pimelodus maculatus* e *Cathorops spixii*, estão demonstradas no quadro 2.

O bagre *Pimelodus maculatus* é uma das espécies de peixe de água doce que compõe o grupo dos bagres ou mandis, ocorre em todas as bacias hidrográficas do Brasil, popularmente conhecido como bagre amarelo ou mandi (HADDAD JR. *et al.*, 2012). O bagre *Cathorops spixii* é uma espécie marinha, largamente encontrada em toda a costa brasileira, principalmente nas regiões sul e sudeste (REIS, 1986).

As duas espécies de bagre, assim como outras, causam acidentes em populações ribeirinhas que o utilizam como alimento e também para comercialização (GARRONE NETO *et al.*, 2005; HADDAD JR. & MARTINS, 2006; HADDAD JR., 2008). Além disso, a sua pesca desportiva tem grande relevância em muitas regiões do Brasil (SILVA *et al.*, 2010).

Quadro 2 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de bagres ou mandis.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
BAGRES OU MANDIS	<i>Pimelodus maculatus</i> (água doce)	 <p data-bbox="954 1453 1238 1485">Fonte: ROSELET, 2004</p>
	<i>Cathorops spixii</i> (marinho)	 <p data-bbox="946 1740 1246 1771">Fonte: CAMARGO, 1998.</p>

O peixe escorpião, demonstrados no quadro 3 (*Scorpaena guttata* e *Scorpaena plumieri*) e o peixe leão, demonstradas no quadro 4 (*Dendrochirus zebra*, *Pterois Antennata* e *Pterois lunulata*), pertencem a família *Scorpaenidae* e estão presentes no

meio marinho e de água doce, largamente distribuídos em águas tropicais, temperadas e no Ártico (NELSON, 1994). São considerados os peixes venenosos mais perigosos do mundo (KIZER *et al.*, 1985; WILLIAMSON *et al.*, 1996).

A maioria dos acidentes, tanto para os peixes escorpião quanto para os peixes leão, acomete as mãos de pescadores que ao manusear as redes de pescas são feridos, causando severas lesões que podem levar a óbito (HADDAD JR. *et al.*, 2003).

Quadro 3 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe escorpião.

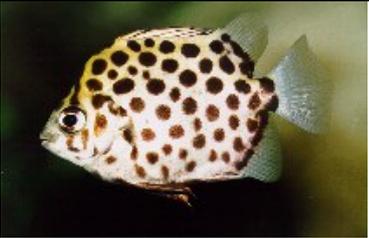
NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE ESCORPIÃO	<i>Scorpaena guttata</i> (marinho)	 <p data-bbox="943 947 1273 976">Fonte: ROBERTSON, 2010</p>
	<i>Scorpaena plumieri</i> (marinho)	 <p data-bbox="967 1216 1249 1245">Fonte: RANDALL, 1995</p>

Scatophagus argus é um peixe com origem em água salobra e em habitats marinhos da Ásia e Austrália, conhecido popularmente como peixe-manteiga. São comumente criados por aquaristas de todo o mundo, atraídos principalmente pela coloração vistosa que o animal apresenta, demonstrados no quadro 5. Em seu habitat natural é apreciado pelo sabor, atraindo muitos pescadores que por vezes desconhecem a presença de veneno e dos espinhos, acabam se ferindo ao manusear o animal de forma incorreta.

Quadro 4 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe leão.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE LEÃO	<i>Dendrochirus zebra</i> (marinho)	 Fonte: RIZZARI & LÖNNSTEDT, 2014
	<i>Pterois antennata</i> (marinho)	 Fonte: RANDALL, 1995
	<i>Pterois lunulata</i> (marinho)	 Fonte: SHAO, 1994

Quadro 5 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe manteiga.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE MANTEIGA	<i>Scatophagus argus</i> (marinho)	 Fonte: DIKIC, 1998

Os peixes pedra (quadro 6) pertencem a ordem *Scorpaeniformes* e constituem um grupo de peixes que estão entre os mais perigosos do mundo e são responsáveis por diversos casos de envenenamento grave entre os seres humanos (PHOON & ALFRED, 1965). As espécies *Synanceia horrida*, *Synanceia trachynis* e *Synanceia verrucosa* são as mais comuns entre o grupo de peixe pedra. Estes peixes são marinhos e gostam de se esconder entre as pedras e recife de corais, onde se camuflam e acabam sendo pisoteados por banhistas e pescadores. Dessa forma,

provocam lesões no membro da vítima que podem levar a óbito devido a toxicidade do veneno (KIRIAKE *et al.*, 2013).

Acidentes com peixes venenosos do gênero *Thalassophryne* são relatados em grande parte de América do Sul, onde representam um risco a saúde e grave problema social (CERVIGON, 1980; ALMEIDA & ROCHA, 1989). No Brasil são comumente encontrados na costa brasileira. Espécies como *Thalassophryne maculosa* e *Thalassophryne nattereri* são famosas por provocar acidentes com nadadores, mergulhadores e principalmente em pescadores que ao pisar ou manusear o peixe são ferroadas através de espinhos localizados na barbatana dorsal interligados a glândulas de veneno (FERREIRA *et al.*, 2016; COLLETTE, 1995). Não possuem valor comercial para o consumo humano por causa do seu aspecto desagradável.

Além dessas duas espécies, a *Porichthys porosissimus* também é conhecida como um representante do grupo dos peixes sapo. Os peixes sapo do gênero *Porichthys* são encontrados no Pacífico e Oceano Atlântico (FROESE & PAULY, 2013). Existem 14 espécies e mais gêneros que compõem esse grupo e sua ampla distribuição fazem com que sejam normalmente encontrados na rede de pesca dos pescadores, especialmente nas áreas de captura de camarões (FERREIRA *et al.*, 2014). São peixes de hábitos noturnos que se movimentam devagar e ficam enterrados na areia e fundo lamacento aguardando a oportunidade de capturarem uma presa como camarões e peixes menores. Os acidentes humanos ocorrem pela manipulação do peixe ou por pisoteamento (FRÓES, 1933). As espécies de bagres são demonstradas no quadro 7.

Quadro 6 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe pedra.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE PEDRA	<i>Synanceja horrida</i> (marinho)	 Fonte: ERDMANN, 2010
	<i>Synanceia verrucosa</i> (marinho)	 Fonte: RANDALL, 1995
	<i>Synanceia trachynis</i> (marinho)	 Fonte: RANDALL, 1995

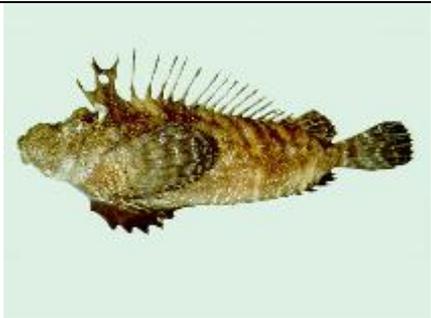
Quadro 7 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe sabo ou niguin.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE SAPO OU NIQUIN	<i>Thalassophryne nattereri</i> (marinho)	 Fonte: FERREIRA <i>et al.</i> , 2014.
	<i>Thalassophryne maculosa</i> (marinho)	 Fonte: FERREIRA <i>et al.</i> , 2016
	<i>Porichthys porosissimus</i> (marinho)	 Fonte: FERREIRA <i>et al.</i> , 2014.

O peixe diabo (quadro 8) é mais um exemplar da ordem *Scorpaeniformes*, composta por várias espécies de peixes venenosos capazes de provocar acidentes humanos ao serem pisados ou manipulados indevidamente (KIRIAKE et al., 2013).

Inimicus japonicus é amplamente distribuído ao longo das áreas costeiras do leste da Ásia (TAKUSHIMA et al 2003). Na China e no Japão o peixe diabo é utilizado para a produção de larvas artificialmente, sendo considerado como uma nova espécie comercialmente importante para a aquicultura (LIU & QUAN 2005; KADOMURA et al., 2006; CHEN et al., 2009; KIM et al., 2012).

Quadro 8 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe diabo.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
Peixe diabo	<i>Inimicus japonicus</i> (marinho)	

Fonte: SHAO, 1994

O peixe soldado (*Gymnapistes marmoratus*) é parente do peixe pedra e habita a região costeira da Austrália (SUTHERLAND, 1983), demonstradas no quadro 9. Seu conjunto de espinhos causam lesões severas em humanos, semelhantes à de seu parente peixe pedra (CHURCH et al., 2001).

Quadro 9 – Nome popular do peixe, espécie e imagem do exemplar de peixe soldado.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE SOLDADO	<i>Gymnapistes marmoratus</i> (marinho)	

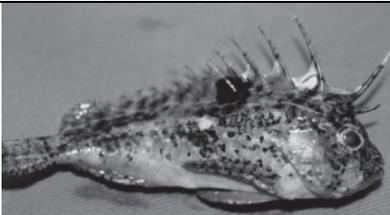
Fonte: MADDERN, 2006

O grupo do peixe vespa é composto por duas espécies, *Ablabys taenianotus* e *Hypodytes rubripinnis*, pertencentes a ordem *Scorpaeniformes* (KIRIAKE et al., 2013), são demonstradas no quadro 10. O *Hypodytes rubripinnis* é um pequeno peixe pertencente à família *Scorpaenidae*, mesma família do peixe escorpião (TANGE, 1954), conhecido por ser perigoso para o homem por causar acidentes com envenenamento. O acidente ocorre normalmente pelo contato realizado quando o

homem pisa sobre o animal e os espinhos contidos ao longo da coluna vertebral que perfura o membro da vítima com pressão suficiente sobre as glândulas de veneno, este flui ao longo do espinho para o tecido da vítima, resultando num quadro de envenenamento com lesão mecânica causada pelos diversos espinhos do animal (SHINOHARA *et al.*, 2010).

Ablabys taenianotus é uma espécie marinha que habita água rasas com bancos de areia e plantas aquáticas, no Leste do Oceano Índico e Pacífico Ocidental, norte do Japão e sul da Austrália (RANDALL *et al.*, 1990). É um peixe facilmente capturado em redes de pescadores ou pisoteado por banhistas distraídos, levando a ocorrência de acidentes humanos, pois possui uma série de espinhos interligados a glândulas de veneno (KIRIAKE *et al.*, 2013).

Quadro 10 – Nome popular do peixe, espécie e imagem dos exemplares de peixe vespa.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	IMAGEM
PEIXE VESPA	<i>Ablabys taenianotus</i> (marinho)	 Fonte: BRAY, 2011
	<i>Hypodytes rubripinnis</i> (marinho)	 Fonte: SHINOHARA <i>et al.</i> , 2010.

A figura 1 mostra o mapa com a distribuição dos peixes peçonhentos, em nível de gênero, dos peixes aqui trabalhos, onde podemos observar a concentração desses animais principalmente na América do Sul, Austrália e sudeste da Ásia. Possivelmente essa distribuição regular deve-se a Teoria da deriva continental, onde os continentes formavam uma única massa de terra conhecida como Pangéia. As derivas subsequentes dividiram a Pangéia em Laurássia e Gondwana. O continente da Gondwana, formada pelos continentes do sul do planeta, se dividiu em três partes: África e América do Sul; Antártida e a Austrália; e a Índia que se deslocou em colisão com a Ásia (PIELOU, 1991).

A deriva continental teve duas consequências importantes para os sistemas ecológicos: primeiro, as posições dos continentes e das grandes bacias oceânicas

influenciam profundamente os padrões climáticos; segundo, a deriva continental cria e quebra barreiras de dispersão de espécies, alternativamente conectando e desconectando biotas em evolução em diferentes regiões da Terra (RICKLEFS & SCHLUTER, 1993).

A história das conexões entre os continentes reforça as distribuições de animais e plantas, sugerindo que algumas espécies evoluíram no sul da América do Sul e Austrália, deslocando-se posteriormente para o sudeste da Ásia (RICKLEFS, 2009).

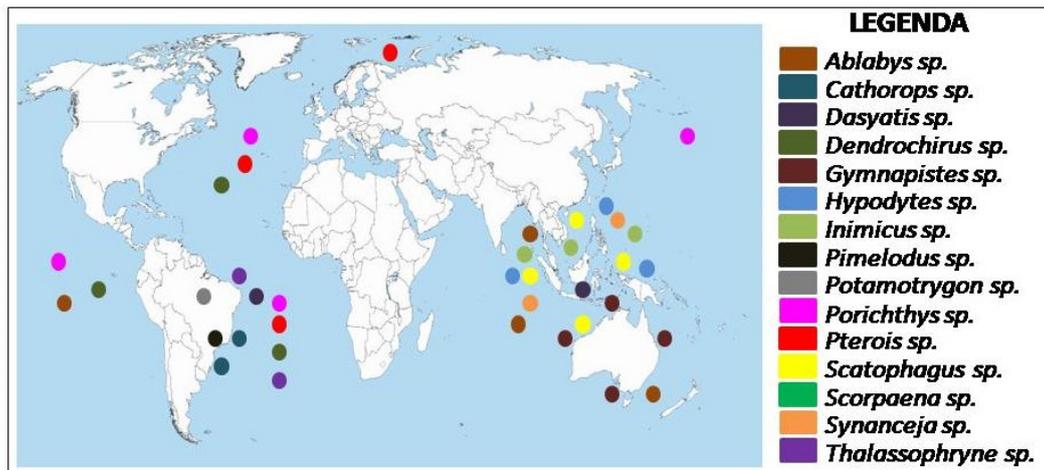


Figura 1: Mapa da distribuição dos peixes venenosos. Fonte: Site história digital – adaptado.

1.2 Aparelho inoculador

O aparelho inoculador de veneno nos peixes e a produção de toxinas, como em outros animais peçonhentos, são adaptações desenvolvidas ao longo da evolução como uma estratégia de sobrevivência (FRÓES, 1933).

As arraias (*Potamotrygon cf. scobina*, *Potamotrygon gr. orbignyi*, *Potamotrygon falkneri*, *Potamotrygon cf. henlei*, *Dasyatis guttata* entre outras espécies) possuem de um a três ferrões retroserrilhados na nadadeira caudal (Figura 2), responsáveis por causar acidentes em humanos (GARONE *et al.*, 2005; HADDAD JR. *et al.*, 2004). Os ferrões são estruturas afiadas, derivados de dentículos dérmicos modificados, retroserrilhados bilateralmente e recoberto por bainha tegumentar que contém glândulas de veneno em sulcos ventrolaterais (GARRONE NETO & HADDAD JR., 2009; DEGHANI *et al.*, 2009). As glândulas de veneno se rompem devido a lesão mecânica causada pela entrada do ferrão no tecido da vítima (GARRONE NETO & HADDAD, 2009). O quantitativo de glândulas de veneno e a distribuição podem variar

de acordo com a espécie (CAMPBELL *et al.*, 2003), assim como o tamanho do ferrão. Em estudo comparativo da histologia dos ferrões de arraias de água doce e marinhas, Pedroso *et al.* (2007), verificaram que os ferrões das espécies de água doce (*Potamotrygon leopoldi*, *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon orbigny*) possuem um quantitativo maior de glândulas de veneno distribuídos por toda a epiderme do ferrão em relação as espécies marinhas (*Dasyatis guttata* e *Aetobatus narinari*). Essa característica pode justificar a diferença de gravidade dos acidentes humanos causados por arraias marinhas e de água doce, pois ainda segundo Pedroso *et al.* (2007) os acidentes por arraias de água doce são geralmente mais graves e causam necrose mais intensa no local da lesão, quando comparados com os acidentes envolvendo arraias marinhas.

Além do ferrão, o epitélio das arraias possui muco que recobre todo o corpo do peixe e que contem bactérias, que agravam ainda mais o quadro de envenenamento (MAGALHÃES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011).



Figura 2: Ferrões de arraia de água doce (*Potamotrygon cf. henlei*). Fonte: SEIBERT, 2016.

O aparelho inoculador de veneno, nos bagres (*Pimelodus maculatus* e *Cathorops spixii*), consiste em barbatanas ósseas dorsais e peitorais (WRIGHT, 2009), rodeado por uma fina camada de pele cutânea denominada de bainha (HALSTEAD, 1951). As células glandulares responsáveis pela produção do veneno estão entre as camadas de epiderme e da derme, e concentradas nas margens anterior e posterior das barbatanas (HALSTEAD, 1951).

O peixe-manteiga (*Scatophagus argus*) possui glândula alongadas de veneno distribuídas pelas ranhuras na porção anterior de 11 espinhos dorsais, 2 espinhos pélvicos e 4 espinhos anais (CAMERON & ENDEAN, 1977). Já o peixe-sapo ou niquim (*Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa*) possuem um aparelho especial para a injeção de veneno, incluindo dois espinhos ocos na primeira barbatana

dorsal e dois espinhos localizados próximo ao opérculo (Figura 3), que estão ligados a glândula de veneno (HALSTEAD, 1971). O veneno é emitido quando a coluna vertebral perfura o tecido da vítima e a bainha tegumentária que envolvendo a coluna vertebral, liberando o veneno que é injetado na vítima (COLLETTE, 1995).

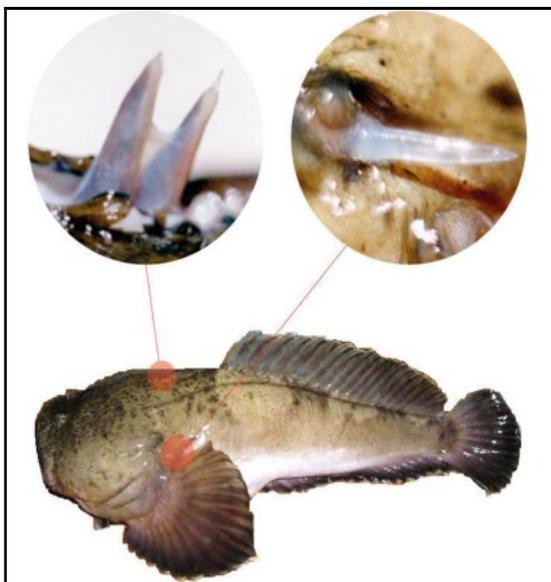


Figura 3. Ferrões de *Thalassophryne nattereri*.
Fonte: FERREIRA *et al.*, 2014

Enquanto os peixes sapo do gênero *Thalassophryne* são reconhecidos mundialmente por seu alto potencial toxicológico (COLLETTE & RUSSO, 1981), o peixe sapo *Porichthys porosissimus* está envolto numa discussão em relação à presença de glândulas de veneno (FERREIRA *et al.*, 2014). A menção inicial sobre o potencial do envenenamento do gênero *Porichthys* foi realizada por Halstead (1970), que estudou os espinhos operculares e dorsais de um exemplar de *Porichthys notatus*, espécie semelhante a *Porichthys porosissimus*. Halstead (1970), concluiu que o gênero em questão não é venenoso, pois não encontrou evidências de uma glândula de veneno anexada aos espinhos. Alguns autores alegam que além da ausência de glândula de veneno, o *Porichthys porosissimus* possui espinhos sólidos, impossibilitando o fluxo de veneno por seu interior, como ocorre nos exemplares do gênero *Thalassophryne*, que inclui o peixe com o aparelho inoculador de veneno mais especializado (COLLETTE, 1966; COLLETTE & RUSSO, 1981; FRÓES, 1933). Porém, há alguns estudos que indicam a presença de uma glândula peitoral axilar (COLLETTE & RUSSO, 1981) e a presença de tecido glandular na barbatana peitoral (WALKER & ROSENBLATT, 1988).

Em estudo recente Ferreira *et al.* (2014) sugeriram a presença de glândulas de veneno associadas aos espinhos, como o observado em *Thalassophryne nattereri*. As

observações clínicas e o estudo biológico são conclusivos quanto à presença do veneno no espinho opercular, em *Porichthys porosissimus* (Figura 4).



Figura 4: Espinho opercular de *Porichthys porosissimus*.
Fonte: FERREIRA *et al.*, 2014

Os peixes da ordem *Scorpaeniformes* constituem um grupo de peixes que estão entre os mais perigosos do mundo e são responsáveis por diversos casos de envenenamento grave entre os seres humanos (PHOON & ALFRED, 1965). Segundo KIRIAKE *et al.* (2013), dentro desta ordem ocorrem vários grupos como: peixe-leão (*Dendrochirus zebra*, *Pterois Antennata*, *Pterois lunulata* e *Pterois*), peixe-soldado (*Gymnapistes marmoratus*), peixe-escorpião (*Scorpaena guttata* e *Scorpaena plumieri*), peixe-diabo (*Inimicus japonicus*), peixe-pedra (*Synanceia horrida*, *Synanceia trachynis* e *Synanceia verrucosa*), peixe-vespa (*Ablabys taenianotus* e *Hypodytes rubripinnis*). Estes peixes possuem espinhos recobertos por epitélios glandulares contendo veneno, de 11 a 17 espinhos localizados nas barbatanas dorsais, 2 pélvicos e 3 anais.

As espécies de peixes pedra (*Synanceia horrida*, *Synanceia trachynis* e *Synanceia verrucosa*) são os únicos exemplares dessa ordem que possuem uma grande glândula de veneno mais evidente (POH *et al.*, 1991).

1.3 Quadro clínico

O quadro clínico dos acidentes envolvendo os peixes peçonhentos apresentam ferimento puntiforme ou lacerante, acompanhado por dor imediata e intensa que dura horas ou dias. Eritema e edema local podem estar presentes, em algumas situações acometendo todo o membro atingido. Eventualmente ocasiona necrose dos tecidos no local do ferimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). As lesões, quando não tratadas, apresentam infecção bacteriana, levando semanas para curar e deixando sequelas

mais significativas. Ocorrem manifestações gerais como: fraqueza, sudorese, náuseas, vômitos, vertigens, hipotensão, choque e até óbito. Contudo os sintomas apresentados no quadro clínico do acidente podem variar dependendo do tamanho do peixe e a quantidade de veneno injetado.

Os acidentados por arraias apresentam geralmente os sintomas de nocicepção, edema, necrose, náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular, convulsões e isquêmica (LALWAN, 1996; FORRESTER, 2005).

Quando o ferrão do bagre (*Pimelodus maculatus* e *Cathorops spixii*) penetra na vítima, o tecido glandular é rasgado e libera toxinas que podem causar dor intensa e inflamação (HADDAD JR., 2000; HADDAD JR., 2003), edema e eritema que duram até oito horas (HADDAD JR. & LASTÓRIA, 2005), há ainda, infecção secundária induzida por bactérias como estafilococos, estreptococos e infecções mais graves causadas por *Vibrio vulnificus* e *Aeromonas hydrophila* (HADDAD JR., 2000; CARDOSO *et al.*, 2003).

Dor ardente, eritema e edema local são sintomas apresentados imediatamente após envenenamento pelo peixe sapo ou niquim (*Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa*), seguido por uma necrose intensa, tontura e febre (CERVIGON, 1980). A figura 5 demonstra algumas lesões causadas por *Thalassophryne nattereri*, onde pode ser observado algumas manifestações clínicas como edema, necrose e eritema (FERREIRA *et al.*, 2014).



Figura 5. Manifestações clínicas do envenenamento por *Thalassophryne nattereri*. Fonte: FERREIRA *et al.*, 2014.

O acidente causado pelo manuseio do peixe manteiga (*Scatophagus argus*) provoca feridas dolorosas com quadro clínico caracterizado por dor local angustiante e

persistente, desproporcional ao tamanho da lesão, vermelhidão, inchaço e uma sensação latejante que se estende para os membros, seguido de tontura (SIVAN *et al.*, 2007).

Imediatamente após o envenenamento pelo peixe pedra (*Synanceja horrida*, *Synanceia verrucosa* e *Synanceia trachynis*), as vítimas apresentam sintomas locais como dor extrema, vermelhidão e inchaço, podendo ocorrer em casos graves registros de óbitos (PHOON & ALFRED, 1965).



Figura 6. Necrose e debridamento de lesão causada por peixe pedra. Fonte: DALL *et al.*, 2006.

Os sintomas de envenenamento causado pelo peixe soldado (*Gymnapistes marmoratus*) são semelhantes aos do envenenamento por peixe pedra (embora mais leve) e incluem a dor severa, inchaço local, sudorese, náusea e perda de percepção (SUTHERLAND, 1983).

O acidente humano causado por *Porichthys porosissimus* causa dor, edema e vaso constrição (FERREIRA *et al.*, 2014). A figura 7, retrata um caso observado por Ferreira *et al.* (2014) de uma vítima *Porichthys porosissimus* que manipulou um exemplar quando o espinho opercular penetrou na ponta do dedo anular esquerdo causando uma lesão profunda, hemorragia discreta e dor intensa.



Figura 7. Lesão no terceiro dedo causado por *Porichthys porosissimus* através do espinho opercular. Fonte: FERREIRA *et al.*, 2014.

Infelizmente os relatos do quadro clínico do acidente por peixes venenosos são pouco relatados de forma científica, havendo assim poucos registros na literatura. Fato que dificulta o avanço dos estudos de toxicologia, pois o estudo experimental das manifestações clínicas e biológicas do veneno partem de observações e registros de acidentes humanos.

1.4 Tratamentos

Segundo Haddad Jr. *et al.*, (2004) não há um tratamento padrão para os pacientes acidentados por peixes como há para outros animais peçonhentos. Não há também um antiveneno específico para o tratamento das lesões e geralmente a abordagem terapêutica é baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios, água-morna para aliviar a dor intensa e o uso de antibióticos para prevenir infecções secundárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; HADDAD JR. *et al.*, 2004).

Os acidentados por peixe manteiga (*Scatophagus argus*) geralmente são tratados com um processo empírico, tal como a imersão da lesão em água quente e punção (BARRY & FAST, 1988). Nos acidentes por peixe sapo ou niquim (*Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa*), acreditava-se que a administração de anestésicos locais atenuava os sintomas do envenenamento (SUTHERLAND, 1992), enquanto o uso de drogas anti-inflamatórias convencionais, como dexametasona e indometacina, foram mal sucedidos na prevenção da progressão dos sintomas, com recuperação lenta dos acidentados (FONSECA & FERREIRA, 2000). Ferreira *et al.*, (2004), verificou a inibição significativa da nocicepção e edema produzidos na pata de camundongos experimentalmente, através do tratamento com analgésico a base de fentanil, e a inibição da ação inflamatória através do tratamento com inibidor de calicreína tecidual.

Os acidentes causados pelo bagre ou mandi (*Pimelodus maculatus* e *Cathorops spixii*) geralmente são tratados popularmente com gasolina e querosene, agravando os sintomas (HADDAD JR., 2000; GARRONE NETO *et al.*, 2005). Clinicamente, a imersão do membro afetado em água quente é recomendada (HADDAD JR., 2000; HADDAD JR. *et al.*, 2004) levando ao alívio da dor, que pode ser causada devido ao efeito vasoconstritor do veneno (HADDAD JR., 2000; HADDAD JR., 2003; HADDAD JR. & LASTÓRIA, 2005; HADDAD JR., 2008).

Popularmente empregam-se diversas abordagens como primeiros socorros aos acidentados por arraias, como antiácido, ovo quente, vulvoterapia, urina, ervas, óleos fitoterápicos, sebo-de-holanda, borra de café, diesel e querosene (SANTOS *et al.*,

2012; SÁ OLIVEIRA *et al.*, 2011), no intuito de reduzir a dor e o processo inflamatório. Ainda, segundo Santos *et al.* (2012) os conhecimentos populares e científicos em relação ao envenenamento por arraias podem ser complementares, apesar de seres adquiridos por caminhos totalmente diferentes. Já a abordagem terapêutica é realizada com uso de analgésicos, antiinflamatórios, água-morna, exploração cirúrgica do ferimento para retirada de fragmentos do ferrão, antibióticos e imunização antitetânica (HADDAD JR. *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2007; GARROONE NETO & HADDAD JR., 2010; FENNER *et al.* 1989; WEISS & WOFEDEN, 2011; SCHARF, 2002; PARDAL, 2009).

Experimentalmente em ratos, a injeção do veneno de *Scatophagus argus* produz lesões e nocicepção que não foram inibidos por maleato de feniramina (anti-histamínico), sugerindo que a histamina não foi envolvida no processo inflamatório.

A partir do veneno de *Synanceja trachynis* foi elaborado um antiveneno comercial (SHIOMI *et al.*, 1989), capaz de neutralizar não só a atividade biológica do veneno de peixes pedra, mas também capaz de neutraliza igualmente as atividades das toxinas de sete peixes venenosos da ordem *Scorpaeniformes*, incluindo quatro espécies de peixe-leão (*Dendrochirus zebra*, *Pterois lunulata*, *Pterois volitans* e *Pterois antennata*) (SHIOMI *et al.*, 1989), peixe-soldado (*Gymnapistes marmoratus*) (CHURCH & HODGSON, 2001), de peixe-aranha (*Scorpaena plumieri*) (GOMES *et al.*, 2011) e peixe-diabo (*Inimicus japonicus*) (SHIOMI *et al.*, 1989). Tal feito ocorreu a partir de técnicas de clonagem de DNA utilizando inibidores concedidos de sequências de aminoácidos da toxina do peixe pedra, empregados para elucidar as estruturas primárias de vários peixes da ordem *Scorpaeniformes* tais como três espécies de peixe-leão: *Pterois antennata* e *Pterois volitans* (KIRIAKE & SHIOMI, 2011), *Pterois lunulata* (KIRIAKE *et al.*, 2013); uma espécie de peixe diabo *Inimicus japonicus* e uma espécie de peixe vespa *Hypodytes rubripinnis* (KIRIAKE *et al.*, 2013), onde suas toxinas reagem geneticamente de forma cruzada com as toxinas do grupo dos peixes-pedra (KIRIAKE & SHIOMI, 2011).

1.5 Propriedades químicas e biológicas

Estudos sobre as propriedades químicas e biológicas de veneno de peixe tem se centrado principalmente em peixe-pedra (SAUNDERS, 1959; AUSTIN *et al.*, 1961; SAUNDERS *et al.*, 1962; LOW *et al.*, 1990; KREGGER *et al.*, 1993; HOPKINS & HODGSON, 1998), peixe-leão (SAUNDERS E TAYLOR, 1959; NAIR *et al.*, 1985; COHEN & OLEK, 1989), peixe-escorpião (CARLSON *et al.*, 1971; SCHAEFFER *et al.*,

1971), peixe-sapo (FERREIRA *et al.*, 1998), peixe-manteiga (CAMERON & ENDEAN, 1977; BARRY & FAST, 1988; CHEN *et al.*, 1997; SIVAN *et al.*, 2007) e arraias (LIMA *et al.*, 2003; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009; 2012. CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.* 2011).

O estudo das propriedades químicas e biológicas dos venenos é, geralmente, estimulado por observações clínicas que levam os pesquisadores a reproduzi-los experimentalmente em modelos vivos como em camundongos e coelhos. As atividades biológicas comumente reproduzidas são nocicepção (dor), edema (inchaço) e eritema (vermelhidão por vasodilatação de capilares sanguíneos) entre outras.

Atividades edematogênica e nociceptivas estão relacionados com alterações na permeabilidade vascular, sendo este último um indicador do processo inflamatório (BRAIN *et al.*, 1985). A resposta edematogênica depende de um sinergismo entre mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e aqueles que aumentam o fluxo de sangue (BRAIN & WILLIAMS, 1985). O extravasamento de plasma e a formação de edema em resposta ao veneno e muco sugerem fortemente o envolvimento de mediadores vasoativos derivados de grânulos de mastócitos, serotonina e histamina que são mediadores encontrados em grandes quantidades em células mastro (NAGATA *et al.*, 2001).

A resposta edematogênica e nociceptiva causada pelo veneno de *Scatophagus argus* foi testada na pata de camundongos e induziu uma lesão inflamatória local similar a descrita nos acidentes com humanos (SIVAN, 2007). O espectro da atividade do veneno bruto de *Scatophagus argus* é semelhante ao de outros venenos de peixes já estudados, como peixe pedra e peixe escorpião, e correlacionam-se as manifestações sistêmicas descritas no envenenamento por *Scatophagus argus* (SIVAN, 2007). Tal espécie, segundo MARSHALL (1964) é conhecida por causar ferimentos mais dolorosos que outros exemplares da mesma família Scatophagidae.

Experimentalmente foi verificado que o veneno bruto do bagre *Pimelodus maculatus* é capaz de causar edema persistente por até 120 minutos, sem lesão mecânica no tecido, e que a nocicepção, durante a fase inflamatória, pode durar cerca de seis horas (SARMIENTE *et al.*, 2015). O veneno bruto de *Pimelodus maculatus* é caracterizado por edema e dor, podendo desenvolver-se um processo inflamatório (SARMIENTE *et al.*, 2015).

O veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbigny* induzem a atividades semelhantes, experimentalmente verificadas, como nocicepção, edema e recrutamento de leucócitos (SANTOS *et al.*, 2011). O veneno da *Potamotrygon gr. orbigny* pode induzir edema, nocicepção e

necrose em ratos (PARDAL, 1993). Comparando o veneno das arraias *Dasyatis guttata* (marinha) e *Potamorygon falkneri* (docicula) foi observado atividades edematogênica, em ambos os extratos (BARBARO *et al.*, 2007).

Foi verificado experimentalmente em camundongos que o veneno de *Thalassophryne maculosa* causa intensa atividade nociceptiva e edematogênica, seguida por necrose (FONSECA & FERREIRA, 2000; FERREIRA *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008). A associação entre a nocicepção e edema induzido pelo veneno de *Thalassophryne nattereri* com os produtos caliceína foi confirmada por Ferreira *et al.*, (2004). O veneno de *Thalassophryne maculosa* é desprovido de atividade de PLA₂, que é geralmente correlacionada com efeitos locais provocados por venenos animais. Isto sugere que o edema e a necrose podem seguir diferentes mecanismos. A reação inflamatória local foi provocada pelo veneno de *Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa* em camundongos observando-se uma resposta inflamatória similar a observada em humanos (FERREIRA *et al.*, 2001). Lima *et al.* (2003) caracterizou a resposta inflamatória local da injeção de veneno de *Thalassophryne nattereri* em camundongos, o veneno provocou a liberação de IL-1b, IL-6 e TNF-a no tecido da pata e um retardado influxo de leucócitos. Estes dados foram associados com a restauração do tecido lesado retardando o processo necrótico (ROSALES *et al.*, 2005).

Experimentalmente Ferreira *et al.*, (2014), verificou que o veneno de *Porichthys porosissimus* pode induzir respostas nociceptivas e edematogênica em camundongos, bem como, a indução de uma resposta inflamatória verificada por microscopia intravital e a constrição arteriolar, dados que complementaram as observações clínicas realizados em estudos acompanhados por este grupo. Além disto, neste mesmo trabalho, foi identificada no extrato do veneno de *P. porosissimus*, por meio de análise por espectrometria de massa, a presença de proteínas previamente detectadas nos venenos de outras espécies de peixes e outros animais peçonhentos. Todos esses dados, experimentais e clínicos, levaram a concluir que a espécie *Porichthys porosissimus* é de importância toxicológica.

O veneno do peixe manteiga *Scatophagus argus* possui atividade hemolítica em eritrócitos humanos e atividade proteolítica leve (CHEN *et al.*, 1997), embora quase todos os venenos de peixe apresentem atividade hemolítica (KREGGER, 1991; KHOO *et al.*, 1992; CHHATWAL & DREYER, 1992; GARNIER *et al.*, 1995).

A atividade proteolítica sobre a caseína foi testada em diversos venenos devido o provável envolvimento de proteases na instabilidade das atividades biológicas comuns em veneno de peixe. Tal atividade proteolítica detectada em *Scatophagus*

argus (3.7470.3 U/mg) é comparada a apresentada por *Thalassophryne maculosa* (2,0-4,4 U/mg) como também por arraias das espécies *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbignyi* (ROSALES *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2006). Atividade proteolítica leve também foi observada no veneno de *Notesthes robusta* (HAHN & O'CONNOR, 2000).

Comparando o veneno das arraias *Dasyatis guttata* (marinha) e *Potamorygon falkneri* (docicula) foi observado atividades gelatinolítica, caseinolítica e fibrinogenolítica em ambos os extratos (BARBARO *et al.*, 2007).

Assim como o veneno de outros peixes, o efeito do veneno de *Thalassophryne maculosa* é inibido quando aquecido (HALSTEAD, 1971), além disso, é desprovido de fosfolipase A₂ e atividade hemorrágica, mas apresenta atividades proteolítica e miotóxicas (FERREIRA *et al.*, 2001) e produz alterações na hemodinâmica microvasculares (ROSALES *et al.*, 2005). Tal como já observado para outros venenos de peixe (GARNIER *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 1998).

Estudos tem mostrado que o veneno bruto de *Scatophagus argus* induz a lise das plaquetas, atividade comumente observada no veneno bruto de outros peixes com no peixe-pedra (*Synanceja horrida*), e peixe-sapo (*Thalassophryne nattereri*) (KHOO *et al.*, 1992;. LOPES *et al.*, 2002). Porém, o veneno de *Scatophagus argus* não provoca alterações na coagulação, em diferentes doses de veneno, e a hemorragia a partir do ferimento provocado pela lesão mecânica do ferrão é o que se deve esperar de uma lesão não-venenosa similar (SIVAN, 2007).

Experimentalmente em ratos, a injeção do veneno de *Scatophagus argus* levou ao aumento na atividade da creatina quinase, no soro indicou miotoxicidade e citotoxicidade (CHURCH *et al.*, 2003). Experimentos em ratos, por via intraperitoneal, mostraram que o veneno de *Scatophagus argus* induziu uma matriz de toxicidade, levando a alterações comportamentais semelhantes as já relatadas em estudos com outros peixes (KHOO *et al.*, 1992, GARNIER *et al.*, 1995; CARRIJO *et al.*, 2005).

Sintomas como paralisia e convulsões sugerem efeitos neurotóxicos de *Scatophagus argus*, a neurotoxicidade para o veneno bruto de *Synanceia verrucosa* e *Scorpaena plumeri* também foram relatados (BRETON *et al.*, 1999; CARRIJO *et al.*, 2005).

O veneno bruto de *Pimelodus maculatus* induz o aumento significativo na permeabilidade vascular na cavidade peritoneal de ratos, com pico do efeito no período de duas horas após a injeção do veneno (SARMIENTE *et al.*, 2015). O veneno do peixe sapo (*Thalassophryne nattereri*) aumenta a permeabilidade vascular e neutrofilia após 24 horas de injeção, e induz o influxo de leucócitos a partir do sistema

vascular para a cavidade peritoneal, que é considerada como uma manifestação pró-inflamatória (LIMA *et al.*, 2003). Tanto o veneno bruto quanto o muco epitelial do bagre *Cathorops spixii* provocam o aumento da permeabilidade vascular em diferentes doses (JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

O veneno de *Gymnapistes marmoratus* caracteriza-se por uma potente atividade cardiovascular, mediada principalmente por uma ação nos receptores muscarínicos e adrenérgicos (HOPKINS & HODGSON, 1998). Esta atividade é semelhante à do veneno do peixe-pedra (*Synanceia trachynis*) que também demonstrou atividade nos receptores adrenérgicos e muscarínicos (CHURCH & HODGSON, 2000).

Os venenos de *Synanceja trachynis* e *Gymnapistes marmoratus*, demonstram sintomas de envenenamento e atividades farmacológicas semelhantes, apesar de apresentarem gravidade diferentes, devido a este fato Bennett *et al.* (1997) investigou a eficácia do soro criado contra o veneno do peixe-pedra (*Synanceia* spp.) em neutralizar os efeitos cardiovasculares do veneno de *Gymnapistes marmoratus*.

Foram isolados dois peptídeos bioativos a partir do veneno da arraia de água doce *Potamotrygon. gr orbigny* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009). Estes peptídeos, chamados orpotrin e porflan, são eficazes no ambiente da microcirculação, induzindo forte vasoconstrição e inflamação (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

No caso do peixe-pedra, devido a facilidade de existir uma glândula específica de veneno foi possível purificar toxinas de três espécies, entre elas: stonustoxin (SNTX) de *Synanceja horrida* (POH *et al.*, 1991; GHADDESSY *et al.*, 1996); trachynilysin de *Synanceja trachynis* (KREGGER, 1991) e verrucotoxin ou neoverrucotoxin (neoVTX) de *Synanceja verrucosa* (SHIOMI *et al.*, 1993; GARNIER *et al.*, 1997; UEDA *et al.*, 2006), afim de esclarecer suas propriedades. As toxinas purificadas geralmente exibem atividades letais (GHADDESSY *et al.*, 1996), atividade hemolítica (KREGGER, 1991; KHOO *et al.*, 1992; SHIOMI *et al.*, 1993), além de outras várias atividades biológicas, tais como aumento da permeabilidade capilar, indução do edema, relaxamento de vasos epiteliais (KHOO *et al.*, 1992; LOW *et al.*, 1993) e atividade nociceptiva, todas detectadas no veneno bruto.

A toxina Stonustoxin (SNTX) isolada a partir do veneno de *Synanceja horrida* possui várias atividades biológicas que estão relacionadas com uma série de sintomas de envenenamento tais como edema, permeabilidade vascular, agregação de plaquetas e letalidade (POH *et al.*, 1991; KHOO *et al.*, 1992). Induz o relaxamento dos vasos do endotélio levando a uma ação hipotensiva e a sua letalidade, tal característica foi observada na toxina de outras espécies de peixe pedra,

apresentando fatores letais que mostram atividades semelhantes às de *Synanceja horrida* (KREGGER, 1991; SHIOMI *et al.*, 1993; GARNIER *et al.*, 1995).

Geralmente os acidentes causados por peixes venenosos não são letais, pois a quantidade de veneno inoculado não é suficiente para causar a morte do acidentado, porém, pacientes com perfurações abdominais ou torácicas devem receber atendimento médico imediato, pois devido possibilidade da lesão atingir algum órgão vital, há risco de morte (PARDAL, 2009).

Estudos sobre o veneno de peixe-pedra e peixe-leão apresentaram uma capacidade letal elevada (GWEE *et al.*, 1994; BALASUBASHINI *et al.*, 2006). Além do peixe-pedra, os peixes sapo *Thalassophryne nattereri* e *Thalassophryne maculosa* demonstraram produzir venenos que são letais para os camundongos, com uma letalidade de 4,93 mg/kg para *Thalassophryne maculosa* e 4,54 mg/kg de *Thalassophryne nattereri* (LOPES *et al.*, 1998; ROSALES *et al.*, 2005).

O quadro 11 traz a síntese do capítulo, enfocando o nome popular e científico das espécies de peixes peçonhentos, com as características do aparelho inoculador, quadro clínico e atividades biológicas desencadeadas pelo veneno. E no quadro 12, as moléculas que já foram isoladas e suas atividades biológicas.

Quadro 11. Quadro resumo com nome popular e científico dos peixes peçonhentos, características do aparelho inoculador das toxinas, quadro clínico e atividades biológicas desencadeadas pelo veneno.

NOME POPULAR	ESPÉCIES	APARELHO INOCULADOR	QUADRO CLÍNICO	ATIVIDADES BIOLÓGICAS
Arraias	<i>Potamotrygon cf. scobina</i> <i>Potamotrygon gr. orbignyi</i> <i>Potamotrygon falkneri</i> <i>Potamotrygon cf. henlei</i> <i>Dasyatis guttata</i>	1 a 3 ferrões retroserilhados na nadadeira caudal recoberto uma bainha contendo micro glândulas de veneno	dor, edema, necrose, náuseas, vômitos, salivação, sudorese, depressão respiratória, fasciculação muscular, convulsões e isquemia	nocicepção, edema, necrose, inflamação, caseinolítica, gelatinolítica, hialuronidase, fibrinogenica, aumento da permeabilidade vascular,
Bagres Mandi	<i>Pimelodus maculatus</i> <i>Cathorops spixii</i>	barbatanas ósseas dorsais e peitorais rodeado por glândulas de veneno concentradas nas margens anterior e posterior das barbatanas	dor, inflamação, eritema, infecção bacterianas secundárias	Vaso constrição, nocicepção, edema, alteração de aumento da permeabilidade vascular, inflamação,
Peixe-aranha	<i>Scorpaena guttata</i> <i>Scorpaena plumieri</i>	espinhos recobertos por bainha glandular de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal	dor, edema e eritema, óbito	Neurotoxicidade, inflamação,
Peixe-leão	<i>Dendrochirus zebra</i> <i>Pterois Antennata</i> <i>Pterois lunulata</i>	espinhos recobertos por bainha glandular de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal	dor, edema e eritema, óbito	hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, nocicepção,
Peixe-manteiga	<i>Scatophagus argus</i>	11 espinhos dorsais, 2 espinhos pélvicos e 4 espinhos anais ligados a glândula alongadas de veneno, distribuídas pelas ranhuras na porção anterior dos espinhos	dor, edema, rubor, tontura, paralisia, convulsão	hemolítica, proteolítica, lise de plaquetas, inflamação, miotoxicidade, citotoxicidade, neurotoxicidade, caseinolítica
Peixe-pedra	<i>Synanceja horrida</i> <i>Synanceia verrucosa</i> <i>Synanceia trachynis</i>	espinhos recobertos por bainhas glandulares de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal, interligados a uma grande glândula de veneno	dor, edema e eritema, óbito	lise das plaquetas neurotoxicidade, inflamação, Letalidade, hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, relaxamento de vasos epiteliais, nocicepção, agregação de plaquetas
Peixe-sapo Niquin	<i>Thalassophryne nattereri</i> <i>Thalassophryne maculosa</i>	2 ferrão ocos na barbatana dorsal e 2 próximos ao opérculo, interligado com glândula de veneno	dor, edema, eritema, necrose, tontura e febre	Nocicepção, edema, necrose, lise das plaquetas, inflamação, caseinolítica aumento da permeabilidade vascular, proteolítica, miotóxica, alterações na hemodinâmica microvasculares,
Peixe-diabo	<i>Inimicus japonicus</i>	espinhos recobertos por bainha glandular de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal	dor, edema e eritema, óbito	hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, nocicepção,
Peixe-soldado	<i>Gymnapistes marmoratus</i>	espinhos recobertos por bainha glandular de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal	dor, edema e eritema, óbito	hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, nocicepção,
Peixe-vespa	<i>Ablabys taenianotus</i> <i>Hypodytes rubripinnis</i>	espinhos recobertos por bainha glandular de veneno, localizados nas barbatanas dorsal, pélvica e anal	dor, edema e eritema, óbito	hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, nocicepção,

Quadro 12. Quadro resumo das moléculas isoladas do veneno bruto de algumas espécies de peixes peçonhentos.

NOME POPULAR	ESPÉCIE	TOXINAS ISOLADAS	ATIVIDADE
Arraias	<i>Potamotrygon gr. orbignyi</i>	opotrin	Vasoconstrição
		porflan	Inflamação
Peixe-pedra	<i>Synanceia horrida</i>	stonustoxin (SNTX)	Letalidade, hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, relaxamento de vasos epiteliais, nocicepção, agregação de plaquetas
	<i>Synanceia. trachynis</i>	trachynilysin	Letalidade, hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, relaxamento de vasos epiteliais, nocicepção,
	<i>Synanceia verrucosa</i>	neoverrucotoxin (neoVTX)	Letalidade, hemolítica, aumenta da permeabilidade capilar, edema, relaxamento de vasos epiteliais, nocicepção,

1.6 O impacto social nos acidentes

A ocorrência dos acidentes com peixes venenosos foi relatada inúmeras vezes nos artigos trabalhados, estes trazem os pescadores como principal vítima dos acidentes, que por vezes, se acidentam ao manipular o animal para retirá-lo das redes de pesca ou anzóis (GARRONE NETO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010; ROSA & MATTOS, 2010). As injúrias por animais de ambiente aquático são a principal causa dos acidentes e afastamentos das atividades laborais relatadas, pelos pescadores, em diversas comunidades pesqueiras pelo mundo. Na região do Médio Araguaia, Tocantins – Brasil, segundo Garone Neto *et al.* (2005), cerca de 86% dos casos de acidentes de trabalho entre os pescadores ocorrem pelo contato com o animal. E os principais causadores de acidentes são o mandi (*Pimelodus sp.*) e a arraia de fogo (*Potamotrygon sp.*). A maioria dos acidentados não procura atendimento médico e faz uso de tratamento popular, o que pode agravar o quadro clínico do acidentado. E apesar da possibilidade de assistência por parte do ministério da previdência aos pescadores acidentados, os relatos de solicitação de auxílios são inexistentes na maioria das comunidades pesqueiras.

A condição de segurados especiais assegura aos pescadores profissionais o acesso ao seguro contra acidente de trabalho (SAT) oferecido pelo Plano de Benefícios da Previdência Social (MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA E ASSISTÊNCIA SOCIAL, 2003). Fato este, ainda desconhecido por muitos pescadores e que pode minimiza as dificuldades

enfrentadas na atividade pesqueira, que é reconhecidamente uma das profissões mais perigosas existentes, expondo seus trabalhadores a uma série de situações de risco diariamente.

A pesca representa para muitas comunidades pesqueiras a única alternativa de sobrevivência, sua importância econômica e social vai muito além das pessoas envolvidas diretamente. Essa economia gera e movimenta outras atividades nessas regiões e as dificuldades desses trabalhadores e os riscos a que se submetem na realização de suas atividades diárias estão diretamente relacionadas, uma vez que, um pescador acidentado pode ficar afastado de suas atividades por longos períodos. É também possível afirmar que os riscos a que se submetem são potencializados pelas condições de vida, trabalho e a falta de proteção social. São situações graves, nas quais os riscos de acidentes com peixes venenosos e de outras naturezas inerente da própria atividade laboral são potencializados pela grande jornada de trabalho, pelo pouco uso de equipamento de proteção individual e pela falta de informação da gravidade desses acidentes.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pouca importância dada aos acidentes envolvendo peixes venenosos levou a defasagem no estudo do veneno desses animais em relação aos venenos de animais terrestres. Apesar da composição do veneno de diversas espécies de peixe ter sido amplamente estudada, com a purificação e caracterização de inúmeros componentes envolvidos no envenenamento, alguns até com potencial farmacológico. Vale lembrar o exemplo clássico do anti-hipertensivo captopril, que foi desenvolvido a partir do isolamento de um fator potenciador de bradicinina (BPF) presente no veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965).

Assim como os venenos de serpentes, os venenos de peixes também são uma rica fonte de novos compostos, o que constitui um vasto campo para a pesquisa e isolamento de substâncias com potencial farmacológico ou outras aplicações em diversas áreas da medicina.

Nos últimos anos, alguns grupos têm se empenhado em estudar a atividade desses venenos, principalmente de peixe pedra, peixe leão, peixe escorpião, peixe sapo, peixe manteiga e arraias. Mais apesar disso, poucos compostos foram isolados e caracterizados, e os estudos nessa área tem se voltado principalmente para as manifestações biológicas e químicas presentes nos extratos do veneno bruto.

Nos componentes tóxicos presentes nos venenos de peixes como *Potamotrygon gr. orbigny*, *Synanceia horrida*, *Synanceia trachynis*, *Synanceia verrucosa*, algumas enzimas foram isoladas e caracterizadas, permitindo sua correlação com as manifestações clínicas observadas em pacientes. Com o isolamento da toxina a partir do veneno de *Synanceja trachynis* foi elaborado um antiveneno comercial capaz de neutralizar o veneno de seis outras espécies de peixes venenosos da mesma família. Tal descoberta desempenha um papel importante e estimulador na busca de um tratamento eficiente para as vítimas de acidentes com peixes venenosos.

Alguns efeitos sobre células do sistema imune também já foram descritos para compostos isolados do veneno de peixes, além de efeito sistêmico induzindo em camundongos. Tais efeitos sobre o sistema imunológico também despertam grande interesse, pois substâncias imunomoduladoras podem ser utilizadas tanto para suprimir quanto para estimular o sistema imune, em diferentes situações clínicas. Assim, a descoberta de novos compostos com essas propriedades também abre perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras ou imunoestimulantes, o que constitui um campo ainda pouco explorado para os venenos de peixes.

Percebe-se, diante dos artigos analisados, que os acidentes por animais do ambiente aquático são um importante agravo à saúde, principalmente ao trabalhador da pesca, provocando, em alguns casos, incapacidade temporária para o trabalho. Portanto, é evidente a enorme importância de estudar os venenos dos peixes marinhos e dulcícolas pouco explorados, não apenas para o melhor entendimento dos acidentes envolvendo essas espécies, mas também pelo potencial de descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas ou imunomoduladoras. Além da elaboração e oferta de programas educativos e assistenciais destinados a saúde ocupacional dos pescadores profissionais que por vezes são negligenciados e constitui um enorme problema de saúde pública e previdenciário no Brasil de forma que se instrua esses trabalhadores em questões relativas aos direitos previdenciários e cuidados necessários em casos de acidentes com os peixes peçonhentos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V.G.; ROCHA, C.M. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, n. 2, p. 49–51, 1989.
- AUTO, H.F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Revista da Escola de Ciências Médica de Alagoas**, n. 5, p. 35–36, 1992.
- CAIRNCROSS, K.D.; MCCALLUM, I.A.N. Some pharmacological actions of the venom of the *Synanceja horrida*. **Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, n. 131, p. 339–347, 1961.
- BALASUBASHINI, M.; KARTHIGAYAN, S.; SOMASUNDARAM, S. T.; BALASUBRAMANIAN, T.; VISWANATHAN, P.; MENON, V.P. In vivo and in vitro characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish [*Pterios volitans*] venom in mice. **Toxicology Mechanisms and Methods**, n. 16, p. 525–531, 2006.
- BARBARO, K.C.; LIRA M.S.; MALTA M.B.; SOARES S.L.; GARRONE NETO D.; CARDOSO J.L.; SANTORO M.L.; HADDAD JR., V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, n. 50, p. 676–687, 2007.
- BARRY, T. P.; FAST, A.W. **Natural history of the spotted scat (*Scatophagus argus*)**. In: **Fast, A.W. (Ed.), Spawning Induction and Pond Culture of the Spotted Scat (*Scatophagus argus* Linn.) in Philippines**. Mariculture Research and Training Centre, Hawaii Institute of Marine Biology, University of Hawaii, Manoa, p. 4–30. 1988.
- HOPKINS, J. B.; HODGSON, W. C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 973–983, 1998.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, THALASSOPHRYNEJ. Inflammatory mechanisms of inflamed-tissue factor. **Agents Actions**, n. 3, p. 348–356, 1985.
- BRAY, D. J. ***Ablabys taenianotus***. Fishes of Australia. 2011. Disponível em: <<http://www.fishesofaustralia.net.au/Thalassophryneau/home/species/3205>>. Acessado em: 20/05/2016.
- BRETON, P.; DELAMANICHE, I.; BOUEE, J.; PERRIERE, F. G.; PERRIERE, C. Verrucotoxin and neurotoxic effects of stonefish (*Synanceia verrucosa*) venom. **Toxicon**, n. 37, p. 1213, 1999.
- CAMARGO, M. ***Cathorops spixii***. Fishbase.1998. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/960>>. Acessado em: 19/05/2016.
- CAMERON, A.M.; ENDEAN, R. Venom glands in Scatophagid fish. **Toxicon**, n. 8, p.171–178, 1977.
- CAMPBELL, J.; GRENON, M.; YOU, C. K. Pseudoaneurysm of the superficial femoral artery resulting from stingray envenomation. **Annals of Vascular Surgery**, v. 17, n. 2, p. 217–220, 2003.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.D.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.; HADDAD JR., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 45, p. 338, 2003.

CARLSON, R.W.; SCHAEFFER JR., R.C.; LA GRANGE, R.G.; ROBERTS, C.M.; RUSSELL, F.E. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**, n. 9, p. 379–391, 1971.

CARRIJO, L.C.; ANDRICH, F.; LIMA, M. E.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**, v. 45, n. 7 843–850. 2005.

CERVIGON, F. **Ictiologia Marinha**. vol. 1. Caracas, Venezuela. 1980.

CHEN, H; XIE, Y. Q.; LIN, G. W.; LIN, X. J.; CHEN, W.; WANG, X. C. Feeding rhythm and tolerance of starvation during early development stage of devil stinger, *Inimicus japonicus*. **Journal of Fishery Sciences of China**, n. 16, p. 340–347, 2009.

CHEN, D.; KINI, R.M.; YUEN, R.; KHOO, H.E. Haemolytic activity of stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. **Biochemical Journal**, n. 325, p. 685–691, 1997.

CHHATWAL, I.; DREYER, F. Biological properties of a crude venom extract from the greater weever fish *Trachinus draco*. **Toxicon**, n. 30, p. 77–85, 1992.

CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. **Toxicon**, n. 38, p. 391–407, 2000.

CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Stonefish (*Synanceja* spp.) antivenom neutralises the in vitro and in vivo cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. **Toxicon**, n. 39, p. 319–324, 2001.

CHURCH, J.E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, n. 40, p. 1083–1093, 2002.

CHURCH, J.E.; MOLDRICH, R.X.; BEART, P.M.; HODGSON, W.C. Modulation of intracellular Ca^{2+} levels by *Scorpaenidae* venoms. **Toxicon**, n. 41, p. 679–689, 2003.

COHEN, A.S.; OLEK, A.J. An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. **Toxicon**, n. 27, p. 1367–1376, 1989.

COLLETTE, B.B.; RUSSO, J.L. A revision of the scaly toadfishes, genus *Batrachoides*, with description of two new species from the eastern Pacific. **Bulletin of Marine Science**, n. 31, p. 197–233, 1981.

COLLETTE, B.B. A review of the venomous toadfishes, subfamily *Thalassophryninae*. **Copeia**, n. 4, p. 846–864, 1966.

COLLETTE, B.B. **[Family] Batrachoididae**. In: FISCHER, W.; KRUPP, F.; SCHNEIDER, W.; SOMMER, C.; CARPENTER, K.E.; NIEM, V.H. (Eds.), Guia FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental. Vol. II. Vertebrados - Parte 1. Rome. Food and Agriculture Organization, Italy: U.N., p. p. 910–918, 1995.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; LIMA, C. A. H.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; FERREIRA, M. L. Orpotrin: a novel vasoconstrictorpeptide from this venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*. **Peptides**, n. 27, p. 3039–3046, 2006.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; FERREIRA, M. L. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* freshwater stingray venom. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.

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.

DALL, G.F.; BACIAY, K.L.; KNIGHT, D. Severe sequelae after stonefish envenomation. The Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland. **Surgeon**, v. 4; n. 6, p. 384-385, 2006.

DEGHANI, H.; SAJJADI, M.M.; RAJAIAN, H.; SAJEDIANFARD, J.; PARTO, P. Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by *Himantura gerrardi* venom. **Toxicon**, n. 54, p. 881–886, 2009.

DIKIC, D. **Scatophagus argus**. Fishbase.1998. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/4698>>. Acessado em: 18/05/2016.

ERDMANN, M. V. **Synanceja horrida**. Fishbase. 2010. Disponível em: <<http://www.fishbase.se/summary/6389>>. Acessado em: 17/05/2016.

FERREIRA, M.L.; RAMOS, D. A.; MARTINS, I. A.; LIMA, C.; CONCEIÇÃO, K.; HADDAD JR. V. Clinical manifestations and experimental studies on the spine extract of the toadfish *Porichthys porosissimus*. **Toxicon**, n. 86, p. 28–39, 2014.

FERREIRA M. L.; BÁRBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; SILVA, A. M. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, n. 36, p. 405-410, 1998.

FERREIRA, M. L.; NÚÑEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; SILVA, A. M. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 1, p. 55–64, 2001.

FERREIRA, M. J.; LIMA, C.; FERREIRA, M. L. Anti-inflammatory effect of Natterins, major toxins from the *Thalassophryne nattereri* fish venom is dependent on LR4/MyD88/PI3K signaling pathway. **Toxicon**, n. 87, p. 54–67, 2014.

FERREIRA, M. L.; ROSALES, I. S.; BRUNI, F. M.; RAMOS, A. D.; PORTARO, F. C. V.; CONCEIÇÃO, K.; LIMA, C. Analysis of the intersexual variation in *Thalassophryne maculosa* fish Venoms. **Toxicon**, n. 115, p. 70-80, 2016.

FERREIRA, M. L.; EMIM, J.A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAUJO, M. S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; SILVA, A. M. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochemical Pharmacology**, n. 68, p. 2151-2157, 2004.

FERREIRA, M. L.; RAMOS, D. A.; MARTINS, A. I.; LIMA, C.; CONCEIÇÃO, K.; HADDAD JR, V. Clinical manifestations and experimental studies on the spine extract of the toadfish *Porichthys porosissimus*. **Toxicon**, n. 86, p. 28–39, 2014.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, n. 24, p. 163-169, 1965.

FONSECA, L. A.; FERREIRA, M. L. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 75, n. 4, p. 435–443, 2000.

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

FRÓES, H.P. Studies on venomous fishes of tropical countries. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 36, p. 134–135, 1933.

FRÓES, H.P. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). **Bahia Médica**, n. 4, p. 225–227, 1933.

ROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. World Wide Web Electronic Publication version (12/2013). www.fishbase.org. 2013.

GARNIER, P.; GOUDEY-PERRIERE, F.; BRETON, P., DEWULF, C., PETEK, F., PERRIERE, C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. **Toxicon**, n. 33, p. 143–155, 1995.

GARNIER, P.; SAUVIAT, M.P.; GOUDEY-PERRIERE, F.; PERRIERE, C. Cardiotoxicity of verrucotoxin, a protein isolated from the venom of *Synanceia verrucosa*. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 47–55, 1997.

GARRONE, D. N; CORDEIRO, R. C.; HADDAD, J. V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, TO, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 21, p. 795-803, 2005.

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. (Eds.), *Animais Peçonhentos No Brasil: Biologia, Clínica E Terapêutica Dos Acidentes*, second ed. Sarvier, São Paulo, p. 295–305. 2009

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

GHADESSY, F.J.; CHEN, D.; KINI, R.M.; CHUNG, M.C.; JEYASEELAN, K.; KHOO, H.E.; YUEN, R. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 41, p. 25575–25581, 1996.

GWEE, M.C.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; YUEN, R.; KHOO, H.E.; LOW, K.S.Y. A review of stonefish venoms and toxins. **Toxicon**, n. 64, p. 509–528, 1994.

HADDAD JR., V.; LASTORIA, J.C. Acidentes por mandijubas (mandis-amarelos): aspectos clínicos e terapêuticos. **Diagnostico e Tratamento**, n. 10, p. 132-133, 2005.

HADDAD JR., V.; MARTINS, I. A. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. **Toxicon**, n. 47, p. 838-843, 2006.

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

HADDAD JR. V., 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. 287-294, 2004.

HADDAD JR., V.; FAVEIRO JR., E.L.; RIBEIRO, F.A.H.; ANCHESCHI, B.D.C.; CASTRO, G.P.I.; MARTINS, R.C.; BORGHINI, G.P.; FUJII JUN, R.; BRUM, R.V.; GARRONE, D.N. Trauma and envenoming caused by stingrays and other fish in a fishing community in Ponytail do Paranapanema, State of São Paulo, Brazil: epidemiology, clinical aspects, and therapeutic and preventive measures. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 45, p. 238-242. 2012.

HADDAD JR., V; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L. C.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Sergipe State), Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 45, p. 221-223. 2003.

HADDAD, V. JR. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento (Atlas of Dangerous Aquatic Animals of Brazil; a Guide of Identification and Treatment)**, Editora Roca, São Paulo, p. 70–80. 2000.

HADDAD JR., V. **Animais aquáticos potencialmente perigosos no Brasil: guia médico e biológico**. Editora Roca. 2008.

HAHN, S.T., O'CONNOR, J.M. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. **Toxicon**, n. 38, p. 79–89. 2000

HALSTEAD, B.W. **Poisonous and Venomous Marine Animals of the World**. 3 ed. US Government Printing Office, Washington, DC. 1970.

HALSTEAD, B.W. **Dangerous Marine Animals, Cornell Maritime Press, Maryland**. p. 132–145. 1995.

HALSTEAD, B.W. **Venomous Fishes. In Venomous Animals and Their Venoms**. In: Bucherl Buckley (Ed.). Academic Press New York, London, p. 588-626. 1971.

HOPKINS, B.J., HODGSON, W.C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). **Toxicon**, n. 36, p. 973-983, 1998.

HOPKINS, B.J.; HODGSON, W.C.; SUTHERLAND, S.K. Pharmacological studies of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. **Toxicon**, n. 32, p. 1197–1210, 1994.

JUNQUEIRA, M. E. P.; GRUND, L. Z.; ORII, N. M.; SARAIVA, T. C.; LOPES, C. A. M.; LIMA, C.; FERREIRA, M. L. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. **Toxicon**, n. 49, p. 909-919, 2007.

KADOMURA, K.; NAKASHIMA, T.; KURACHI, M.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Production of reactive oxygen species (ROS) by devil stinger (*Inimicus japonicus*) during embryogenesis. **Fish Shellfish Immunol**, n. 21, p. 209–214, 2006.

KHOO, H. E.; YUEN, R.; POH, C. H.; TAN, C. H. Biological activities of *Synanceja horrida* venom. **Natural Toxins**, v. 1, p. 54-60. 1992.

KIM, D.; NARUSE, S.; KADOMURA, K.; NAKASHIMA, T.; JIANG, Z.; YAMASAKI, Y.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Transitional reactive oxygen species (ROS) production in fertilized egg embryos of devil stinger (*Inimicus japonicus*), a marine fish species. **Biosci Biotechnol Biochem**, n. 76, p.1561–1564, 2012.

KIRIAKE, A.; SUZUKI, Y.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K. Proteinaceous toxins from three species of scorpaeniform fish (lionfish *Pterois lunulata*, devil stinger *Inimicus japonicus* and waspfish *Hypodytes rubripinnis*): Close similarity in properties and primary structures to stonefish toxins. **Toxicon**, n. 70, p. 184–193, 2013.

KIZER, K.W.; MCKINNEY, H. E.; AUERBACH, P.S. *Scorpaenidae* envenomation: a five-year Poison Center experience. **JAMA**, v. 253, n. 6, p. 807–810, 1985.

KREGER, A.S.; MOLGO, J.; COMELLA, J. X.; HANSSON, B.; THESLEFF, S. Effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom on murine and frog neuromuscular junctions. **Toxicon**, n. 31, p. 307–317, 1993.

KREGER, A.S. The detection of a cytolytic toxin in the venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). **Toxicon**, n. 29, p. 733–743, 1991.

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

LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F.; SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. Arraias de água doce (Chondrichthyes Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes. **Scientia Amazonia**, v. 2, p. 11-27, 2013.

LIMA, C.; CLISSA, P. B.; PIRAN-SOARES, A. A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, M. M.; FERREIRA, M. L. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon**, v. 42, p. 499-507, 2003

LIU, Z. Y.; QUAN, H. F. Research on the technique for artificial breeding of *Inimicus japonicus*. **Journal Shanghai Fish University**, n. 14, p. 30–34, 2005.

FERREIRA, M. L.; BARBARO, K.C.; CARDOSO, D.F.; SILVA, A.M. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, n. 36, p. 405–410, 1998.

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

FERREIRA, M. L.; SILVA, A. M. M.; SOARES, A. A. P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FARSKY, S.H.P. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne*

nattereri fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40, n.8, p. 1141–1147, 2002.

LOW, K.S.Y.; GWEE, M.C.E.; YUEN, R. Eur. **Journal of Pharmacology**, n.183, p. 574, 1990.

LOW, K. S. Y.; GWEE, M. C. E.; YUEN, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KHOO, H. E. Stonustoxin: Highly potent endothelium-dependent vasorelaxant action in the rat. **Toxicon**, n. 31, p. 1471-1478, 1993.

MADDERN, M. **Gymnapistes marmoratus**. Fishbase. 2006. Disponível em: <http://www.fishbase.org/summary/7317>. Acessado em: 19/05/2016.

MAGALHÃES, G.S.; FERREIRA, M. L.; JUNQUEIRA, M.I.L.A; SPENCER, P.J.; ARAÚJO, M.S.; PORTARO, F.C.V.; MA, L.; VALENTE, R.H.; JULIANO, L.; FOX, J.W.; HO, P.L.; SILVA, A.M.M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon**, v. 87, p. 687-699, 2005.

MAGALHÃES, K.W.; LIMA, C.; SOARES, A.A.P.; MARQUES, E.E.; LIMA, C.A.H.; FERREIRA, M.L. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. Obignyi*. **Toxicon**, v. 47, p. 575–583, 2006.

MARSHALL, T., In: Argus and Robertson (Eds). **Fish of the Great Barrier Reef and Coastal Waters of Queensland**, 1° Ed., Sydney. 1964.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2° ed., Brasília. Fundação Nacional de Saúde. 2001.

MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA E ASSISTÊNCIA SOCIAL. **Literatura leva pescador a descobrir Previdência**. 2003. Disponível em: <http://www.previdenciasocial.gov.br/agrev/MostraNoticia.asp?Id=11897&ATVD=1&xBotao=1>. Acessado em 29/05/2016).

NAGATA K, FUGIMIVA M, SUGIURA H, UEHARA M. Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. **Histochem Journal**, n. 33, p. 559–68, 2001.

NAIR, M.S.R.; CHEUNG, P.; LEONG, I.; RUGGIERI, G.D. A non-proteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). **Toxicon**, n. 23, p. 525–527, 1985.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. Editora Wiley, New York, p. 308–327. 1994.

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

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

PEDROSO, C.M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M.P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M.S.; HADDAD JR., V.; BARBARO, K.C.; ANTONIAZZI, M.M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. **Toxicon**, n. 50, p. 688–697, 2007.

PIELOU, E. C. **After the Ice Age**. University of Chicago Press, Chicago. 1991.

PHOON, W. O.; ALFRED, E. R. A study of stonefish (*Synanceja*) stings in Singapore with a review of the venomous shes of Malaysia. **Singapore Medical Journal**. n. 6, p. 158-163, 1965.

POH, C.H.; YUEN, R.; KHOO, H.E.; CHUNG, M.; GWEE, M.; OPALAKRISHNAKONE, P. Purification and partial characterization of stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 99, p. 793–808, 1991.

RANDALL, J.E. **Scorpaena plumieri**. Fishbase.1995. Disponível em: <<http://www.fishbase.se/summary/1201>>. Acessado em: 18/05/2016.

RANDALL, J.E.; ALLEN, G.R.; STEENE, R.C. **Fishes of the Great Barrier Reef and Coral Sea**. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii. p. 506. 1990.

RANDALL, J.E. **Pterois antennata**. Fishbase.1995. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/4914>>. Acessado em: 18/05/2016.

RANDALL, J. E. **Synanceia trachynis**. Fishbase.1995. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=6389>>. Acessado em: 18/05/2016.

RANDALL, J. E. **Synanceia verrucosa**. Fishbase. 1995. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/5825>>. Acessado em: 18/05/2016.

REIS, E. G. A **pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no Estuário da Lagoa dos Patos, RS**. Documentos Técnicos. n. 05, Furg. Rio Grande do Sul, p. 22. 1986.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 5° Ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2009.

RICKLEFS, R. E.; SCHLUTER, D. (Eds.). **Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives**. University of Chicago Press, Chicago and London.

RIZZARI, J. R.; LÖNNSTEDT, O. M. Cooperative hunting and gregarious behaviour in the zebra lionfish, *Dendrochirus zebra*. **Marine Biodiversity**, n. 44, p. 467–468, 2014.

ROBERTSON, D. R. **Scorpaena guttata**. Fish of the Neotropics. 2010. Disponível em: <<http://neotropicalfishes.myspecies.info/taxonomy/term/23826>> Acessado em: 18/05/2016.

ROSA, M. F. M.; MATTOS, A. O. U. A saúde e os riscos dos pescadores e catadores de caranguejo da Baía de Guanabara. **Ciência & Saúde Coletiva**, n. 15, p. 1543-1552, 2010

ROSALES, J. I. S.; SOARES, A. A.P.; FARSKY, S. H.; TAKEHARA, S.H.; LIMA, C.; FERREIRA, M. L. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish

venom. **Toxicon**, v. 45, p. 155-61, 2005.

ROSELET, F.F.G. **Pimelodus maculatus**. Fishbase. 2004. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/23451>>. Acessado em: 19/05/2016.

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

SANTOS, A. P.; SOUZA, V. M. O.; BRUNI, F. M.; ROSALES, J. I. S.; FERREIRA, M. L.; LIMA, C. Delayed polymorphonuclear leukocyte infiltration is an important component of *Thalassophryne maculosa* venom pathogenesis. **Toxicon**, n. 52, p. 106–114, 2008.

SANTOS, J. C. **Potamotrygon cf. henlei**. Foto 18,36x32,64. 2015.

SANTOS, J. C. **Potamotrygon cf. scobina**. Foto 18,36x32,64. 2015

SANTOS, J. C. **Potamotrygon gr. orbigny**. Foto 18,36x32,64. 2015.

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

SAUNDERS, P. R.; TAYLOR, P. B. Venom of the lionfish *Pterois volitans*. **Journal of Physiology**, n. 197, p. 437-440, 1959.

SAUNDERS, P.R.; ROTHMAN, S.; MEDRANO, V.A.; CHIN, P. Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanceja horrida*. **American Journal of Physiology**, n. 203, p. 429–432, 1962.

SAUNDERS, P.R. Venom of the stonefish *Synanceja horrida* (Linnaeus). **Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, n. 123, p. 195–205, 1959.

SAUNDERS, P.R.; TAYLOR, P.B.; Venom of the lionfish *Pterois volitans*. **American Journal of Physiology**, n. 197, p. 437–440, 1959.

SEIBERT, C. S. **Ferrão de Potamotrygon cf. henlei**. Foto 12,80x7,20. 2016.

SCHAEFFER, JR., R.C.; CARLSON, R.W.; RUSSELL, F.E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**, n. 9, p. 69–78, 1971.

SHAO, K.T.; **Inimicus japonicus**. Fishbase. 1994. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/6386>>. Acessado em: 18/05/2016.

SHAO, K.T.; **Pterois lunulata**. Fishbase. 1994. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/Pterois-lunulata.html>>. Acessado em: 18/05/2016.

SHINOHARA, M. A. Novel Chemoattractant Lectin, Karatoxin, From the Dorsal Spines of the Small Scorpionfish *Hypodytes rubripinnis*. **Journal of Pharmacological Sciences**, n. 113, p. 414–417, 2010.

- SHIOMI, K.; HOSAKA, M.; KITUCHI, T.; Properties of a lethal factor in stonefish *Synanceja verrucosa* venom. **Nippon Suis Gakk.**, n. 59, p. 1099-1103, 1993.
- SHIOMI, K.; HOSAKA, M.; FUJITA, S.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T.; Venoms from six species of marine fish: lethal and hemolytic activities and their neutralization by commercial stonefish antivenom. **Marine Biodiversity**, n. 103, p. 285–289, 1989.
- SILVA, G.C.D.; SABINO, J.; ALHO, C.J.R.; NUNES, V.L.B.; HADDAD JR., V. Injuries and envenoming by aquatic animals in fishermen of Coxim and Corumbá municipalities, State of Mato Grosso do Sul, Brazil: identification of the causative agents, clinical aspects and first aid measures. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 43, p. 486-490, 2010.
- GISHA SIVANA, G.; VENKETESVARANB, K.; RADHAKRISHNAN, C.K. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. **Toxicon**, n. 50, p. 563–571, 2007.
- SUTHERLAND, S. **Australian Animal Toxins**. 1° edition, Oxford University Press. 1983.
- SUTHERLAND, S.K. **Genus *Synanceia* (Linnaeus), stone-fishes: *Synanceja verrucosa* (Bloch & Schneider) & *Synanceja trachynis* (Richardson)**. In: Australian Animal Toxins, The Creatures, Their Venoms and Care of the Poisoned Patient. Oxford University Press, Melbourne, p. 400-410, 1983.
- TAKUSHIMA, M.; NOZAKI, R.; KADOMURA, K.; YASUMOTO, S.; SOYANO, K. Induced ovulation using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger, *Inimicus japonicus*. **Fish Physiol Biochem**, n. 28, p. 521–522, 2003.
- TANGE, Y. Morphology of the poison apparatus in Japanese fish with comments on its toxicity. V. Poison apparatus in *Hypodytes rubripinnis* (Temminck et Schlegel). **Yokohama Med Bull**, n. 5, p. 42–48, 1954.
- UEDA, A.; SUZUKI, M.; HONMA, T.; NAGAI, H.; NAGASHIMA, Y.; SHIOMI, K.; Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceja verrucosa* venom. **Biochim Biophys Acta**, n. 1760, p. 1713–1722, 2006.
- WALKER JR., H.J.; ROSENBLATT, R.H. Pacific toadfishes of the genus *Porichthys* (Batrachoididae) with description of three new species. **Copeia**, n. 4, p. 887–904, 1988.
- WILLIAMSON, J.A.; FENNER, P.J.; BURNETT, J.W. **Venomous and poisonous marine animals: a medical and biological handbook**. University of New South Wales Press, Sydney, p. 375–386, 1996.
- WRIGHT, J.J. Diversity, phylogenetic distribution, and origins of venomous catfishes. **BMC Evolutionary Biology**, n. 9, p. 282-285, 2009.

PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELO VENENOS DAS ARRAIAS: A IMPORTÂNCIA DE IL-33 PARA A REGULAÇÃO DA IMUNIDADE INATA CONTRA O VENENO DAS ARRAIAS *Potamotrygon cf. henlei*

Janaina Cardoso dos SANTOS^{1*}

¹Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Palmas, TO
*email: janaina.foco@gmail.com

Resumo

Arraias da espécie *Potamotrygon cf. henlei* são amplamente distribuídas ao longo dos rios do centro-oeste do Brasil, causando inúmeros acidentes por animais peçonhentos principalmente na estação seca, o que representa um grave problema de saúde pública. Os acidentes geralmente envolvem pescadores e banhistas, e até o momento não existe um tratamento eficaz para os acidentados. Considerando estes fatos e as limitações de estudos visando à compreensão dos efeitos induzidos pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da IL-33 na regulação da imunidade inata contra o veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, sobre as propriedades de IL-33 como uma citocina que pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas relacionadas com a inflamação aguda. Nossos resultados mostraram um significativo recrutamento leucócitos, com um processo inflamatório causado pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* em camundongos Swiss machos. Isto foi confirmado pela inibição de recrutamento de leucócitos pelo anticorpo neutralizador de IL-33, inibidores de MyD88, ou inibidores das quinases específicas de ERK, JNK e p38.

Palavras-chave: Arraia, *Potamotrygon*, Veneno, Muco, Atividades farmacológicas e bioquímicas

Abstract

Stingrays from the *Potamotrygon cf. henlei* species are widely distributed in high numbers throughout the rivers of central-west Brazil, being the source of numerous envenomations occurring in the dry season, posing a serious public health problem even if not properly reported. The accidents usually involve fishermen and bathers, and to date there is no effective treatment for the injured. Considering these facts and limitations of studies aiming at understanding the effects induced by *P. cf. henlei* envenoming, the aim of this study was to evaluate IL-33 role in regulation of innate immunity against *P. henlei* venom, over the properties of IL-33 as a cytokine which can induce production of pro-inflammatory cytokines and chemokines related to acute inflammation. Our results showed a significant leukocyte recruitment, featuring an inflammatory process caused by *Potamotrygon cf. henlei* venom in male Swiss mice. This was confirmed by inhibiting recruitment by this antibody neutralizing IL-33 receptor, peptide inhibitors or MyD88, or specific inhibitors of kinases ERK, JNK and P38.

Keywords: Stingray, *Potamotrygon*, Venom, Mucus, Pharmacological and biochemical activities

CAPÍTULO 2

PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELO VENENOS DAS ARRAIAS: A IMPORTÂNCIA DE IL-33 PARA A REGULAÇÃO DA IMUNIDADE INATA CONTRA O VENENO DAS ARRAIAS *Potamotrygon cf. henlei*

1. INTRODUÇÃO

Ocorre uma variedade de animais aquáticos venenosos nos mares e rios com grande potencial de causar acidentes devido à interação de forma negativa com humanos, sejam em atividades recreativas ou laborais. As arraias estão relacionadas em diversas pesquisas científicas como um dos principais causadores desses acidentes (PARDAL, 1993; HADDAD JR., 2003; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.* 2011). A relação entre as arraias e os humanos sempre foi conturbada, de acordo com Garrone-Neto (2005), sendo o animal relacionado a ferimentos ocasionados nos ribeirinhos e pescadores, principalmente na região Norte do Brasil, onde são comuns. Este tipo de acidente é reconhecido nas regiões norte e centro-oeste do país, como um importante problema de saúde pública, devido a sua elevada morbidade (GARONE *et al.*, 2005; HADDAD JR. *et al.*, 2004).

As arraias são representantes da família Potamotrygonidae (Elasmobranchii: Myliobatiformes), que compreende um grupo de condrictes com adaptações para a vida exclusiva em água doce (THORSON *et al.*, 1978), e são representadas pelos gêneros Paratrygon, Plesiotrygon, Potamotrygon e Heliotrygon (CARVALHO & LOVEJOY, 2011).

Um dos problemas ocasionado nos acidentes causados pelas arraias é a lesão gerada pela introdução do seu ferrão. As arraias apresentam uma cauda em forma de chicote onde as nadadeiras dorsais foram substituídas por um espinho dorsal grande, serrilhado e venenoso (POUGH *et al.*, 2008). Os ferrões têm origem dérmica e parecem ser frequentemente substituídos, podem estar em número de um a três e são recobertos por um tecido rico em glândulas que liberam veneno pela ruptura do tegumento (SILVA, 2006). Arraias não são agressivas, causando acidentes apenas quando pisoteados ou manuseados indevidamente, podendo provocar ferimentos dolorosos, de difícil cicatrização (HADDAD JR., 2003).

Os acidentes com arraias acontecem, na maioria das vezes, nas extremidades dos membros inferiores, como tornozelos e pé, em decorrência da vítima, durante o banho, pisar sobre a arraia, que habita o fundo do rio, escondendo-se em covas rasas, escavadas

em locais arenosos ou lodosos (PARDAL, 1997). Estes acidentes necessitam de atenção médica não apenas pela lesão mecânica causada pelo ferrão, mas também pela ação tóxica da peçonha (HADDAD JR. *et al.*, 2004). A composição, os efeitos fisiopatológicos e as ações farmacológicas do veneno das arraias vêm sendo estudados para tentar elucidar o quadro clínico desencadeado no envenenamento.

Esses acidentes causam ferimentos com diversos sintomas como dor intensa, inflamações, necrose cutânea, ulcerações (ANTONIAZZI *et al.*, 2011; COOK *et al.*, 2006; CLARK *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008), complicações sistêmicas (HADDAD JR. *et al.*, 2004; FORRESTER, 2005) e ainda distúrbios na microcirculação (BARBARO *et al.*, 2007). O ferrão também pode quebrar e provocar a retenção de fragmentos de dentina na ferida (HADDAD JR. *et al.*, 2004). Além da lesão pela ação mecânica do ferrão e da introdução do veneno através de glândulas dispersas pelo epitélio que o recobre (CARVALHO, 2004), bactérias presentes no muco do animal podem causar infecções secundárias (DOMINGOS *et al.*, 2011).

Experimentalmente os venenos das arraias induzem nocicepção, edema, necrose e distúrbios na microcirculação (PARDAL, 1993). Do veneno destes animais já foram isoladas proteínas como serotonina, fosfodiesterase, 5-nucleotidase, hialuronidase (HALSTEAD, 1981) e ainda, proteínas com atividade caseinolítica, gelatinolítica e fibrinogenolítica no veneno da *Potamotrygon falkneri* (HADDAD JR. 2004), e um peptídeo vasoconstritor do veneno da *Potamotrygon orbignyi* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

Para a espécie *Potamotrygon cf. henlei*, Santos *et al.* (2011) demonstraram que os extratos de muco de ferrão e dorso possuem atividade proteolítica e foram capazes de induzir dor e edema, com influxo de infiltrados inflamatórios quando testados em modelo murino. A lesão causada pela introdução do ferrão no tecido lesionado, assim como a contaminação desse tecido pelo muco, atrai infiltrados inflamatórios, caracterizando o início do processo inflamatório, sendo uma resposta imediata do tecido vascularizado por células da imunidade inata a uma infecção e as danos teciduais. Essa resposta pode ser aguda ou crônica, dependendo do tipo e da persistência do agente lesivo (FOSTER & MEDZHITOV, 2009; KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002) e compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos, cuja finalidade é eliminar o agente agressor e restaurar o tecido à sua forma e função normais (GARCIA-LEME, 1989). O muco da *Potamotrygon cf. henlei* possui peptídeos antimicrobianos contra as bactérias *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, e contra os fungos *Candida albicans* e *C. tropicalis* (SANTOS *et al.*, 2011; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012). Tais estudos destacam também a importância do muco das arraias na imunidade inata (LAMEIRAS, 2013).

Nossa hipótese para o quadro inflamatório desencadeado no envenenamento pelas arraias é de que as células estruturais, tais como as endoteliais liberem interleucinas (IL), como a IL-33 sobre a lesão, e que os mastócitos adjacentes reajam produzindo fatores pro-inflamatórios, incluindo IL-6, fator de necrose tumoral (TNF α) e leucócitos. Subsequentemente, estes sinais induzem alterações vasculares, incluindo vasodilatações, aumento da permeabilidade da microvasculatura e recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos para o local da lesão. A IL-33 é uma interleucina da família IL-1, é expressa por vários tipos de células diferentes, principalmente por células epiteliais e endoteliais (LIEW *et al.*, 2010). Quando ocorre algum dano nos tecidos o sistema imune é ativado através de um “alarmin” liberados na sequência, iniciando a resposta inflamatória. Miller (2011) acredita que a IL-33 possa atuar nessa função de “alarmin” e que ela medie os efeitos biológicos através da interação com os receptores ST2. E em termos evolutivos do sistema imunitário, acredita-se que a IL-33 esteja envolvida na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, havendo um provável impacto sobre vários quadros inflamatórios (MILLER, 2011).

Portanto, a proposta desse estudo foi avaliar a importância de IL-33 para a regulação da imunidade inata contra o veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*, sobre a base das propriedades de IL-33 como uma citocina que pode induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas ligadas a inflamação aguda.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das arraias

Os animais foram coletados na área de influência do reservatório da Usina Hidrelétrica do Lajeado (Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães) e transferidos para o laboratório do Núcleo de Estudos Ambientais, para a extração da peçonha.

As coletas foram realizadas com autorização para atividades com finalidade científica concedida pelo ICMBio (SISBIO n° 45407-1/2014). Os animais coletados (N=8) foram depositados na Coleção de Peixes da Universidade Federal do Tocantins (figura 1), onde permanecem com a seguinte numeração: UNT 14461 (5), UNT 14460, UNT14461 (2). O mapa da área de coleta (figura 2) mostra a localização da captura dos animais. Os pontos de localização foram encontrados para cada animal coletado com o uso do aplicativo OruxMaps, executado no sistema operacional Android, em dispositivo smartphone. A imagem de alta resolução espacial foi obtida no site do Google Earth, sendo

o arquivo de imagens salvo no formato bitmap e editado pelo editor de imagem do pacote Word Office.



Figura 1: Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB), Coleção de peixes da Fundação Universidade Federal do Tocantins. Fonte: SEIBERT, 2010.



Figura 2: Pontos de coleta de arraias - reservatório da Usina Hidrelétrica do Lajeado – Porto Real, município de Porto Nacional-TO. Fonte: Google earth-adaptada.

2.2 Extração da peçonha

A extração da peçonha foi realizada pela raspagem do epitélio que recobre os ferrões (figura 3). Este material foi dissolvido em tampão fosfato (PBS) e centrifugado a 1400 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, novamente centrifugado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até sua utilização. O conteúdo protéico foi quantificado pelo método de Bradford (1976), usando soro de albumina bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) como padrão.

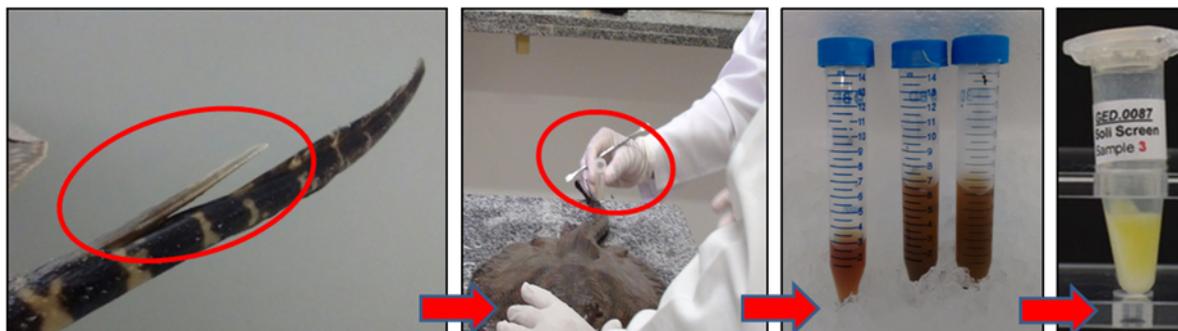


Figura 3: Sequencia da extração do veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*.

2.3 Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss foram utilizados pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas e condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados conforme as leis da Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com a aprovação do comitê de experimentação animal do Instituto Butantan (processo n° 1370/15).

2.4 Protocolo experimental

Inicialmente foi realizada a padronização da dosagem de proteínas do veneno de *Potamotrygon cf. henle* através do lavado peritoneal, técnica que quantifica a migração de leucócitos na cavidade peritoneal. Os seguintes grupos foram constituídos para este experimento: controle, veneno a 300 µg/mL, veneno a 30 µg/mL, veneno a 3 µg/mL e veneno a 0,3 µg/mL. Cada grupo continha cinco animais, todos tratados com injeção intraperitoneal de 200 µL de salina 0,9% estéril ou por veneno de *Potamotrygon cf. henle* nas concentrações já citadas.

Após a padronização da dosagem de proteínas do veneno de *Potamotrygon cf. henle*, foi realizado a avaliação por microscopia Intravital do rolamento de leucócitos para avaliar a capacidade do veneno em modular o rolamento, a aderência e a migração de leucócitos em vênulas pós-capilares do cremaster de camundongos. Neste experimento utilizamos sete grupos independentes, cada um contendo 5 animais. Inicialmente os grupos constituídos foram: controle (salina 0,9% estéril) e veneno para a avaliação de resposta positiva de produção e liberação de histamina e IL-33. Em seguida, cinco diferentes grupos de camundongos, cada grupo com cinco animais, foram tratados pela injeção intraescrotal de 50 µL do neutralizador anti-mouse ST2 a 5 µg/animal e descansou durante 30 min, ou

com peptídeo inibidor de MyD88 a 0,01 mg/animal; ou com Wortamannin a 0,005 μ M; ou com PD 98059 a 2 μ M; ou com SB 203580 a 0,05 μ M, todos por 1 h antes da aplicação tópica do veneno para a investigação da participação de IL-33, MyD88 e das quinases ERK, JNK e p38 na inflamação induzida.

Posteriormente a avaliação por microscopia Intravital do rolamento de leucócitos, dois grupos independentes de camundongos Swiss machos, contendo cinco animais cada, foram constituídos, sendo: um grupo controle tratado por salina 0,9% estéril estando em iguais condições ao grupo veneno. E um grupo veneno, imunizado com a injeção intraperitoneal de 200 μ L a 10 μ g/animal de veneno de *Potamotrygon cf. henlei* e descansou durante 2, 4, 24, 72, 120 e 168 horas para a coleta do exudato, obtenção da suspensão celular e quantificação da migração de leucócitos na cavidade peritoneal. A partir da determinação do grupo de camundongos com neutrofilia máxima, cinco novos grupos de camundongos (n=5) foram tratados pela injeção subcutânea de 500 μ L do neutralizador anti-mouse ST2 a 5 μ g/animal e, ou com peptídeo inibidor de MyD88 a 0,01 mg/animal; ou com Wortamannin a 0,005 μ M; ou com PD 98059 a 2 μ M; ou com SB 203580 a 0,05 μ M, todos com 50 μ L do inibidor específico por 1 h antes da injeção intraperitoneal do veneno a 10 μ g/animal e descansou durante 24 horas para a investigação da participação de IL-33, MyD88 e das quinases ERK, JNK e p38 na inflamação induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*.

2.5 Tratamentos e neutralizações

Grupos independentes de animais Swiss machos foram pré-tratados pela:

- i) Injeção intraperitoneal de 200 μ L do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* ou pela aplicação tópica de 30 μ L do veneno, ambos a 10 μ g/animal;
- ii) Injeção intraescrotal de 50 μ L ou pela injeção subcutânea de 500 μ L do anticorpo neutralizador anti-mouse ST2 (ST2/IL-1 R4 *Affinity Purified Polyclonal Ab* AF1004, R&D Systems) a 5 μ g/animal por 30 min antes da aplicação do veneno;
- iii) Injeção intraescrotal ou subcutânea de 50 μ L do peptídeo inibidor de MyD88 (tlrl-pimyd – Imgenex, IMG-2005-1) diluído em salina 0,9% (W1628, Sigma) a 0,5 mg/kg peso (0,01 mg/animal) por 1 h antes da aplicação do veneno;
- iv) Injeção intraescrotal ou subcutânea de 50 μ L de Wortamannin a 0,005 μ M (specifically inhibits phosphatidylinositol 3-kinase – Novex, PHZ1301) por 1 h antes da aplicação do veneno;

v) Injeção intraescrotal ou subcutânea de 50 µL de PD 98059 a 2 µM (inibitor MAP kinase kinase – Gibco, PHZ1164) por 1 h antes da aplicação do veneno;

vi) Injeção intraescrotal ou subcutânea de 50 µL de SB 203580 a 0,05 µM (inibitor p38 mitogen-activated protein MAP kinase) por 1 h antes da aplicação do veneno. Como controle um grupo de animais foi tratado com salina estéril 0,9% com iguais condições.

2.6 Avaliação por microscopia Intravital do rolamento de leucócitos

A microscopia Intravital vem sendo amplamente utilizada para a caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisas de novas drogas antiinflamatórias, onde é possível obter informações dos eventos dinâmicos na microvasculatura *in vivo*. Com esta técnica é possível estudar as interações leucócitos-endotélio durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de rolamento, adesão e migração em vênulas pós-capilares (GAVINS & CHATTERJEE, 2004).

Camundongos machos pré-tratados foram anestesiados, após 30 min ou 1 h, pela via intraperitoneal (i.p.) com 50 µL de solução relaxante 1:4 (Xilazina: PBS 1x, *Calmium*®, *Agener União*, Brasil, Cod. 039-0643) e 0,1 mL de Quetamina (*Holliday-Scott SA*-. Buenos Aires, cod. 042-0823), para cada 10 g de peso corpóreo. Em seguida foram mantidos sobre uma placa quente com temperatura controlada (37 °C) para exposição do músculo cremaster. A contagem do número de leucócitos em rolamento foi realizada em uma vênula pós-capilar, de diâmetro entre 25 a 40 µm, selecionada a cada 10 min da aplicação, os animais foram mantidos por um período de observação de 30 min. O experimento foi realizado em um microscópio óptico (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss, Germany) com máquina fotográfica (IcC 1, Carl-Zeiss, Germany) acoplada ao sistema. As imagens foram posteriormente analisadas com o auxílio do programa Axiovision 4.6 (Carl-Zeiss).

2.7 Quantificação da migração de leucócitos na cavidade peritoneal

Para a obtenção de células do peritônio os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada com PBS + 10 mM de EDTA para coleta do exudato e obtenção da suspensão celular. Em seguida, o material foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado e congelado a -20 °C para dosagem de citocinas, enquanto o sedimento celular foi ressuspenso em PBS + 0,1% BSA para contagens de células.

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer com solução Turk na diluição de 1:20. Para contagens diferenciais, alíquotas contendo 100 µL de suspensão celular foram aplicadas em lâminas de vidro e submetidas a centrifuga Cytospin. Depois, coradas com kit Heme-3 Stain Set (Fisher Scientific, Pitts Burgh, PA) para a contagem de neutrófilos e macrófagos peritoneais, em microscópio óptico Nikon ECLIPSE E200 com objetiva de 40x, de acordo com as características morfológicas como descrito (COOK *et al.*, 2003).

2.8 Quantificação de quimiocina

O nível da quimiocina KC no sobrenadante de cultura de células esplênicas, no lavado da cavidade peritoneal foi determinado por ELISA sanduíche. Microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h com anticorpos monoclonais específicos para a quimiocina. Após lavagem e distribuição das amostras foram adicionados anticorpos específicos para a quimiocina conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Curvas-padrão utilizando concentrações conhecidas da quimiocina recombinante foram realizadas para quantificação das amostras. O limite de detecção para a quimiocina KC foi de 15.6 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média das concentrações das amostras de cada grupo acrescida do desvio-padrão.

2.9 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como a média aritmética acrescida do desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA) seguida do teste Mann-Whitney, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997).

3. RESULTADOS

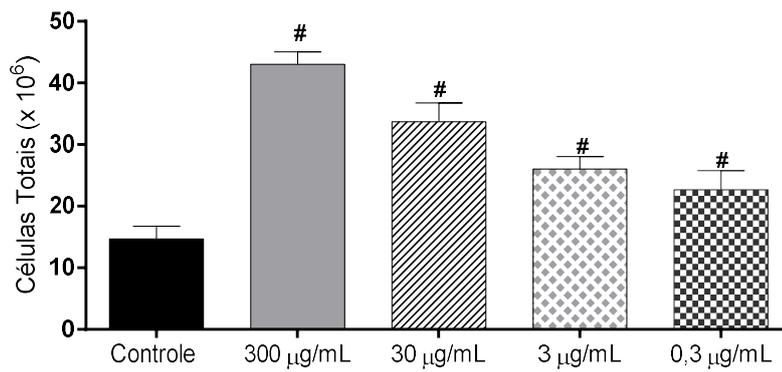
Propusemos-nos a investigar a importância do eixo IL-33/STA na resposta inata dependente de mastócitos, induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*. Para tanto foi necessário determinar cinco ensaios para avaliar o efeito *in vivo* do veneno na indução da inflamação e seu mecanismo de ação.

3.1 Padronização da concentração de proteínas do veneno de *Potamotrygon cf. henlei*

Inicialmente padronizamos a concentração de proteínas do veneno avaliando diferentes concentrações. Os resultados apresentados na figura 4A mostram que a salina estéril não alterou o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, sendo a presença destas atribuída somente a injúria causada pela injeção. Enquanto que, a resposta às injeções de diferentes concentrações do veneno induziu significativo aumento no recrutamento de células totais na cavidade peritoneal.

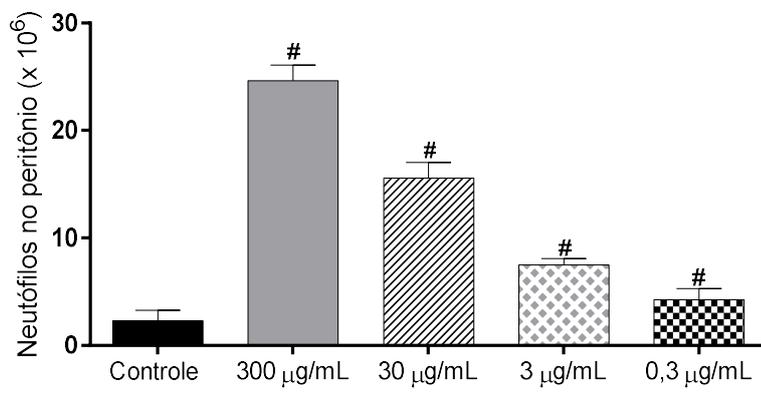
Ao fazermos a contagem diferencial de células do exudato da cavidade peritoneal dos camundongos, distinguimos o quantitativo de macrófagos e neutrófilos, o que está demonstrado na figura 4B. Foram observadas diferenças significativas no quantitativo de macrófagos obtidos nos diferentes grupos testados, em relação ao controle, que não variou com o aumento da concentração das proteínas do veneno. Diferente do observado para os neutrófilos, cujo recrutamento para a cavidade peritoneal respondeu ao aumento da concentração proteica. O maior recrutamento de neutrófilos foi observado no grupo de camundongos injetado com a concentração de 300 µg/mL do veneno (Fig. 4C), sendo esta estabelecida como a ideal para os ensaios subsequentes.

A)



Veneno de *P. cf. henlei*

B)



Veneno de *P. cf. henlei*

C)

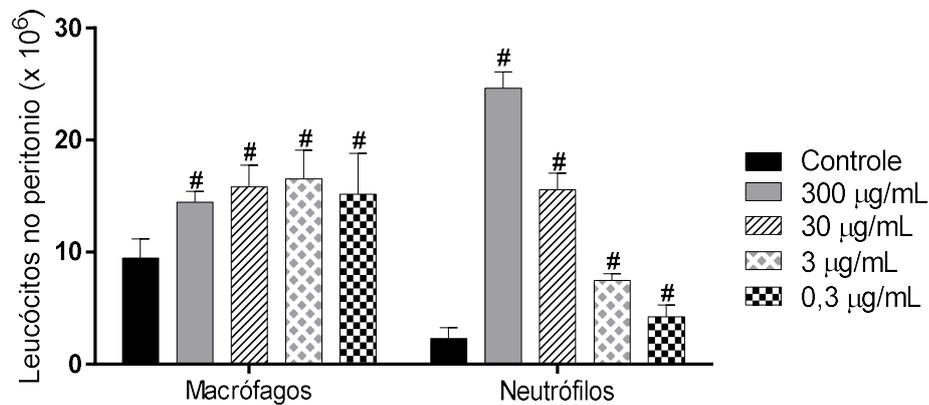


Figura 4. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal. Camundongos Swiss machos foram tratados pela injeção intraperitoneal de 500 µL do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300, 30, 3, ou 0,3 µg/mL, com salina 0,9% estéril como controle. Após 2h da injeção, os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta do exudato e obtenção da suspensão celular que foi processada para contagem total de leucócitos por Turk (A), diferencial de leucócitos (B) e neutrófilos (C) em laminais coradas com hematoxilina e eosina. As barras representam a média de 4-7 animais por grupo acrescidas do desvio-padrão. # $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle.

3.2 Indução do rolamento de leucócitos na microcirculação pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*

Avaliamos por microscopia Intravital a capacidade do veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei*, na concentração de 300 µg/mL, em modular o rolamento, a aderência e a migração de leucócitos em vênulas pós capilares do cremaster de camundongos Swiss machos. Para tanto, os camundongos foram anestesiados e tiveram seu músculo cremaster exposto para a aplicação tópica de 30 µL de veneno ou salina 0,9% estéril (controle), sendo mantidos para a análise da microvasculatura por 30 minutos após a aplicação. Os resultados mostraram que, a aplicação do veneno levou ao aumento significativo do número de leucócitos rolantes (Fig. 6A), em relação ao observado para o grupo controle. Os leucócitos circulantes recrutados aderiram às células endoteliais, representando significativo aumento na microcirculação (Fig. 5 e Fig. 6B).

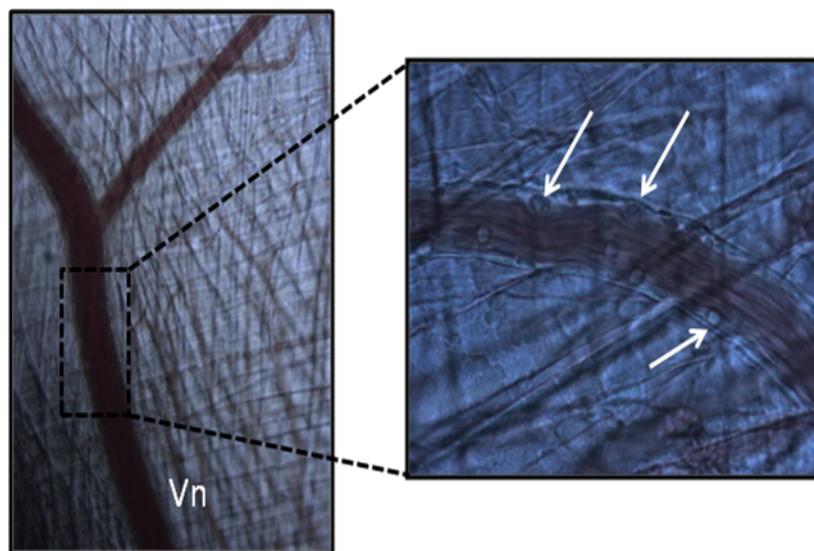
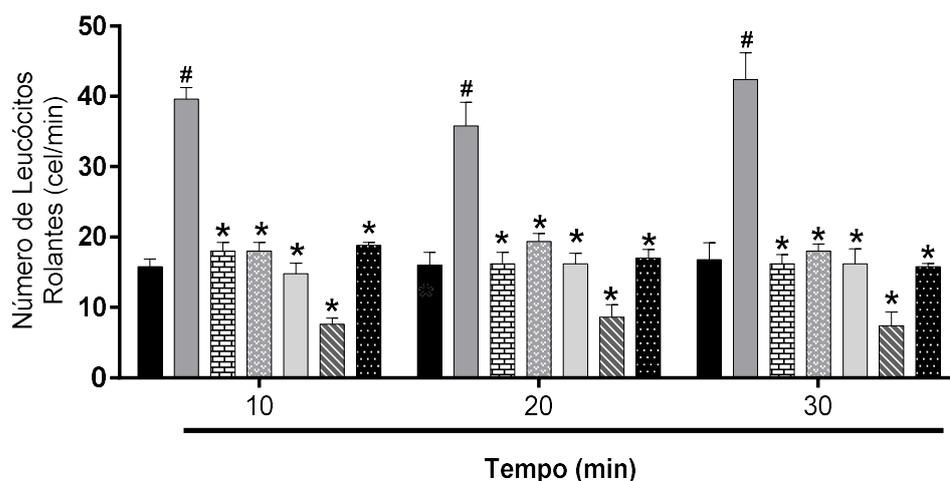


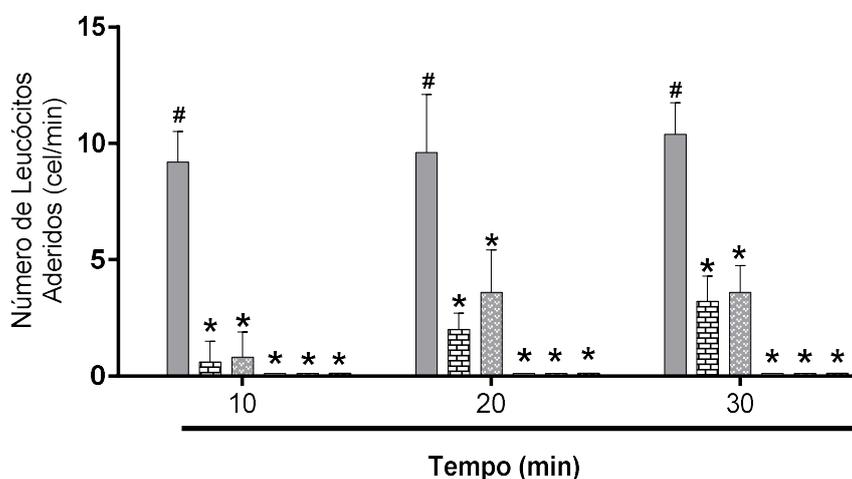
Figura 5. Leucócitos aderidos em vênulas pós-capilares do músculo cremaster. Leucócitos aderentes foram observados após a aplicação tópica de 30 µL do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300 µg/mL. As fotografias foram obtidas a partir de imagens digitalizadas no monitor do computador com aumento de 10x optovar.

Em seguida, avaliou-se a capacidade da citocina IL-33 em modular o rolamento, a aderência e a migração de leucócitos induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, por meio do cremaster de camundongos. Similarmente, a participação da sinalização de MyD88 e das quinases ERK, JNK e P38, foi avaliada por intermédio de anticorpo neutralizador dos respectivos receptores citados no quadro inflamatório em estudo. A figura 6A apresenta a diminuição do quantitativo de leucócitos rolantes na microcirculação em resposta aos tratamentos IL-33, MyD88 e das quinases ERK, JNK e P38.

A)



B)



- Controle
- Veneno
- Anti-IL-33 - 1 h - veneno
- Inibidor de MyD88 - 1h - veneno
- Inibidor de PI3K - 1h - veneno
- Inibidor de ERK 1/2 - 1h - veneno
- Inibidor de p38 MAP Quinase

Figura 6. O rolamento de leucócitos induzido na microcirculação pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* depende de sinais derivados da ligação de IL-33 ao receptor ST2. Camundongos Swiss machos pré-tratados ou não pela injeção intraescretal de 50 μ L do anticorpo neutralizador anti-ST2 (ST2/IL-1 R4) a 5 μ g/animal por 30 min, ou de Wortmannin a 0,005 μ M (*specifically inhibits phosphatidylinositol 3-kinase* – Sigma, W1628) ou do peptídeo inibidor de MyD88 a 0,5 mg/kg (tlrl-pimyd - 09J27-MT, Imgenex), ambos por 1 h. Após esse período os camundongos foram anestesiados para a exposição do músculo cremaster e foram aplicados topicamente na microcirculação com 30 μ L do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300 μ g/mL. Os animais foram mantidos por 30 min para a observação do rolamento (A) e da aderência (B) de leucócitos nas vênulas pós-capilares. As barras representam a média de 5 animais por grupo acrescidas do desvio-padrão. # $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle e * $p < 0,05$ em relação ao grupo-veneno.

Todos os tratamentos demonstrados na figura 6 provocaram a redução do número de leucócitos rolantes, chegando a valores próximos dos observados para o grupo controle, com exceção para o inibidor de ERK 1/2, que alcançou valores ainda inferiores. Os leucócitos aderidos (Figura 6B) também sofreram alteração em seu quantitativo após estes tratamentos, mas quando o tratamento foi realizado com os inibidores de PI3K, ou ERK 1/2, ou p38 MAP Quinase, os valores obtidos foram próximos a zero, similar ao observado para o grupo controle.

3.3 Recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*

Para fornecer mais evidências sobre o quadro inflamatório induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, avaliamos o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal em camundongos Swiss machos tratados ou não pela injeção intraperitoneal de 200 µL do veneno a 300 µg/mL. O tráfico de neutrófilos para dentro da cavidade peritoneal foi determinada após duas ou quatro horas e um, três, cinco e sete dias da administração do veneno. Os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta do exudato e obtenção da suspensão celular, que foi processada para contagem total de leucócitos e diferencial celular. Os resultados mostraram que o veneno promoveu o desenvolvimento de um quadro inflamatório agudo, causado pela intensa proliferação celular, por até sete dias após a administração do veneno (Figura 7A). O aumento da migração celular foi observado já com duas horas, sendo mais expressivo um dia após a injeção do veneno, nos períodos subsequentes iniciou-se a redução do quantitativo destas células na cavidade peritoneal, mantendo-se ainda em quantitativo significativo em relação ao grupo controle, com sete dias.

Os resultados na figura 7B demonstraram a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, diferenciados em neutrófilos e macrófagos, induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*. O número de macrófagos na cavidade peritoneal permaneceu quase que constante em todos os períodos observados. No entanto, nos períodos entre duas horas e um dia ocorreu um aumento expressivo de neutrófilos, com significativa neutrofilia no primeiro dia e declínio de migração nos demais períodos analisados (72, 120 e 168 horas). Para fornecer mais evidências do recrutamento de células inflamatórias *in vivo*, a figura 7C convenientemente confirma o aumento do número de neutrófilos nos três primeiros períodos analisados, com neutrofilia máxima no período de um dia após a administração do veneno. O neutrófilo é uma célula específica do quadro inflamatório, portanto a neutrofilia

máxima em 24 horas destaca-se como um fator importante nesse experimento, para análises posterior. Na figura 8 estão apresentadas as imagens das extensões preparadas com o exudato obtido da cavidade peritoneal dos camundongos.

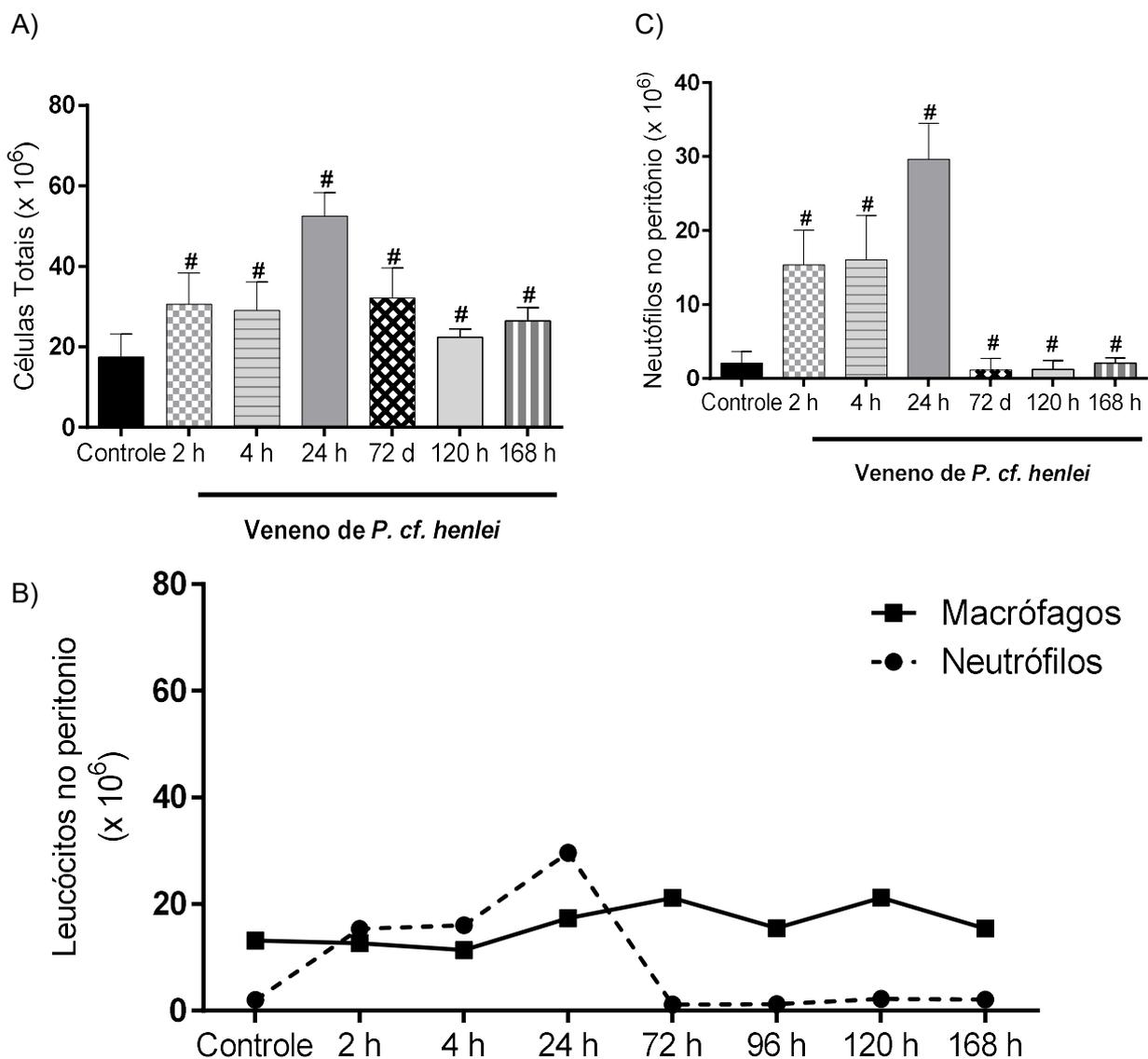


Figura 7. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal. Camundongos Swiss machos foram tratados pela injeção intraperitoneal de 200 μ L do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300 μ g/mL. Após por 2, 4, 24, 72, 120 e 168 horas da injeção, os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta do exudato e obtenção da suspensão celular que foi processada para contagem total de leucócitos por Turk (A), diferencial (B) e neutrófilos (C) em lamina coradas com hematoxilina e eosina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle.

3.4 O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz a produção de KC na cavidade peritoneal

A produção de citocinas inflamatórias, como KC e IL-33, pelas células do compartimento peritoneal parecem fornecer os estímulos necessários para formação e manutenção do processo inflamatório. Para confirmar essa informação, quantificou-se o nível de KC no sobrenadante de cultura de células esplênicas, no lavado da cavidade peritoneal em camundongos Swiss, induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*. A figura 9 demonstra a elevada produção de KC no período de duas horas, aumento dessa produção em quatro horas e severo declínio nos períodos de 24 e 72 horas.

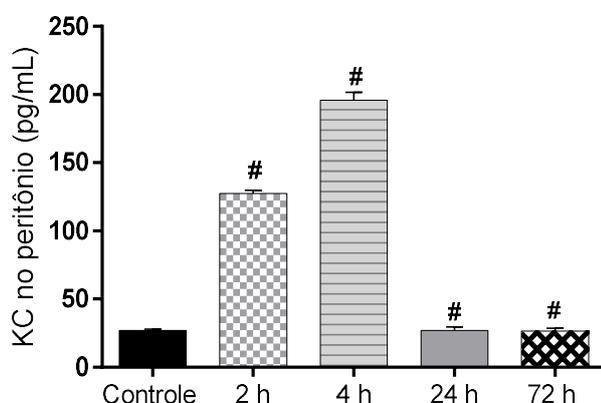


Figura 9. O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* induz a produção de IL-33 e KC na cavidade peritoneal. Camundongos Swiss machos foram tratados pela injeção intraperitoneal de 200 μ L do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300 μ g/mL. Após por 2, 4, 24 e 72 horas da injeção, os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta do exudato e obtenção do sobrenadante de cultura de células esplênicas que foi determinado por ELISA sanduíche. Microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h com anticorpos monoclonais específicos para a quimiocina. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Curvas-padrão utilizando concentrações conhecidas da quimiocina recombinante foram realizadas para quantificação das amostras. O limite de detecção para KC foi de 15,6 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média das concentrações das amostras de cada grupo acrescida do desvio-padrão. # $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle

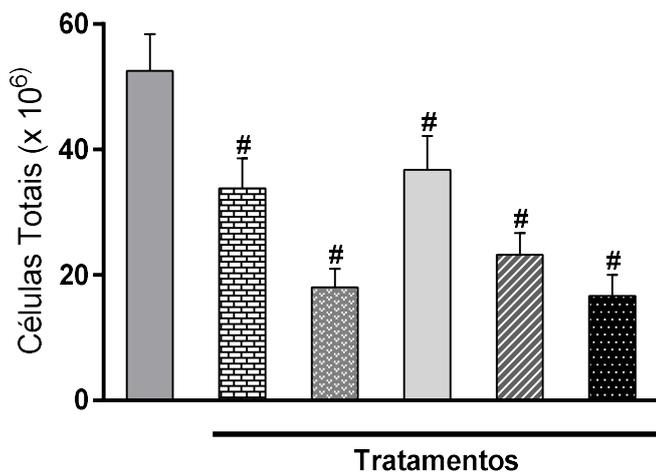
3.5 Os tratamentos alteram o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*

A partir da determinação do período de neutrofilia máxima (um dia) induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* foi verificado se os tratamentos com o inibidor do receptor de IL-33, ou com peptídeos inibidores de MyD88, ou os inibidores específicos de cada quinase (ERK, JNK e P38) poderiam alterar o recrutamento de leucócitos.

Os resultados apresentados na figura 10A mostraram que o rolamento e migração de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal de camundongos dependem de sinais derivados da ligação de IL-33 ao receptor ST2; da participação da sinalização de MyD88 e das quinases ERK, JNK e P38, pois estes foram capazes de inibir o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, principalmente com relação aos neutrófilos.

A contagem diferencial em macrófagos e neutrófilos está demonstrada na figura 10B e fornece evidências que confirmam a inibição significativa de leucócitos, no recrutamento de células *in vivo*, induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* em camundongos Swiss submetidos a tratamento com uso e inibidores de IL-33, ou MyD88 e ou das quinases ERK, JNK e P38. O tráfego de neutrófilos para dentro da cavidade peritoneal foi expressivo para o grupo de camundongos controle (não tratado com inibidores), enquanto que, nos grupos tratados com os inibidores este sofreu redução. Para os macrófagos, com exceção do inibidor PI3K, os demais interferiram na migração destas células para a cavidade peritoneal.

A)



B)

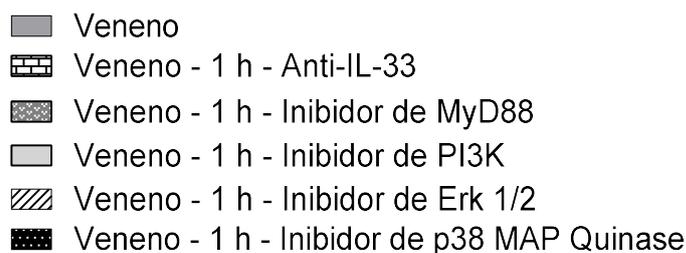
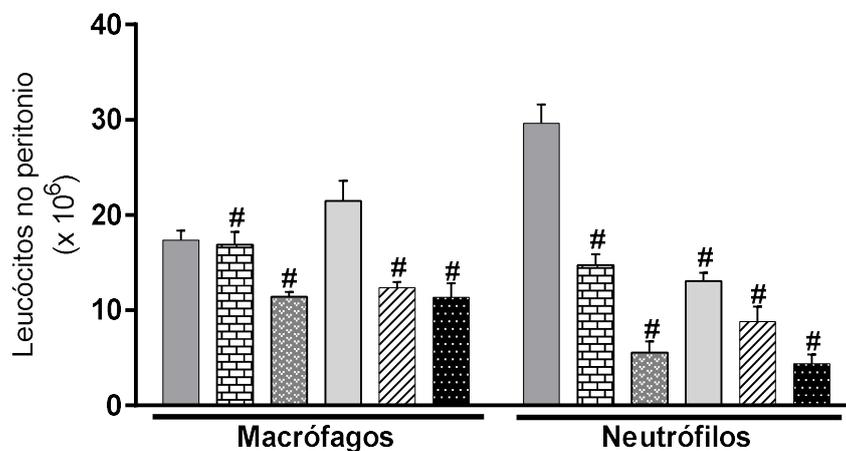


Figura 10. Os tratamentos alteram o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei*. Camundongos Swiss machos foram imunizados pela injeção intraperitoneal de 200 μ L do veneno de *Potamotrygon cf. henlei* a 300 μ g/mL. Após 1h, os animais foram tratados pela injeção subcutânea com anticorpo neutralizador anti-ST2 (ST2/IL-1 R4) a 5 μ g/animal, ou de Wortmannin a 0,005 μ M (*specifically inhibits phosphatidylinositol 3-kinase* – Sigma, W1628) ou do peptídeo inibidor de MyD88 a 0,5 mg/kg (tlrl-pimyd - 09J27-MT, Imgenex), ou de SP9059 a 2 μ M (*selective inhibitor of MAP kinase kinase 2'-Amino-3'-methoxyflavone* – InvivoGen, PHZ1164), ou de SB203580 a 0,05 μ M (*selective inhibitor of p38 MAPK 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazole* – InvivoGen, PHZ1253). Depois, os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada para coleta do exudato e obtenção da suspensão celular que foi processada para contagem total de leucócitos por Turk (A) e diferencial (B) em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As barras representam a média de 4-7 animais por grupo acrescidas do desvio-padrão. # $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle e * $p < 0,05$ em relação ao grupo-veneno.

4. DISCUSSÃO

O veneno de *Potamotrygon cf. henlei* possui potencial pró-inflamatório, revelado pelo edema intenso e dor, desencadeado nos acidentes envolvendo estas arraias. A atividade pró-inflamatória é confirmada pela microscopia intravital, com a aplicação tópica do veneno na microcirculação de murinos, causando aumento expressivo do rolamento de leucócitos (SANTOS *et al.*, 2012), efeito este relacionado a liberação local de mediadores vasoativos, citocinas e quimiocinas. Estas podem regular e aumentar a expressão de moléculas que favorecem a adesão dos leucócitos no endotélio (NAGATA *et al.*, 2001).

Neste estudo foi explorada a hipótese de que as células estruturais, tais como células endoteliais, liberem IL-33 sobre a lesão causada pelo veneno da arraia *Potamotrygon cf. henlei* e que os mastócitos adjacentes reajam produzindo fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-6, TNF- α e leucócitos. Subsequentemente, esses sinais podem induzir alterações vasculares, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade microvascular e recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos para o local da lesão.

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após dano celular causado por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas (ABBAS, 2012). No caso dos acidentes causados por arraias destacam-se dois aspectos importantes, cujos efeitos costumam atuar em conjunto: o trauma provocado pela penetração do ferrão e a inoculação da toxina, que é facilitada pela lesão (HADDAD JR., *et al.* 2004). Estudos como o de Barbaro *et al.* (2007) e Magalhães *et al.* (2006), também destacam variações de toxicidade do veneno, entre espécies de arraias de água doce e marinhas, apontando diferenças na atividade edematogênica e nociceptiva deste.

Verificamos em nosso estudo que o veneno de *Potamotrygon cf. henlei*, em todas as concentrações testadas, promoveu o desenvolvimento de um quadro inflamatório agudo, causado pela intensa proliferação celular, com alto e constante recrutamento de neutrófilos, célula específica do mecanismo inflamatório. A padronização de 300 $\mu\text{g/mL}$ como concentração ideal para os ensaios se deu pelo elevado recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos.

A reação inflamatória aguda caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais estão o aumento do fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual (ABBAS, 2012). Os acidentes com arraias

causam ferimentos com diversos sintomas como dor intensa, inflamações, necrose cutânea, ulcerações (ANTONIAZZI *et al.*, 2011; COOK *et al.*, 2006; CLARK *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008), complicações sistêmicas (HADDAD JR., *et al.*, 2004; FORRESTER, 2005) e ainda distúrbios na microcirculação (BARBARO *et al.*, 2007).

Santos *et al.*, (2011) mostraram que os extratos de muco de ferrão e do dorso, assim como o veneno de *Potamotrygon cf. henlei* foram capazes de induzir dor e edema. Este estudo também mostrou que ambos os extratos induziram o influxo de infiltrados inflamatórios quando testados em modelo murino. A exsudação celular, também conhecida com atividade edematogênica ou edema, é caracterizado por fenômenos celulares onde eritrócitos e leucócitos migram para o endotélio, mediados pela ação de quimiotaxia (ABBAS, 2012). Foi observado em nossos resultados que a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal ocorreu gradualmente nos períodos de duas a quatro horas e um dia, havendo o declínio gradual em períodos posteriores. Porém, a atividade edematogênica demonstrada no trabalho de Santos *et al.* (2011), mostrou-se mais significativamente elevada nos períodos de 30 min, 2 e 4 horas nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL de veneno. Estudos com outras espécies de peixes como *Potamotrygon cf. scobina*, *Potamotrygon gr. orbigny*, *Thalassophryne natterire*, *Synanceja horrida* são conhecidas por induzir experimentalmente intensa atividade edematogênica e inflamatória (MAGALHÃES *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2003; KHOO *et al.*, 1992; POH *et al.*, 1991;).

A resposta inflamatória inclui a participação de diferentes tipos celulares de leucócitos, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras. O aumento na adesão de leucócitos sinaliza para um endotélio inflamado e disfuncional (ULBRICH *et al.*, 2003). Durante a infecção, a quimiotaxia é um importante evento para o recrutamento de células para o sitio de inflamação. As primeiras células a chegar ao parênquima lesado são os neutrófilos e, subsequentemente, os macrófagos teciduais (ABBAS, 2012; RIEDEMANN *et al.* 2003; VILLA & GHEZZI, 2004).

Os fenômenos de rolamento e aderência dos leucócitos às células endoteliais ocorrem especificamente em vênulas pós-capilares, após o estímulo de mediadores inflamatórios com a super-expressão de moléculas de adesão e ativação celular no local da injúria. Assim, os leucócitos alcançam o foco da lesão onde, através da liberação de substâncias pró - e anti-inflamatórias e das atividades fagocíticas e microbicidas regulam o processo, retornando a homeostasia. No presente trabalho, verificamos que o veneno de *Potamotrygon cf. henlei* foi capaz de modular o rolamento e a aderência de leucócitos em vênulas pós-capilares de camundongos com expressivos números em relação ao grupo controle, confirmando o quadro inflamatório estabelecido. O recrutamento de leucócitos é

um processo importante na resposta imune inata aos processos inflamatórios e envolvem a ação de moléculas de adesão e mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas (SADIK *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2006). Estes mediadores podem regular positivamente a expressão de moléculas de adesão, favorecendo a mobilização de leucócitos. A família das selectinas está associada com a fase inicial de o recrutamento de leucócitos, caracterizado pelo rolamento destas células (LEY, 1996).

Recentemente, foi descrito que as células necróticas ativam especificamente células mastro através da liberação de IL-33, constituindo um “alarmin”, assim os mastócitos reagem através da liberação de mediadores pró-inflamatórios que subsequentemente iniciam uma resposta inflamatória (ENOKSSON *et al.*, 2011). Embora o papel da citocina IL-33 no sistema imunológico ainda não seja totalmente compreendida, esta citocina tem sido implicada em vários processos inflamatórios agudos e crônicos, por intermédio de sinalização ST2 (ANDERSON *et al.*, 2012). A inibição do rolamento, da aderência de leucócitos e da migração destes para a cavidade peritoneal induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* foi constatada em nossos ensaios quando os camundongos foram tratados com o anticorpo neutralizador de IL-33, ou com o anticorpo neutralizador de MyD88, ou com o anticorpo neutralizador de ERK, ou com o anticorpo neutralizador de JNK, ou com o anticorpo neutralizador de P38. Fato este que indica que a inflamação induzida pelo veneno depende de sinais derivados da ligação de IL-33 ao receptor ST2. Assim como depende de sinais derivados da ligação de MyD88 e das quinases ERK, JNK e P38 aos seus receptores. Através desse experimento podemos supor que os mastocitos reconhecem a IL-33, através do receptor ST2, que inicia os mecanismos de sinalização dependente de MyD88, resultando na ativação e na subsequente transcrição de genes pró-inflamatórios.

A liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores em conjunto inicia uma resposta inflamatória em cascata, por exemplo, com os neutrófilos, resultando em recrutamento, ativação e migração destes, favorecendo a inflamação. Em nossos ensaios avaliamos a produção de uma importante quimiocina pelas células do compartimento peritoneal, KC, responsável em fornecer estímulos para formação e manutenção do processo inflamatório. Observamos que nos períodos de 2 e 4 horas existe uma alta e progressiva produção de KC nos camundongos induzidos pelo veneno, enquanto que nos períodos de 24 e 72 horas ocorre o declínio da produção de KC. Entre as quimiocinas, a responsável por guiar os neutrófilos até o local de inflamação é a KC, também conhecida como IL-8 em humanos (LAING & SECOMBS, 2004; MIYAZAKI *et al.*, 2013). Essa quimiocina é da família CXC e é capaz de induzir a liberação de lisossomos, desencadeando a explosão respiratória, através de sua baixa afinidade com CXCR1 e

alta afinidade com CXCR2 expressos na membrana de neutrófilos. A capacidade de atração dos neutrófilos pela quimiocina KC pode ser atribuída pela presença do motivo Glu-Leu-Arg, adjacente ao motivo CXC na sua extremidade N-terminal, o local de ligação com seu respectivo receptor (LAING *et al.*, 2002). Dessa forma podemos crer que a produção de KC no processo inflamatório induzido pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* influencia diretamente o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, pois os períodos de maior produção de KC, 2 e 4 horas, levarão ao período de maior recrutamento de neutrófilos que ocorre em 24 horas. A vista disto, pode-se supor que recrutamento de neutrófilos induzido pelo veneno é mediado por uma cascata temporal de quimiocinas.

Com a ligação de KC aos seus receptores estes serão ativados e ocorrerá uma modificação da conformação da proteína G, induzindo a troca de uma molécula de GDP (difosfato de guanosina) por GTP (trifosfato de guanosina), no sítio catalítico que ativará a fosfolipase C (PLC), uma enzima que irá agir sobre o substrato PIP₂, dissociando-o e formando DAG e IP₃. Assim haverá a transmissão de sinais intracelulares que resultarão na degranulação, na explosão respiratória e quimiotaxia dos neutrófilos, que irão chegar ao sítio inflamatório. Porém, o receptor pode interagir com a GRK2 para mediar e regular as funções celulares dos neutrófilos. A GRK vai fosforilar o receptor, que ao ser fosforilado irá se ligar a β -arrestina para promover a dessensibilização do receptor. Após, o receptor será internalizado em uma vesícula que poderá ser degradado ou reciclado voltando para membrana celular e podendo novamente ser ativado (LAPPANO & MAGGIOLINI, 2011; MIYAZAKI *et al.*, 2013). Com o receptor ativado haverá a ativação de PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase) que resulta a geração de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) a partir do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) induzindo o recrutamento e fosforilação de proteínas quinases como AKT, MAPK, JNK e ERK que consequentemente ativarão fatores transcrição como NF-KB (nuclear factor gene binding), HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) e AP-1 (activated protein-1), que irão transcrever proteínas que favorece a inflamação (BROWN *et al.*, 2011).

Desse modo, os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram significativo recrutamento de leucócitos, caracterizando um processo inflamatório causado pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* em camundongos Swiss machos. Isso foi confirmado com a inibição desse recrutamento pelo anticorpo neutralizador do receptor de IL-33, ou com peptídeos inibidores de MyD88, ou os inibidores específicos das quinases ERK, JNK e P38. Este resultado pode ser explicado pela possível relação entre o recrutamento de leucócitos e a IL-33, através do receptor ST2, que inicia os mecanismos de sinalização dependente de MyD88, resultando na ativação e a subsequente transcrição de genes pró-

inflamatórios, no qual a liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores em conjunto inicia uma resposta inflamatória em cascata, favorecendo a inflamação.

Atualmente as cascatas temporais e espaciais de diversas quimiocinas foram identificadas por coordenar o recrutamento de neutrófilos em modelos de ratos com inflamação local aguda (SADIK *et al.*, 2011). Estes achados sugerem que as quimiocinas têm função única *in vivo*. A cascata de quimiocinas parece ser necessária para guiar o caminho migratório complexo de neutrófilos da medula óssea para o sangue, a partir do sangue para o tecido, e, em seguida, uma vez no tecido, orientar neutrófilos para o local exato do foco inflamatório. O envolvimento de várias quimiocinas, atuando em diferentes pontos do percurso migratório, fornece um mecanismo para controlar o recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Estas cascatas também oferecem vários pontos para intervir terapêuticamente na atenuação do recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Se uma quimicina ou receptor específico não está disponível no momento e lugar apropriados, a cascata chega a um impasse e os neutrófilos da inflamação entram em colapso. Os modelos animais sugerem que a cascata é mais vulnerável à inibição em seus estágios iniciais, do que em fases posteriores da inflamação, e o recrutamento de neutrófilos torna-se reforçado por múltiplas vias sobrepostas.

Portanto, pesquisas futuras devem ter por objetivo definir as quimiocinas em cascatas que impulsionam a reação inflamatória específica induzida pelo veneno de *Potamotrygon cf. henlei* e procurar identificar os mediadores que iniciam o processo. Acreditamos que o direcionamento desses pontos iniciais em vias das quimiocinas específicas poderão proporcionar a descoberta de terapias eficazes para um importante problema de saúde pública das populações afetadas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7.º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 5-88, 2012.

ANDERSON, L. C.; ENOKSSON, M.; NILSON, G. Mast cells respond to cell injury the recognition of IL-33. **Frontiers in Immunology**, n. 82, 1-9, 2012.

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**, n. 57, p. 297-303, 2011.

BARBARO, K.C.; LIRA M.S.; MALTA M.B.; SOARES S.L.; GARRONE NETO D; CARDOSO J.L.; SANTORO M.L.; HADDAD JUNIOR V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, n. 50, p. 676–687, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, J.; WANG, H.; HAJISHENGALLIS, G.N.; MARTIN, M. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases and Cross-talk. **Journal Of Dental Research**, v. 90, p. 417-427, 2011.

CARVALHO, M. R. As espécies de água doce da família Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes). **Division of Paleontology, American Museum of Natural History**, 2004.

CARVALHO, M. R.; LOVEROY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxia**, n. 2776, p. 13-48, 2011.

CLARK, R. F.; GIRARD, R. H.; RAO, D.; LY, B. T.; DAVIS, D. P. Stingray envenomation: a retrospective review of clinical presentation and treatment in 119 cases. **The Journal of Emergency Medicine**, n. 33, p. 33-37, 2007.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; LIMA, C. A. H.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; FERREIRA, M. L. Orpotrin: a novel vasoconstrictorpeptide from this venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. orbigny. **Peptides**, n. 27, p. 3039–3046, 2006.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; 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.

COOK A.D.; BRAINE E.L.; HAMILTON J.A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **Journal of Immunology**, n.171, p. 4816-4823, 2003.

- COOK, M. D.; MATTEUCCI, M. J.; LALL, R.; LY, B. T.; Stingray envenomation. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 3, p. 345-347, 2006.
- DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. *THALASSOPHRYNE*; FRANZOLIN, T. M. P.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J. L.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**, v. 58, n. 2, p. 147-153, 2011.
- ENOKSSON M.; LYBERG K.; MOLLER-WESTERBERG C.; FALLON P. G.; NILSSON G.; LUNDERIUS-ANDERSSON C. Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. **Journal of Immunology**, n. 186, p. 2523–2528, 2011.
- FORRESTER, M. B. Pattern of stingray injuries reported to Texas poison centers from 1998 to 2004. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, n. 12, p. 639-642, 2005.
- FOSTER, S.L.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. **Journal of Clinical Immunology**, n. 130, p. 7-15, 2009.
- GARCIA-LEME, J. M. D. (Editor). **Hormones and Inflammation**. Florida: CRC Press, p. 165, 1989.
- GARRONE, D. N.; CORDEIRO, R.C.; HADDAD, J.V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, TO, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 21, p. 795-803, 2005.
- GAVINS, F. N. E.; CHATTERJEE, B. E. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, n. 49, p. 1-14, 2004.
- HADDAD JR., V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 591-597, 2003.
- HADDAD JR., V.; GARRONE, D. N.; NETO, P. 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**, n. 48, p. 287-294, 2004.
- 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. 287-294, 2004.
- HALSTEAD, B. W. Current status of marine biotoxicology-na overview. **Toxicon**, n. 18, p.1-24, 1981.
- KHOO, H.E.; YUEN, R.; POH, C.H.; TAN, C.H. Biological activities of *Synanceja horrida* (stonefish) venom. **Natural Toxins**, n. 1, p. 54–60, 1992.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS E CONTRAN. **Patologia – bases patológicas das Doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49-79, 2005.
- LAING, K. J.; E C. J. SECOMBES. Chemokines. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 28, p. 443-460, 2004.

- LAING, K. J.; ZOU, J. J.; WANG, T.; BOLS, N.; HIRONO, I.; AOKI, T. SECOMBES, C. J. Identification and analysis of a interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental and Comparative Immunology**, n. 26, p. 433-444, 2002.
- LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F.; SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. Arraias de água doce (Chondrichthyes Potamotrygonidae): biologia, veneno e acidentes. **Scientia Amazonia**, v. 2, p. 11-27, 2013.
- LAPPANO, R.; MAGGIOLINI, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. 10, p. 47–60, 2011.
- LEY, K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. **Cardiovascular Research**, n. 32, p. 733–742, 1996.
- LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, n. 10, p. 103-110, 2010.
- LIMA, C.; BIANCA P. C.; PIRAN, A. A. S.; TANJONI, I.; MOURA, A. M. S.; LOPES, M. F. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model of tissue injury. **Toxicon**, n. 42, p. 499–507, 2003.
- MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN, A. A. S.; MARQUES, E. E.; HIRUMA, C. A. L.; LOPES, M. F. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. **Toxicon**, n. 47, p. 575–583, 2006.
- MAGALHÃES, M. R.; SILVA, 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.
- MILLER, A. H. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of inflammation**, p. 8-22, 2011.
- MIYAZAKI, K.; ABE, Y.; IWANARI, H.; SUZUKI, Y.; KIKUCHI, T.; ITO, T.; KATO, J.; KUSANO-ARAI, O.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, S.; IKESHIMA-KATAOKA, H.; TSUJI, S.; ARIMITSU, T.; KATO, Y.; SAKIHAMA, T.; TOYAMA, Y.; FUJIHARA, K.; HAMAKUBO, T.; YASUI, M. Establishment of monoclonal antibodies against the extracellular domain that block binding of NMO-IgG to AQP4. **Journal of Neuroimmunology**, v. 260, p. 107–116, 2013.
- NAGATA, K.; FUGIMIVA, M.; SUGIURA, H.; UEHARA, M. Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. **Histochem**, v. 33, p. 559–568, 2001.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, n. 420, p. 846-52, 2002.
- PARDAL, P. P. O. **Acidentes por peixes**. 1º edição, 1997.
- PARDAL, P. P. O. **Aspectos clínicos e epidemiológicos dos acidentes por arraias nos distritos de Mosqueiro e Outeiro, Belém-Pará-Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2002.

POH, C.H.; YUEN, R.; KHOO, H.E.; CHUNG, M.; GWEE, M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Purification and partial characterization of stonustoxin (lethal factor) from *Synanceja horrida* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 99, p. 793–808, 1991.

POUGH, H. F.; JANIS, M. C.; HEISER B. J. **A vida dos vertebrados**. 4° Ed. São Paulo. Atheneu Editora, 2008.

RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 460-467, 2003.

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

RUSSELL, F. E. Venom Poisoning. **Rational drug therapy**, v. 5, n. 8, p. 1-7, 1971.

SADIK, D. C.; KIM, D. N.; LUSTER, D. A. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunology**, n. 32, p. 460-452, 2011.

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

SANTOS, J. M. **Avaliação do grau de toxicidade da peçonha em relação ao tamanho e ao sexo da arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* caracterizado pelo conhecimento popular e científico**. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências do Ambiente. Universidade Federal do Tocantins. Palmas – TO, 2012.

SEIBERT, C. S. **Núcleo de Estudos Ambientais (NEAMB), Coleção de peixes da Fundação Universidade Federal do Tocantins**. Foto 12,80x7,20. 2010.

SILVA A. G. C. **Morfometria e ecologia de *Potamotrygon motoro* (Natterer in Muller & Henle, 1841) e *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da planície de inundação do alto ro Paraná, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2006.

THORSON, T. B.; WOOTON, R. M.; GEORGI, T. D. Rectal gland of freshwater stingray, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: potamotrygonidae). **Biological Bulletin**, v. 154, p. 508-516, 1978.

ULBRICH, H.; ERIKSSON, E.E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, n. 24, p. 640–700, 2003.

VILLA, P.; GHEZZI, P. Animal models of endotoxic shock. **Methods in molecular medicin**, n. 98, p.199-206, 2004.

ANEXOS



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45407-1	Data da Emissão: 17/10/2014 14:20	Data para Revalidação*: 16/11/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: Estudo das atividades biológicas da peçonha de aranhas de água doce (Potamotrigonideos)	
Nome da Instituição : FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	preparo dos extratos	10/2014	12/2014
2	levantamento bibliográfico	10/2014	12/2016
3	coleta das aranhas	10/2014	10/2014
4	caracterização das proteínas do veneno e muco	01/2015	02/2015
5	ensaios biológicos	03/2015	07/2015
6	coleta das aranhas	08/2015	10/2015
7	preparo dos extratos	08/2015	10/2015
8	purificação das proteínas	11/2015	06/2016
9	ensaio de biodistribuição do veneno	07/2016	10/2016
10	produção de material científico	09/2016	12/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	NANCI DO NASCIMENTO	ensaios de biodistribuição, bioquímicos e biológicos	041.946.198-11	RG 12477048-4 SSP-SP	Brasileira
2	Janaína Cardoso dos Santos	Coleta e processamento do material	998.481.471-87	464903 SSP-TO	Brasileira
3	GABRIELA ORTEGA COELHO THOMAZI	coleta, purificação das proteínas e biodistribuição	001.761.971-84	421804 SSP-TO	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82554383





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45407-1	Data da Emissão: 17/10/2014 14:20	Data para Revalidação*: 16/11/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: Estudo das atividades biológicas da peçonha de aranhas de água doce (Potamostrigonídeos)	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

4	Raquel da Silva Aires	Coleta e análises bioquímicas e biológicas	889.206.821-00	3558012 SSP-TO	Brasileira
5	Juliane Monteiro dos Santos	coleta e preparo do extrato	003.913.631-07	329684 SSP-TO	Brasileira
6	THOMPSON DE OLIVEIRA TURIBIO	coleta, purificação das proteínas	884.785.211-00	617419 sspto-TO	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		TO	Recursos hídricos da Bacia tocantins - Araguaia e afluentes	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Potamostrigonidae
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Potamostrigonidae (*Qtde: 30)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Outras amostras biológicas(material removido do ferrao e muco do dorso do animal)
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Espindel de fundo, Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal do Tocantins	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82554383



Página 2/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45407-1	Data da Emissão: 17/10/2014 14:20	Data para Revalidação*: 16/11/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: Estudo das atividades biológicas da peçonha de aranhas de água doce (Potamotrigonideos)	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82554383



Página 3/3



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN**

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Potamotrygonidae: a influência do ambiente nas assembléias de arraias de água doce e um estudo de suas peçonhas” protocolo nº 1370/15, sob responsabilidade de Mônica Lopes Ferreira e Janaina Cardoso dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/2/2015.

We certify that the research entitled “Potamotrygonidae: the influence of the environment inHE INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT IN freshwater stingrays OF MEETINGS AND A STUDY OF THEIR TOXINS, protocol nº 1370/15, under the responsibility of Mônica Lopes Ferreira and Janaina Cardoso dos Santos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 19/02/2015.

Vigência do Projeto: 02/2015 – 02/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada	130 camundongos Swiss Machos

São Paulo, 19 de agosto de 2015