



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba*

Gabriela Ortega Coelho Thomazi

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

Orientadora:

Profa. Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo

2016

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

Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba*

Gabriela Ortega Coelho Thomazi

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

**Orientadora:
Profa. Dra. Nanci do Nascimento**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

Para Isabel e Norton, com amor

Agradecimentos

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora pela coragem, força e proteção para que eu pudesse superar todos os obstáculos e poder celebrar mais uma vitória.

Um agradecimento especial à Prof.^a Dr.^a Nanci do Nascimento. Sou muito grata pela confiança e disposição, mesmo com todos os contras de uma orientação à distância, pela paciência e alegria. Obrigada por me proporcionar a grande chance de fazer o doutoramento e por todas as possibilidades de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Heitor F. de Andrade Jr., pelos ensinamentos constantes, por todas as contribuições ao trabalho e pela oportunidade da realização dos ensaios no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Patrick J. Spencer, por todo o conhecimento transmitido, por toda a colaboração no decorrer do trabalho e pelas sugestões na Qualificação.

Ao Prof. Dr. Bertolin, minha gratidão por todas as oportunidades e reconhecimento.

Ao convênio Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos Porto (ITPAC/Porto) e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial, ao Fernando Moreira e Prof. Dr. André Senna.

À Universidade Federal do Tocantins pela possibilidade da realização do doutorado mediante a autorização do afastamento para estudos. Em especial, à Mariana Silva, Saulo Rômulo e Prof. Dr. Aurélio Picanço.

Às Prof.^a Dr.^a Carla S. Seibert e Dr.^a Elineide E. Marques, pelas ideias originais para o desenvolvimento do trabalho e por todo o apoio na UFT. Ao Prof. Dr. Paulo Lucinda e ao técnico Emerson, pela concessão da licença ambiental e auxílio no Laboratório de Ictiologia Sistemática da UFT. Ao Prof. Dr. Gilvan e à técnica de laboratório Izabel, pelo apoio no Laboratório de Bioquímica da UFT.

À Juliane M. dos Santos e Janaina C. dos Santos, sou muito grata por todos os ensinamentos para a coleta e armazenamento do material para estudo.

Ao Zé pescador, pelo importante trabalho de captura das raias.

À Prof.^a Dra. Mônica L. Ferreira, pela colaboração e sugestões na Qualificação.

Ao Dr. Rui Seabra, Airton L. Jr. (*in memoriam*) e Luciana C. de Barros, pela colaboração no processamento das amostras no CEVAP/Unesp/Botucatu.

À toda a equipe do Biotério do IPEN, em especial à Neide Mascarenhas, por sempre estar disposta a ajudar e por sempre me receber tão bem.

Agradeço muito à Glaucie J. Alves, por todo o conhecimento transmitido e pela ajuda valiosa durante as imunizações, coletas, ensaios e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Andrés J. Galisteo Jr. e Dra. Janaína B. Alves, pelas sugestões no Seminário de Área, em especial pela realização da citometria.

Andrea da Costa e Jaqueline P. Rodrigues, gratidão é a palavra que resume o que sinto por vocês! Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, boa vontade, por todo o apoio para a realização dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Marcela Di Giacomo e Tamara M. Fucase, minhas manas do coração, o carinho e a atenção de vocês foram muito importantes durante essa jornada. Sou muito grata por tudo.

Ao Podé, pela ajuda nos ensaios de atividade edematogênica e contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio F. Souza, pelas contribuições no Seminário de Área, pelos ensinamentos e auxílio nos ensaios.

À Fernanda M. Galluzzi e Prof. Dra. Andrea Cecília D. Rodas, pelos ensinamentos e realização dos ensaios de viabilidade celular.

Ao grupo "Raia, Anexo e Vetor": André, Raquel, Thompson e Bruna. Juntos fomos mais fortes. Obrigada pela amizade! Em especial ao André e Thompson por não medirem esforços em ajudar.

Larissa Silvestre, obrigada por estar presente nos momentos mais difíceis, desde a primeira ida à SP, pela parceria durante as disciplinas, por sempre me ouvir e apoiar, por todas as palavras de incentivo e carinho durante toda essa trajetória.

Renata e Edmilson, obrigada por me aturarem! A amizade e apoio de vocês foram muito importantes.

Meus amigos, amados e necessários, Carol, Elson, Lizia, Isamar, Kendi. Amo todos vocês!

À família Thomazi, Clair, Carmelinda, Clairton, Milena, Tompson, Janaina, Wilson, Natascha, pelo carinho e, principalmente, por todo o apoio à Isabel nos meus momentos de ausência. Camila e Júnior, obrigada pela ajuda nas coletas. Meus sobrinhos queridos do coração, Manuela, Heitor, Lorenzo, Guilherme, Miguel e Lucas, obrigada por trazerem tanta alegria à nossa família!

Aos meus pais, João e Lígia, por sempre me incentivarem, me apoiarem e, sobretudo, pelo amor.

Aos meus irmãos, Verônica e Arthur, obrigada por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos de desabafo e descontração.

Amo vocês!

Resposta imunológica em modelos animais imunizados contra o muco nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co da raia de água doce *Paratrygon aiereba*

Gabriela Ortega Coelho Thomazi

RESUMO

As raias são peixes peçonhentos e estão frequentemente associadas a acidentes em seres humanos, principalmente na região Norte do Brasil, favorecidos pelo hábito desses peixes de permanecerem no fundo de águas rasas e pela contínua utilização humana dos rios. Os ferrões das raias causam lesões dolorosas, edema, necrose, e o muco que recobre toda a extensão do corpo desses peixes pode aumentar a gravidade desses ferimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imunológica induzida pelo muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co em modelos animais. Foram realizados ensaios imunoenzimáticos e *Western blotting* para verificar a resposta humoral e reatividade cruzada dos soros provenientes de camundongos *Swiss* e coelhos *New Zealand* previamente imunizados contra o veneno, muco nativo ou irradiado. A indução da produção de anticorpos *in vitro*, as subclasses de IgG e a quantificação de citocinas foram analisados. Além de realizados ensaios de soroneutralização da atividade edematogênica *in vitro* e *in vivo* e de viabilidade celular. Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância. O protocolo de imunização possibilitou a obtenção de soros com títulos satisfatórios de anticorpos policlonais. O muco e veneno de *P. aiereba* são imunogênicos e apresentam reatividade antigênica. O muco nativo ou irradiado induziu a produção de anticorpos IgG e esses reconheceram antígenos presentes no muco de outras espécies de raias. Células esplênicas de animais imunizados contra o muco irradiado produziram IFN- γ , TNF- α e IL-10 e também foi observada a produção sérica de TNF- α (grupo imunizado contra o muco irradiado) e de IL-6 e IL-17 (grupo imunizado contra o muco nativo). O soro anti-muco irradiado reduziu a atividade edematogênica *in vitro*, ao contrário da *in vivo* que não foi neutralizada. Os resultados corroboram o uso da radiação ionizante, com produção de anticorpos altamente responsivos e melhor resposta imune, além de comprovar que o muco de *Paratrygon aiereba* foi capaz de estimular resposta imune adaptativa celular e humoral.

Humoral response of animal models immunized against native or ⁶⁰Co irradiated mucus from the freshwater stingray *Paratrygon aiereba*

Gabriela Ortega Coelho Thomazi

ABSTRACT

Freshwater stingrays are venomous animals, frequently associated with accidents in northern Brazil where the shallow waters and the human use of the rivers favour close proximity between the fish and potential victims. Ray stings induce painful lesions, edema, necrosis, and the mucus that covers the body of these fishes may increase the severity of the wounds. The aim of this work was to evaluate the immune response induced by native or ⁶⁰Co *Paratrygon aiereba* mucus in animal models. Enzyme linked immunosorbent assays and western blots were performed to compare humoral immune response as well as cross reactivity using antibodies raised in mice or rabbits against venom or mucus, the latter either in its native or irradiated form. Antibody production *in vitro*, immunoglobulins subclasses and cytokines production were evaluated. Immunization resulted in good levels of antibodies. Interestingly, both the mucus and the venom share many cross reactive components. Furthermore, antibodies raised against native mucus or its irradiated counterpart were cross-reactive against the mucus of other stingray species. Splenic cells from mice immunized with irradiated mucus secreted IFN- γ , TNF- α and IL-10. The serum raised against irradiated mucus reduced edematogenic activity *in vitro*, but not *in vivo*, when the venom and the serum are injected separately. Our results corroborate the potential of ionizing radiation as a detoxifying agent for immunogens, with production of high antibody titers and, that the highly abundant mucus of freshwater stingrays contains basically the same repertoire of antigens as the venom, inducing the synthesis of high levels of neutralizing antibodies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Raias de água doce	13
1.2 Estado do Tocantins.....	16
1.3 Ictismo por potamotrigonídeos	18
1.4 Aspectos clínicos e tratamento dos agravos por potamotrigonídeos	21
1.5 Epidemiologia dos acidentes por raias.....	23
1.6 Estudos com o muco e o veneno de potamotrigonídeos	26
1.7 Caracterização da resposta imunológica no envenenamento por potamotrigonídeos	29
1.8 Radiação gama e irradiação de venenos	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 Geral	34
2.2 Específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Escolha das raias para estudo.....	35
3.2. Coleta das raias e processamento das amostras.....	35
3.3. Animais de laboratório	37
3.4. Irradiação das amostras	37
3.5. Imunização dos animais: indução de resposta imune específica	37
3.5.1. Primeira etapa da imunização: produção de anticorpos contra o muco e o veneno nativos de <i>Paratrygon aiereba</i>	38
3.5.2. Segunda etapa da imunização: produção de anticorpos contra o muco de <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co	38
3.6. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-<i>Paratrygon aiereba</i>	39
3.7. Análise da especificidade dos anticorpos por <i>Western blotting</i>	41
3.8. Cultura de células esplênicas de camundongos.....	42
3.9. Ensaio de proliferação de células B: indução da produção de anticorpos <i>in vitro</i>	42
3.10. Detecção de citocinas por citometria.....	43
3.11. Avaliação da citotoxicidade do muco de <i>Paratrygon aiereba</i>	44

3.12. Soroneutralização <i>in vitro</i> da atividade edematogênica	44
3.13. Soroneutralização <i>in vivo</i> da atividade edematogênica.....	45
3.14. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Resposta humoral contra a peçonha de <i>Paratrygon aiereba</i>	47
4.1.1. Produção sérica de IgG contra o muco e o veneno de <i>Paratrygon aiereba</i>	47
4.1.2. Reatividade antigênica cruzada.....	49
4.2. Resposta imune humoral contra o muco de <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado com raios gama de ⁶⁰Co	50
4.2.1. Produção de anticorpos por camundongos <i>Swiss</i>	51
4.2.2. Produção de anticorpos por coelhos	52
4.2.3. Investigação das subclasses de IgG	54
4.2.4. Reatividade antigênica cruzada contra o muco de diferentes espécies de raias de água doce.....	55
4.2.5. Indução da produção de anticorpos <i>in vitro</i> (IVIAP).....	59
4.2.6. Indução de citocinas pelo muco nativo ou irradiado de <i>Paratrygon aiereba</i>	60
4.3. Avaliação da citotoxicidade do muco de <i>Paratrygon aiereba</i>	63
4.4. Avaliação da capacidade neutralizante dos soros anti-muco da raia em estudo contra a atividade edematogênica induzida.....	64
4.4.1. Soroneutralização do edema <i>in vitro</i>	64
4.4.2. Soroneutralização do edema <i>in vivo</i>	65
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – A - Raia <i>Paratrygon aiereba</i> . B – Detalhe da cauda curta e com dois ferrões.	14
Figura 02 – A – Raias do gênero <i>Potamotrygon</i> coletadas no Reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, Porto Nacional/TO. B – Detalhe da cauda de <i>Potamotrygon</i> sp. com dois ferrões.....	14
Figura 03 – A - Raia <i>Heliotrygon</i> sp. B - Raia <i>Plesiotrygon</i> sp.....	15
Figura 04 – Raias <i>Paratrygon aiereba</i> camufladas na areia do rio.	16
Figura 05 – A – Exposição dos bancos de areia que dão origem às praias e ilhas fluviais na estiagem. B – Praia da Ilha, Caseara/TO.	17
Figura 06 – Tela de proteção delimitando a área de banho na Praia do Prata, Palmas/TO.....	18
Figura 07 – Mecanismo de defesa das raias contra predadores ou pisões acidentais.	19
Figura 08 – Ferrão retrosserrilhado bilateralmente de uma raia do gênero <i>Potamotrygon</i>	20
Figura 09 – Evolução do acidente por raia de água doce.....	22
Figura 10 – Pontos de coletas das raias nos municípios de Palmas e Porto Nacional/TO.	36
Figura 11 – Fotos das raias utilizadas para a realização do trabalho.	36
Figura 12 - Detecção de IgG sérica total (1:200) por ELISA e comparação entre a reatividade dos soros a diferentes concentrações de antígeno (5, 10 e 20 µg/mL).	48
Figura 13 – Detecção de IgG total sérica (1:200) por ELISA em camundongos <i>Swiss</i> (n=12) imunizados após 4 doses contra o muco ou veneno de <i>Paratrygon aiereba</i> e reatividade antigênica cruzada entre muco e veneno.....	49
Figura 14 – Avaliação da reatividade antigênica cruzada entre o muco e o veneno de <i>Paratrygon aiereba</i> por <i>Western blotting</i> com o emprego de soros de camundongos <i>Swiss</i> imunizados ativamente após a 3.º dose de muco ou veneno de <i>Paratrygon aiereba</i>	50
Figura 15 – Títulos séricos de IgG total em camundongos <i>Swiss</i> (n=20) imunizados contra o muco de <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por raios gama de ⁶⁰ Co.	52
Figura 16 – Títulos de IgG total anti-muco em coelhos imunizados contra o muco de <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co.	54

Figura 17 – Determinação sérica (1:200) das subclasses de IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b) em camundongos <i>Swiss</i> imunizados contra a 4. ^a dose de muco de <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co.....	55
Figura 18 – Reatividade antigênica cruzada entre o muco de diferentes espécies de raias de água doce contra o soro anti-muco nativo ou irradiado de <i>Paratrygon aiereba</i>	57
Figura 19 – Avaliação da reatividade antigênica entre o soro de camundongo anti-muco de <i>Paratrygon aiereba</i> contra os mucos de <i>Potamotrygon henlei</i> e <i>Potamotrygon orbigny</i> por WB.	58
Figura 20 – Avaliação da reatividade antigênica entre o soro de coelhos anti-muco <i>Paratrygon aiereba</i> contra os mucos de <i>Potamotrygon henlei</i> e <i>Potamotrygon orbigny</i> por WB.	58
Figura 21 – Produção <i>in vitro</i> de anticorpos IgG por linfócitos esplênicos de camundongos <i>Swiss</i> frente ao muco de <i>Paratrygon aiereba</i>	59
Figura 22 – Expressão de citocinas (pg/mL) por células esplênicas de camundongos <i>Swiss</i> imunizados contra o muco nativo (n=3) ou irradiado (n=3) de <i>Paratrygon aiereba</i>	61
Figura 23 – Expressão sérica de citocinas (pg/mL) de camundongos <i>Swiss</i> imunizados contra o muco nativo (n=10) ou irradiado (n=10) de <i>Paratrygon aiereba</i>	62
Figura 24 – Viabilidade celular (%) a diferentes concentrações do muco de <i>Paratrygon aiereba</i>	63
Figura 25 – Comparação da soroneutralização <i>in vitro</i> da atividade edematogênica induzida em camundongos <i>Swiss</i> (n=25) pelo muco (50µg) de <i>Paratrygon aiereba</i> incubado previamente com o soro anti-muco nativo ou irradiado produzido por coelhos.	65
Figura 26 – Soroneutralização <i>in vivo</i> do edema.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Relação das massas moleculares das proteínas do veneno e muco de raias <i>Potamotrygonidae</i> e de atividade proteolítica e hialuronidásica..	28
Tabela 02 - Esquema da 1. ^a etapa de imunização para determinação da imunogenicidade do muco e veneno de <i>Paratrygon aiereba</i> em camundongos... ..	38
Tabela 03 - Esquema da 2. ^a etapa de imunização para determinação da imunogenicidade do muco nativo ou irradiado	39
Tabela 04 – Títulos de IgG total sérica anti-muco nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co de <i>Paratrygon aiereba</i> em camundongos <i>Swiss</i>	51
Tabela 05 - Títulos de IgG total sérica anti-muco <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co em coelhos <i>New Zealand</i> em relação ao controle negativo.	53
Tabela 06 - Títulos de IgG total detectados nos soros anti-muco <i>Paratrygon aiereba</i> nativo ou irradiado por ⁶⁰ Co em diferentes modelos experimentais frente ao muco de duas espécies de raias de água doce.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

^{60}Co – Cobalto 60

ANOVA - Análise de variância

APC – Célula apresentadora de antígeno

ATCC - *American Type Cell Collection*

CBA - *Cytometric Bead Array*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CO₂ – Gás carbônico

CTR – Centro de Tecnologia das Radiações

Da –Dalton

DC – Célula dendrítica

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

DO - densidade óptica

e^-_{aqu} - Elétron aquoso

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Fig. – Figura

g - (RFC) *Relative centrifugal force*

Gy –Grays

H• - Átomos de hidrogênio

H₂ - Hidrogênios moleculares

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HO₂ - Peroxila

IFN- γ - Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G tipo 1

IgG2a - Imunoglobulina G tipo 2a

IgG2b – Imunoglobulina G tipo 2b

IL-1 – Interleucina1

IL-10 - Interleucina-10

IL-17A - Interleucina-17A

IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IVIAP - *In vitro Induced Antibody Production*

KC – Família de quimiocinas com homologia à interleucina-8 humana

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos

MTS – Composto tetrazólio

nm – nanômetros

Nº - número

°C – Graus Celsius

OH• - Hidroxila

PBS – Salina tamponada com fosfato

PBS-T-L - Salina tamponada com fosfato, Tween e leite desnatado

PMS - Fenazina metossulfato

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SDS - *Sodium Dodecil Sulfate*

SDS-Page – *Sodium Dodecil Sulfate Poliacrilamida Gel Eletroforese*

SFB – Soro Fetal Bovino

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

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN - Sistema Nacional de Notificação e Agravos

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

Tab. – Tabela

Th1 – células T auxiliaadoras tipo 1

Th17 – células T auxiliaadoras tipo 17

Th2 – células T auxiliaadoras tipo 2

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

TO – Tocantins.

Tris – (hydroxymethyl) aminomethane

UFT – Universidade Federal do Tocantins

v/v – volume por volume

WB – *Western blotting*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Raias de água doce

As raias dulcícolas apresentam distribuição geográfica endêmica nos principais sistemas fluviais da América do Sul. No Brasil, são encontradas nas bacias Amazônica, Tocantins-Araguaia, Paraguai-Paraná e Parnaíba (Garrone Neto et al., 2007; Moro; Rosa; Charvet-Almeida, 2010; Carvalho; Lovejoy, 2011).

Esses peixes peçonhentos pertencem à família *Potamotrygonidae*, classe *Chondrichthyes*, subclasse *Elasmobranchii*, ordem *Myliobatiformes*, compreendendo quatro gêneros: *Paratrygon*, *Potamotrygon*, *Heliotrygon* e *Plesiotrygon* (Carvalho; Lovejoy, 2011).

O corpo das raias é achatado dorsiventralmente, com nadadeiras peitorais e a cabeça incorporada ao disco. A boca e as fendas branquiais estão localizadas na parte ventral, os dentes são pavimentosos, além de olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça na parte dorsal. Apresenta reprodução com mecanismos sofisticados, fertilização interna com cópula, os machos utilizam as nadadeiras pélvicas (cláspes) para introduzir o esperma na fêmea. São vivíparas aplacentárias, a maturidade sexual é tardia, a gestação é demorada, com baixa fecundidade e os adultos tem expectativa de vida longa (Rosa, 1985).

O gênero *Paratrygon* é considerado monoespecífico até o momento, contudo estudos indicam que esse grupo pode compreender um complexo de espécies. Análises filogenéticas indicam que é o gênero mais basal e seus exemplares estão entre os maiores representantes da família *Potamotrygonidae*. Sua cauda é filiforme (tipo chicote), comprida e bem fina nos exemplares juvenis, e geralmente não se encontra completa em exemplares adultos (Fig. 01). O ferrão serrilhado é de tamanho reduzido em relação às outras raias dulcícolas e localizado próximo à base da cauda e o disco de formato oval. Possui distribuição geográfica nas bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia (Carvalho; Lovejoy; Rosa, 2003; Charvet-Almeida; Almeida, 2008; Carvalho; Lovejoy, 2011; Frederico et al., 2012).

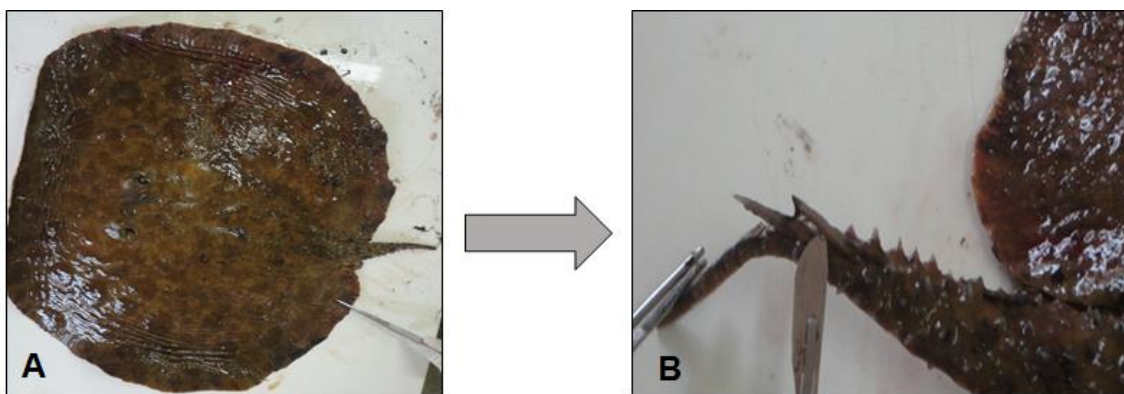


Figura 01 – A - Raia *Paratrygon aiereba*. B – Detalhe da cauda curta e com dois ferrões. Fonte: Gabriela Ortega Coelho Thomazi (arquivo pessoal).

As raias *Potamotrygon* compreendem em torno de 20 espécies, apresentam cauda moderadamente robusta e curta, geralmente menor que o comprimento do disco, com ferrões serrilhados mais desenvolvidos, localizados na porção mediodistal e disco de formato oval (Fig. 02). São encontradas nas principais bacias hidrográficas brasileiras, como a Amazônica, Tocantins-Araguaia, Paraná-Paraguai e rios da região nordeste (Silva, 2009; Garrone Neto; Haddad Jr., 2010; Carvalho; Lovejoy, 2011).

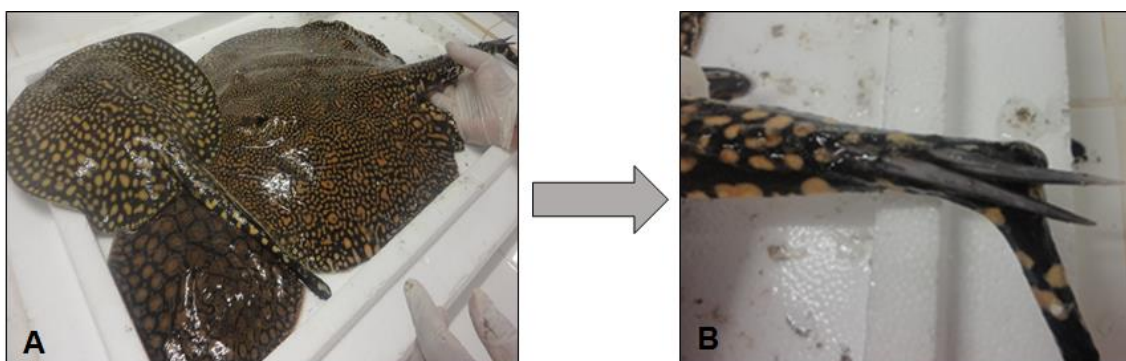


Figura 02 – A – Raias do gênero *Potamotrygon* coletadas no Reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, Porto Nacional/TO. B – Detalhe da cauda de *Potamotrygon* sp. com dois ferrões. Foto: Gabriela Ortega Coelho Thomazi (arquivo pessoal).

O gênero *Heliotrygon* compreende duas espécies, apresenta disco com formato circular, ferrão pequeno desprovido de serrilhas, localizado próximo à base da cauda (Fig. 03A). É encontrado apenas na bacia do Rio Amazonas

assim como o gênero *Plesiotrygon*. Este último apresenta cauda mais longa que o comprimento do disco, com o ferrão serrilhado desenvolvido próximo à base da cauda, disco com formato oval e também abrange duas espécies (Fig. 03B) (Carvalho; Ragno, 2011).

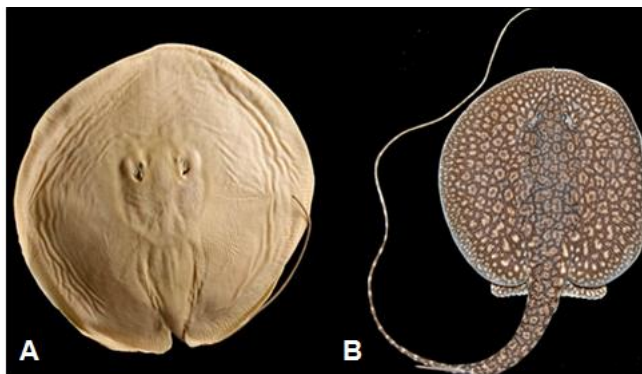


Figura 03 – A - Raia *Heliotrygon* sp. B - Raia *Plesiotrygon* sp. (Fonte: Carvalho, Lovejoy, 2011; Carvalho, Ragno, 2011).

Os únicos elasmobrânquios adaptados para viverem exclusivamente em ambientes de água doce são *Potamotrygonidae* (Araújo et al., 2004). São animais bentônicos e como estratégia alimentar, devido ao posicionamento inferior (ventral) da boca das raias, são normalmente encontrados em repouso no fundo arenoso ou lamacento dos rios, onde se alimentam de insetos, moluscos, crustáceos, anelídeos e peixes (Barbarino, Lasso, 2005; Almeida et al., 2010).

Devido a estes hábitos é grande a possibilidade de acidentes, que ocorrem quando os humanos, acidentalmente, pisam na parte dorsal destes animais, que utilizam a cauda para se defender. Habitualmente as raias não são animais agressivos, provocando acidentes apenas quando são pisoteadas ou manejadas inapropriadamente, como estratégia de defesa (Haddad Jr. et al., 2004).

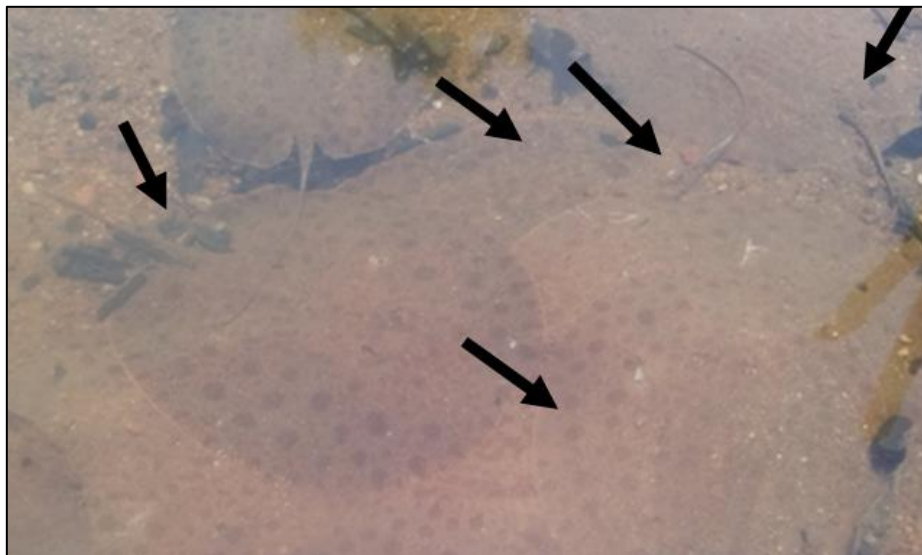


Figura 04 – Raias *Paratrygon aiereba* camufladas na areia do rio. Local: Ribeirão do Carmo, Porto Nacional/TO. Foto: Gabriela Ortega Coelho Thomazi (arquivo pessoal).

1.2 Estado do Tocantins

O estado do Tocantins pertencente à região Norte do Brasil foi criado em 1988, a partir do desmembramento do estado de Goiás (Nascimento, 2009). Localiza-se numa região de grande importância ecológica, abrigando a bacia hidrográfica Tocantins- Araguaia e representando uma área de transição entre três dos maiores biomas brasileiros: Amazônico, Cerrado e Caatinga (Silva, 2007).

Os principais rios do estado do Tocantins pertencem à maior bacia hidrográfica localizada inteiramente em território brasileiro, a Tocantins-Araguaia. No período de estiagem (de junho a setembro), ocorre redução no volume de água nos rios dessa bacia, formando extensos bancos de areia, onde destaca-se o turismo nas praias e ilhas fluviais (Fig. 05) (Brasil, 2009).

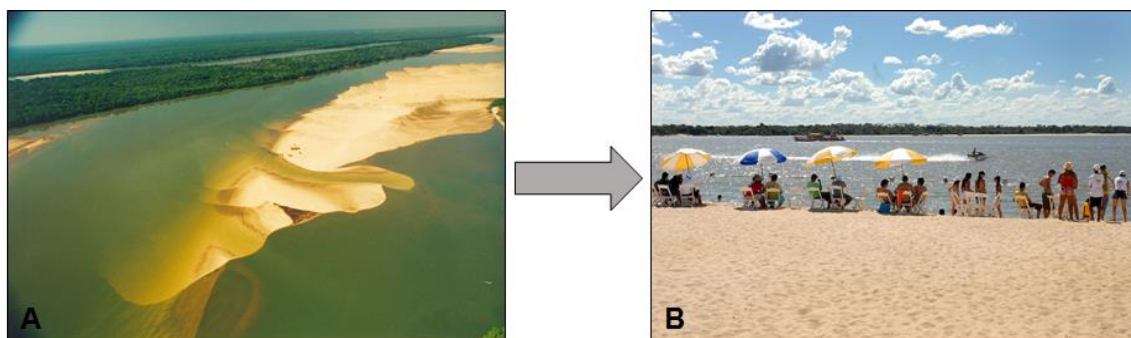


Figura 05 – A – Exposição dos bancos de areia que dão origem às praias e ilhas fluviais na estiagem. B – Praia da Ilha, Caseara/TO. Fonte: <http://turismo.to.gov.br/regioes-turisticas/praias-e-lagos-do-cantao/principais-atrativos/caseara/>

As praias de água doce às margens dos rios Tocantins, Araguaia e de seus afluentes, assim como as ilhas, ocorrem em diversos municípios do Estado do Tocantins, atraindo turistas de diversas partes do Brasil (Souza, 1999).

Além disso, alguns municípios banhados pelo reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães (Lajeado) localizado no Rio Tocantins, como a capital Palmas e o município de Porto Nacional, contam com praias e ilhas de água doce permanentes (Investco, 2005).

Dessa forma, além das atividades de lazer, como a pesca esportiva, esportes náuticos e ecoturismo, esses rios e seus afluentes estão ligados a atividades socioeconômicas, onde comunidades tradicionais como ribeirinhos e povos indígenas sobrevivem a partir da pesca de subsistência ou profissional, e também através do comércio relacionado ao turismo (Brasil, 2009; Monteiro-dos-Santos et al., 2014).

Entre os peixes que compõem a ictiofauna tocantinense, as raias merecem destaque por estarem frequentemente associadas a acidentes em seres humanos. Esses agravos são favorecidos pela frequente utilização dos rios, seja por lazer ou por atividades ocupacionais. Especificamente no estado do Tocantins, a frequência desses agravos é alta e muitas vezes subnotificada (Monteiro-dos-Santos et al., 2014; Silva Jr. et al., 2015; Tocantins, 2015).

Com o intuito de reduzir a possibilidade da interação entre banhistas e peixes peçonhentos e/ou traumatizantes como as raias e piranhas, foram instaladas telas de proteção nas praias e ilhas permanentes do município

de Palmas, isolando a área específica para o banho. Iniciativas similares têm sido empregadas para evitar o contato de humanos com tubarões (Allen, 2001).



Figura 06 – Tela de proteção delimitando a área de banho na Praia do Prata, Palmas/TO.
Fonte: Fernando Alves/Prefeitura de Palmas.

1.3 Ictismo por potamotrigonídeos

Os acidentes provocados por peixes, tanto fluviais quanto marinhos, são denominados de ictismo. Estes acidentes podem ser classificados como acidentes sarcotóxico, acantotóxico e vulnerante, sendo o primeiro provocado pela ingestão de toxinas presentes em órgãos ou tecidos (baiacu), o segundo por ferroadas (raias) e o último através de dentes, rostros, acúleos ou ferrões não toxíferos (piranha) (Lima; Ferreira, 2000; Saúde, 2001)

As raias da família *Potamotrygonidae*, também denominadas potamotrigonídeos, possuem de um a quatro ferrões ósseos, geralmente de formato retrosserrilhado, localizados na cauda e posicionados de forma que a resposta defensiva destes animais é eficaz quando há um estímulo necessário, como no caso de uma pisada inadvertida. Nesses casos, as raias desferem ferroadas, que resultam na penetração do aguilhão no corpo da vítima (Fig. 07) (Garrone Neto; Haddad Jr., 2010).

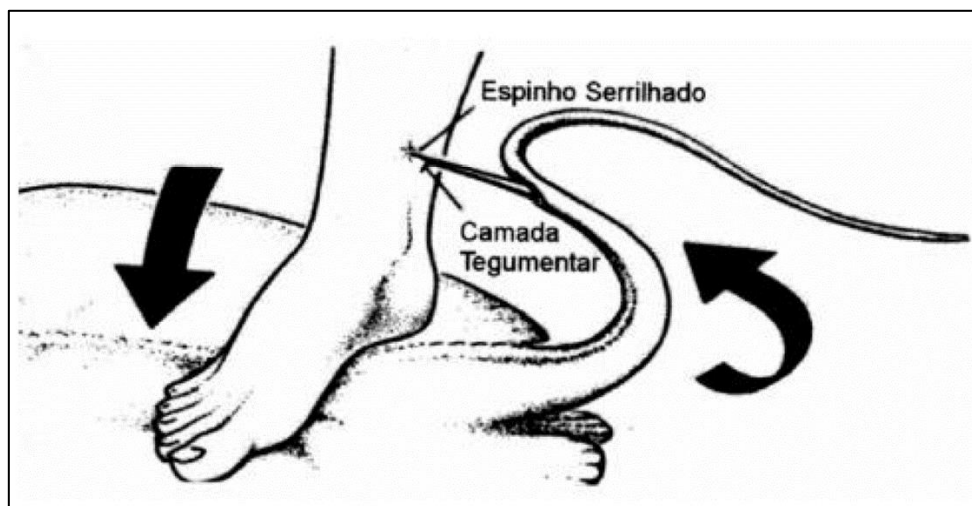


Figura 07 – Mecanismo de defesa das raias contra predadores ou pisões acidentais. O ferrão se eleva e fica em posição oblíqua em relação à cauda para dar “chicotadas” que resultam na penetração do ferrão. Fonte: Oliveira, 2015 *apud* Fenner et al., 1988.

Os ferrões apresentam estrutura rígida derivada de denticulos dérmicos e são recobertos por um epitélio, que possui grandes quantidades de células glandulares produtoras de toxina e muco, cuja composição e mecanismo de ação ainda não foram totalmente elucidados (Haddad et al., 2004).

A produção de toxinas por parte das raias, assim como em outros animais, é uma estratégia de defesa que pode ajudar na sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo (Zhao et al., 2008).

Outro aspecto importante é a ausência de um aparelho de ductos para injetar o veneno, sugerindo a inoculação da peçonha pelo rompimento de células glandulares (Halstead; Bunker, 1953).

Além do veneno, as células epidérmicas das raias produzem muco espesso, que recobre todo o corpo do animal, inclusive o ferrão, sendo que este muco também apresenta atividade tóxica (Weiss; Wolfenden, 2001; Magalhães et al., 2006; Klesius et al., 2008; Zhao et al., 2008; Monteiro-dos-Santos et al., 2011).

Na descrição histológica do ferrão de raias *Potamotrygon* (*P. falkneri*, *P. orbignyi* e *P. leopoldi*) foi identificado um grande número de células especializadas localizadas ventro-lateralmente nos sulcos do ferrão e células glandulares voltadas para o exterior na epiderme do dorso e ferrão (Pedroso et al., 2007). Essas células glandulares são responsáveis pela camada de muco que recobre a superfície de peixes (Elliot, 2011).

A superfície epidérmica dos peixes é recoberta por secreção mucosa e faz contato direto com o seu ambiente, constituindo uma barreira natural, física e bioquímica, por conter toxinas e compostos líticos que impedem a incrustação de organismos ou predadores, impedindo a colonização de microrganismos e parasitas (Elliot, 2011). Desempenha papel importante na regulação iônica e osmótica, alimentação, reprodução, lubrificante na locomoção, reconhecimento de indivíduos, formação de cardumes e migração de determinadas espécies (Bavington et al., 2004; Bragadeeswaran et al., 2011; Benhamed et al., 2014).

Recentemente foi publicado o resultado da análise transcriptômica do conteúdo ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *P. motoro*, afirmando que o metabolismo do ferrão está envolvido na produção de toxinas, corroborando com a sintomatologia típica de acidentes causados por essas espécies (Oliveira Jr. et al., 2016).

As características do ferrão favorecem o ferimento, pois além de penetrar na pele da vítima com grande facilidade por ser pontiagudo, a bainha que o recobre é danificada durante a irrupção deste, expondo as células glandulares da peçonha. Quando o ferrão é retirado da vítima, o ferimento se amplia pelo fato do ferrão ser retroserrilhado, o que leva à maior laceração dos tecidos, facilitando a absorção de toxinas e ocasionando sintomas e sinais nas vítimas (Fig. 08) (Halstead, 1966; 1970; Church; Hodgson, 2002).



Figura 08 – Ferrão retroserrilhado bilateralmente de uma raia do gênero *Potamotrygon*. Foto: Gabriela Ortega Coelho Thomazi (arquivo pessoal).

Como o ferrão é recoberto por muco e este possivelmente é composto por um número de componentes imunogênicos, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, acredita-se que a presença de um ou vários desses compostos podem aumentar a gravidade dos ferimentos causados pelos ferrões de raias de

água doce (Conceição et al., 2006; Magalhães et al., 2006; Monteiro-dos-Santos et al., 2011).

1.4 Aspectos clínicos e tratamento dos agravos por potamotrigonídeos

Os acidentes com raias raramente são fatais, mas sempre são dolorosos. A dor aparece imediatamente após a ferroadada, inicialmente no local do ferimento e depois se estende por todo o membro acidentado. É descrita como dor intensa e desproporcional ao tamanho da lesão (Halstead, 1970; Garrone Neto, Haddad Jr., 2010; Lameiras et al., 2013), podendo persistir por mais de 48 horas (Sadhasivam et al., 2013; Silva Jr. et al., 2015) e pouco aliviada com morfina (Chahl, Kirk, 1975).

As manifestações mais precoces além da dor, são o edema e eritema (Silva Jr. et al., 2015). Febre, frio, sudorese, náuseas, vômito, agitação e taquicardia são alguns efeitos sistêmicos manifestados nas vítimas. Como agravante, o ferrão pode se fragmentar ou soltar durante o acidente, provocando a retenção do mesmo na lesão (Garrone Neto, Haddad Jr., 2010; Haddad Jr., 2003).

São também associadas a estas lesões: necrose, vasculite, ulcerações com cicatrização demorada, contraturas musculares induzidas pela dor e infecções secundárias (Sadhasivam et al., 2013; Fino et al., 2015; Torrez et al., 2015; Silva Jr. et al., 2015).

As infecções secundárias frequentemente observadas após as injúrias por raias podem ser causadas tanto por microrganismos encontrados no ambiente onde o animal se encontra (água ou solo) como no próprio animal. E a extensão da infecção pode ser determinada pela quantidade de microrganismos inoculados durante o acidente, sua patogenicidade, tempo decorrido entre o acidente e o suporte médico, e o tratamento empregado (Domingos et al., 2011; Torrez et al., 2015).

Domingos et al. (2011) observaram que o muco de *Potamotrygon motoro* e a água do rio de onde ela foi coletada, transportam bactérias potencialmente patogênicas e multirresistentes, que podem causar infecção secundária severa em feridas adquiridas nestes agravos.

Lesões letais ocorrem raramente, exceto quando o ferrão atinge órgãos vitais ou em decorrência de complicações (Meyer, 1997; Haddad Jr., 2003).

Torrez et al. (2015), descreveram casos de tétano e necrose local após ferroadada por raia, sendo que um dos casos desenvolveu sepse severa, evoluindo para choque séptico e morte. Em ambos casos, a procura pelo atendimento médico foi tardia (mais de uma semana) e a história vacinal desconhecida. Silva Jr. e equipe (2015) relataram um acidente com *Potamotrygon motoro* ocorrido no estado do Tocantins, em que o paciente apresentou dor intensa persistente (mesmo com o emprego de diferentes esquemas analgésicos), edema, necrose, vasculite, infecção, mesmo com intervenções terapêuticas e suporte médico (Fig. 09).



Figura 09 – Evolução do acidente por raia de água doce. A- Edema, vasculite, hiperemia (3h); B – Agravamento edema (24h); C – Equimose/edema (48h); D – Agravamento equimose (7 dias); E, F – Necrose (9 dias); G – Substituição tecido necrótico; H, I – Trauma aberto (30 dias); J, K – Recuperação do tecido (70 dias); L – Sensibilidade ao toque, dificuldade de calçar sapato (após 220 dias). Fonte: Silva Jr. et al. (2015).

A abordagem terapêutica nos casos de acidentes por raias é baseada na extensão e caráter da lesão e nos sintomas clínicos manifestados, em que são

empregados analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos (Garrone Neto; Haddad Jr., 2009).

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

Também é recomendada a imersão do membro afetado em água quente para o controle da dor. Além de limpeza intensa da ferida, uso de anestésicos locais, profilaxia para o tétano, radiografia de tecidos moles para descartar a possibilidade de retenção de partes do ferrão e debridamento de áreas necróticas (Atkinson et al., 2006; Torrez et al., 2015).

Um fato comum às vítimas destes acidentes é a não procura por suporte médico ou a demora em procurar atendimento, seja pelo fato de estarem localizadas em áreas distantes dos estabelecimentos de saúde ou por utilizarem a medicina popular como primeira opção terapêutica. Na maioria desses casos, após o surgimento de complicações locais, como necrose e infecções secundárias é que os acidentados procuram os serviços de saúde (Monteiro-dos-Santos et al., 2014; Torrez et al., 2015; Monteiros et al., 2016).

1.5 Epidemiologia dos acidentes por raias

A epidemiologia dos agravos por peixes peçonhentos no Brasil é pouco relatada, apesar da elevada morbidade e relevância para a saúde (Haddad Jr. et al., 2004; Sá-Oliveira, Costa, Pena, 2011; Monteiro-dos-Santos et al., 2014; Gualberto, Mendonça, Santos, 2016).

Segundo a Portaria n.º 1.271/14 do Ministério da Saúde, o acidente com animal peçonhento é de notificação compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional (Brasil, 2014).

Este tipo de agravo deve ser informado ao Sistema Nacional de Notificação e Agravos (SINAN) via preenchimento da ficha de notificação de acidentes por animais peçonhentos (Brasil, 2007). Sobre esta ficha, merece destaque o fato de que não há um campo específico para acidentes provocados por peixes, sendo de responsabilidade do profissional de saúde a especificação do acidente por

raia no campo “Outros”. No entanto, são contemplados com campos específicos os agravos por: serpente, aranha, escorpião, abelha e lagarta.

Os agravos por animais peçonhentos também podem ser registrados via SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), SIH-SUS (Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde) e o SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade). Contudo, o SINAN é o único sistema nacional que possui um módulo específico para tratar de agravo com animal peçonhento (Bochner; Struchiner, 2002).

Os acidentes são frequentes na região Norte do país e há notícias de acidentes por raias de água doce na região sudeste do país (Garrone Neto et al., 2007; Sá-Oliveira, Costa, Pena, 2011; Haddad Jr. et al., 2012).

Pelo fato desses agravos não receberem a mesma atenção dispensada para os casos de ofidismo e de outros animais peçonhentos, Gualberto et al. (2016) criaram um Sistema de Notificação de Acidentes por Arraias no Estado do Amazonas, que poderá subsidiar estudos epidemiológicos, pesquisas sobre os tipos de ocorrência e gravidade de acidentes por estes peixes.

Trabalhos sobre os acidentes com potamotrigonídeos são encontrados na literatura. Schiera (2002) e Haddad Jr. (2004) relataram casos de acidentes em aquaristas. Haddad Jr. et al. (2003) verificaram 25 lesões ocasionadas por raias no Estado do Tocantins entre os anos de 2000 a 2003. A equipe de Garrone Neto (2005) apontou acidentes de trabalho com raias entre pescadores no município de Araguacema/TO. Em 2010, Garrone Neto e Haddad Jr. relataram acidentes não notificados em banhistas e pescadores na região Sudeste do país. Sá-Oliveira e seu grupo (2011) investigaram 22 vítimas de acidentes no Amapá. Em 2014, Santos e colaboradores entrevistaram 25 acidentados nos municípios de Formoso do Araguaia e Porto Nacional/TO. Passos et al. (2016) analisaram prontuários de pacientes acidentados por raias entre janeiro de 2002 a julho de 2015, em que foram atendidos 45 casos no Hospital Público de Porto Nacional/TO. Em 2016, Monteiro e colaboradores relataram um caso de amputação do hálux após infecção bacteriana e necrose decorrentes de lesão causada por ferroadada de raia de água doce em Rondônia.

Na maioria dos casos as vítimas são do gênero masculino, pescadores ou banhistas. Os membros inferiores são os mais afetados e o principal sintoma associado ao acidente é a dor de grande intensidade após a ferroadada e edema

(Haddad Jr. et al, 2003; Garrone Neto, Haddad Jr., 2010; Sá-Oliveira, Costa, Pena, 2011; Monteiro-dos-Santos et al., 2014; Passos et al., 2016).

Apesar da dificuldade da identificação do animal causador do acidente por parte do acidentado, a maioria dos trabalhos cita o gênero *Potamotrygon* como o mais relacionado a estes agravos (Magalhães et al., 2006; Conceição et al., 2009; Haddad Jr., Cardoso e Garrone Neto, 2013; Silva Jr. et al., 2015). O que pode ser explicado pela distribuição geográfica mais ampla destes animais (Carvalho; Lovejoy, 2011) e pelo fato do ferrão ser mais robusto (Haddad Jr.; Cardoso; Garrone Neto, 2013).

Documentação detalhada dos casos de acidentes é precária, pois acredita-se que sejam subnotificados nos programas de epidemiologia das unidades municipais do país. Estes pontos são importantes, uma vez que contribuem para a falta de conhecimento sobre o assunto e corroboram a falta de justificativa estatística para a produção do soro, embora os acidentes sejam incapacitantes e potencialmente fatais (Bochner; Struchiner, 2002; Garrone Neto; Haddad Jr., 2010; Sá-Oliveira, Costa, Pena, 2011).

Conforme destaca Garrone Neto e Haddad Jr. (2010):

[...] não existe uma justificativa estatística para a produção do soro, devido ao pequeno número reportado de casos. Deve-se ter em mente, porém, que a discussão sobre a produção ou não do soro se torna mais válida quando se observa os sintomas de uma vítima recentemente ferroadada por uma arraia e quando os dados obtidos por notificação são praticamente inexistentes.

Mesmo com reconhecida importância médica, constata-se escassez de dados em vários aspectos sobre este animal, como a epidemiologia dos acidentes, a composição e mecanismo de ação de suas toxinas, tampouco há um protocolo clínico de atendimento médico/hospitalar para este tipo de agravo, o que leva a uma falta de padrão nos procedimentos adotados nesses casos (Passos et al., 2016).

Nesse sentido, pesquisas com o intuito de compreender a composição e mecanismo de ação dessas toxinas vem sendo realizadas, legitimando a importância de estudos com raias de água doce.

Aguiar e Valentin (2010) afirmam que a carência de informações a respeito de venenos de peixes pode ser devida à complexidade da extração do veneno, uma vez que a captura destes animais não é simples, a quantidade de veneno extraída é pequena, é termolábil, além da necessidade de manutenção dos exemplares em coleções científicas. Ao mesmo tempo que esses animais são ricos em muco, o que pode ser considerado um contratempo durante a separação das proteínas do veneno para caracterização, e também pela problemática da glândula de veneno não ser uma estrutura de armazenamento bem definida comparativamente com a de outros animais (Baumann et al., 2014).

1.6 Estudos com o muco e o veneno de potamotrigonídeos

Nos últimos anos trabalhos realizados com raias de água doce, principalmente do gênero *Potamotrygon*, objetivaram a identificação dos mecanismos de ação e da caracterização dos compostos responsáveis pelo quadro clínico do envenenamento por estes animais.

Nos trabalhos relacionados abaixo considera-se veneno como o produto obtido a partir da raspagem do ferrão do animal, e o muco é obtido pela raspagem do epitélio do dorso ou da cauda.

A respeito dos ensaios biológicos em modelos animais utilizando apenas o veneno, Magalhães e colaboradores (2006) evidenciaram os efeitos tóxicos de *Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbignyi*. Barbaro et al. (2007) detectaram atividades letais, dermonecrótica, miotóxica, edematogênica e nociceptiva de *Potamotrygon falkneri*, e não verificaram ação na cascata da coagulação. O grupo de Antoniazzi (2011) caracterizou as alterações histológicas induzidas por *P. falkneri*, como necrose e reação inflamatória. Em 2014 e 2015, Kimura e equipe caracterizaram a resposta inflamatória induzida por *P. motoro*.

Com relação às atividades e ensaios em modelos animais com o muco e veneno de raias, Magalhães et al. (2006) detectaram atividade necrosante sinérgica entre o muco e o veneno de *P. scobina* e *P. orbignyi*, o que vai ao encontro do que foi constatado por Monteiro-dos-Santos e equipe (2011), que comprovaram que o muco da raia *Potamotrygon henlei* possui efeitos pró-

inflamatórios e antimicrobianos, e o muco e o veneno apresentam atividade edematogênica, nociceptiva e proteolítica. Domingos e seu grupo (2011) verificaram que o muco e o veneno de *P. motoro* são tóxicos para células epiteliais humanas e o grupo de Lameiras (2014) relatou rabdomiólise sistêmica e inflamação induzida pelo muco de *P. motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, sendo que para esta última raia há poucos estudos na literatura.

Estudos que demonstram a variabilidade da peçonha entre espécies apontam para diferenças na constituição da peçonha de raias. Magalhães et al. (2006) avaliaram a toxicidade de duas espécies de raias de água doce, em que foi possível apontar diferenças na intensidade das atividades edematogênica e nociceptiva para peçonha de *P. scobina* e *P. orbigny*. Barbaro et al. (2007) avaliaram a toxicidade das raias pertencentes a ambientes diferentes, demonstrando que raias de água doce desenvolvem atividades biológicas mais severas que as marinhas. No trabalho desenvolvido por Monteiro-dos-Santos (2012), a variação no grau de toxicidade, relacionado com o período ontogenético (jovem/adulto) e gênero (macho/fêmea) de raias *P. henlei* foi observado para as atividades biológicas mais relatadas no pós-acidente (nocicepção e edema). Já Kirchhoff et al. (2014), revelaram a diminuição da toxicidade do veneno *Potamotrygon leopoldi* durante a maturação, mas sem alterações na composição do veneno.

Acerca da caracterização bioquímica, trabalhos para verificação da massa molecular das proteínas do muco e do veneno de raias por meio de eletroforese SDS-Page e ensaios de atividade proteolítica e hialuronidásica foram realizados conforme a Tabela 01.

Tabela 01 – Relação das massas moleculares das proteínas do veneno e muco de raias *Potamotrygonidae* e de atividade proteolítica e hialuronidásica.

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

Grande parte dos trabalhos empregaram muco e/ou veneno de raias do gênero *Potamotrygon*, e foram encontradas proteínas no veneno com massa molecular variando entre 12 e 84kDa e no muco entre 10 e 70kDa. Atividades proteolíticas também foram encontradas (com resultados bem diversos), como ação gelatinolítica, atividade caseinolítica e fibrinogenolítica, o que sugere a presença de proteases que contribuem para a degradação da matriz extracelular, favorecendo o estabelecimento da lesão (Barbaro et al., 2007). Além de ação hialuronidásica, que contribui para a difusão rápida de toxinas no sítio da inoculação (Pukrittayakamee et al., 1988).

Ensaio de purificação do veneno e do muco de *Potamotrygon* empregando técnicas cromatográficas são descritas por Conceição et al. (2006; 2009) que detectaram por cromatografia líquida de fase reversa no veneno de *P. orbignyi* picos não encontrados por Monteiro-dos-Santos et al. (2011) na *P. henlei*, corroborando a existência de constituintes diferentes entre venenos animais pertencentes ao mesmo gênero. Magalhães et al. (2008) purificaram e caracterizaram uma hialuronidase do veneno de *P. motoro*. Monteiro-dos-Santos et al. (2011) demonstraram que muco e veneno possuem picos distintos, refletindo que estes podem apresentar componentes diferentes, apesar de apresentarem perfil eletroforético semelhante. Em 2012, Conceição e equipe isolaram e caracterizaram uma proteína do muco de *P. henlei* semelhante à cadeia β da hemoglobina, que se mostrou ativa contra bactérias (*Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*) e levedura (*Candida tropicalis*).

Pesquisas sobre a caracterização de peptídeos do veneno de raias também já foram realizadas. Conceição et al. (2006; 2011) isolaram e caracterizaram do veneno de *P. orbignyi* um peptídeo, denominado Orpotrin, com efeito vasoconstritor e demonstraram a atividade biológica de três peptídeos sintéticos análogos ao Orpotrin. Conceição e colaboradores (2009) revelaram um outro peptídeo (Porflan) do veneno de *P. orbignyi* com ação na promoção de recrutamento e aderência de leucócitos na microcirculação em modelos animais.

1.7 Caracterização da resposta imunológica no envenenamento por potamotrigonídeos

A resposta inicial do sistema imunológico é desempenhada pela imunidade inata, que consiste em mecanismos de defesas celulares e bioquímicos envolvidos em uma resposta rápida, independentemente de exposição prévia ao agente e que não se altera após o contato. Já a resposta imune adaptativa tem a capacidade de reconhecer, distinguir e reagir a um grande número de substâncias, através de dois tipos de resposta: humoral e celular (Cruvinel et al., 2010).

Na resposta humoral, os linfócitos B secretam anticorpos, que reconhecem, neutralizam e auxiliam na eliminação do antígeno. A imunidade celular é

mediada pelos linfócitos T que apresentam ação efetora direta sobre células alvo e atividade efetora auxiliar na ativação de outros subtipos celulares (Mesquita Jr. et al., 2010).

A verificação da produção de anticorpos contra uma determinada toxina ou veneno é de fundamental importância para o desenvolvimento dos antissoros que são empregados na neutralização de venenos inoculados após acidente por animal peçonhento. Para que a soroterapia seja eficaz, é necessário que seja específica para o tipo de veneno do animal envolvido (Brasil, 2001).

A indução da produção de anticorpos contra a peçonha de peixes com o intuito de verificar a capacidade de neutralização dos efeitos do envenenamento a partir da utilização desses soros tem sido descrita na literatura, de acordo com o próximo parágrafo.

Lopes-Ferreira (2000) e Piran-Soares et al. (2007) relataram a capacidade de neutralização do anti-veneno contra as principais atividades tóxicas induzidas pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). Barbaro et al. (2007) verificaram que o veneno de *Potamotrygon falkneri* e da raia marinha *Dasyatis guttata* (raia marinha) induzem a formação de anticorpos em animais, com reatividade antigênica cruzada entre os antissoros produzidos. Soliani (2008) obteve um soro poliespecífico pela junção da IgG (imunoglobulina G) veneno-específica do soro produzido por camundongos contra o veneno dos principais peixes peçonhentos brasileiros, como *Thalassophryne nattereri*, *Potamotrygon orbignyi*, *Scorpaena plumieri* (peixe escorpião) e *Cathorops spixii* (bagre), e verificou que este soro é eficiente contra o efeito nociceptivo do veneno de *Potamotrygon orbignyi*. O anti-veneno contra o peixe pedra *Synanceja spp* neutraliza a resposta nociceptiva e edematogênica induzidas pela peçonha de *Scorpaena plumieri*, sugerindo que estas peçonhas compartilham componentes com propriedades antigênicas semelhantes (Gomes et al., 2011).

Sobre a caracterização da resposta inflamatória, que faz parte dos mecanismos de defesa da imunidade inata, trabalhos discorrem a respeito da caracterização da inflamação, uma das reações mais frequentes no envenenamento por raias. Monteiro-dos-Santos et al. (2011), observou a presença de mediadores inflamatórios e alterações na microcirculação induzida pelo muco e veneno de *Potamotrygon henlei*, corroborando os resultados de Kimura et al. (2014; 2015).

1.8 Radiação gama e irradiação de venenos

As radiações gama são ondas eletromagnéticas que se propagam com alta velocidade e possuem energia suficiente para remover elétrons das orbitais de átomos, promovendo ionização e excitação nos meios com os quais elas interagem (Yoshimura, 2009).

Os raios gama são gerados como consequências de desexcitações nucleares a partir de radioisótopos, como o ^{60}Co . É uma radiação bastante penetrante e capaz de atravessar grandes espessuras, motivo pelo qual é utilizada em aplicações médicas (radioterapia, braquiterapia), industriais (gamagrafia), na agricultura (desinfestação, inibição de brotamento), além de esterilização de materiais, descontaminação de alimentos, entre outras (CNEN).

A radiação gama age diretamente pela interação com moléculas biológicas, como o DNA e proteínas, provocando ionização, modificação da estrutura química e alterações de função. E indiretamente, quando a radiação interage com a água intracelular, resultando na geração de produtos da radiólise da água, como hidrogênios moleculares (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($\text{OH}\cdot$), elétron aquoso ($e\text{-aqu}$), átomos de hidrogênio ($\text{H}\cdot$) e peroxila (HO_2). Esses produtos funcionam como intermediários na transferência de energia de radiação para moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos da radiação (Michaels, Hunt, 1978).

A irradiação de proteínas, tanto em estado seco quanto em solução aquosa, pode resultar em simples ionizações até modificações drásticas na estrutura primária proteica. A interação de proteínas com radicais livres primários (produzidos após a radiólise da água) pode levar a alterações oxidativas, alterando sua estrutura e carga (Wales, Kusel, 1992), fragmentação, “cross-linking” e agregação (Moon, Song, 2001).

Nos últimos anos trabalhos têm mostrado que após o processo de irradiação, a proteína sofre alterações na estrutura terciária e secundária, fato que está diretamente relacionado às mudanças nas suas funções biológicas. Em alguns casos, após as proteínas serem irradiadas em solução, apresentam agregados insolúveis visíveis a olho nu. Parte da amostra pode revelar ainda formas intermediárias de conformação que se apresentam como agregados

solúveis (Andriani, 1995; Guarnieri, 1992; Murata, 1988; Nascimento, 1991/1995; Spencer, 1995/1999; Casare, 2009).

Phisalix e Bertrand (1894) realizaram os estudos iniciais para atenuar a toxicidade dos venenos utilizados na imunização de animais. Para melhorar a produção de soro contra envenenamentos e o bem-estar dos animais soro produtores, diferentes processos têm sido utilizados com a finalidade de abrandar a letalidade das toxinas, tais como: fotooxidação (Shortt; Mallick, 1935), irradiação com raios-X (Flowers, 1963), ultravioleta (Tejasen; Ottolenghi, 1970), iodação (Daniel et al., 1987; Bicalho et al., 1990; Henene et al., 1992) e mutagênese sítio dirigida (Li et al., 1994).

Igualmente, a radiação ionizante vem sendo utilizada na destoxicação de venenos animais e obtenção de melhores imunógenos. A redução da toxicidade da Crotamina irradiada foi descrita por Boni-Mitake et al. (2001). Abib e Laraba-Djebari (2003), verificaram que o soro anti-veneno irradiado do escorpião *Androctonus hector* tem capacidade de neutralização do veneno maior que o soro anti-veneno nativo. Camilo e colaboradores (2005) verificaram alterações estruturais na Giroxina submetida à radiação. A capacidade imunogênica do veneno irradiado da serpente *Cerastes cerastes* foi constatada por Oumehdi e Djebari em 2008. A possibilidade de um soro anti-crotálico a partir do veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* foi confirmado por Ferreira Jr. e seu grupo em 2009. Caproni e equipe (2009) observaram que a Bothropstoxina-1 irradiada é imunogênica. Oliveira et al. (2015) observaram modificações estruturais na Crotamina irradiada e redução da miotoxicidade. E a Crotoxina irradiada reduz os danos renais em camundongos em comparação à sua forma nativa (Rocha, 2016).

A radiação gama apresenta um diferencial em relação às demais técnicas, visto que além de conseguir diminuir a toxicidade do veneno ou toxinas isoladas, mantém a resposta imunológica para a produção de soros e melhora as propriedades imunológicas da amostra irradiada, sem que seja adicionada outra substância à mesma (Nascimento et al., 1996, 1998; Caproni et al., 2009; Camilo et al., 2005).

Assim sendo, o desenvolvimento deste estudo foi estimulado pela: escassez de trabalhos voltados para o tratamento específico das lesões oriundas dos agravos por raias; carência de informações sobre a peçonha de raias de

outros gêneros da família *Potamotrygonidae*; e pela necessidade de produção de um antissoro para tratar os intensos sintomas desses acidentes. Utilizando ainda a radiação ionizante que tem se mostrado vantajosa na atenuação de toxinas animais, resultando na obtenção de melhores imunógenos para a produção de soros (Nascimento et al., 1996; Ferreira Jr. et al., 2009; Oliveira et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a resposta imunológica induzida pelo muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co .

2.2 Específicos

- ✓ Investigar a capacidade imunogênica do muco e do veneno da raia *Paratrygon aiereba*.
- ✓ Avaliar a reatividade antigênica cruzada entre o veneno e muco de *Paratrygon aiereba*.
- ✓ Verificar a reatividade antigênica cruzada com outras espécies de raias responsáveis por acidentes no estado do Tocantins.
- ✓ Avaliar a resposta humoral induzida em diferentes modelos animais pelo muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co .
- ✓ Verificar a produção de citocinas induzidas pelo muco nativo ou irradiado por ^{60}Co .
- ✓ Averiguar a capacidade neutralizante dos soros anti-muco nativo ou irradiado por ^{60}Co de *Paratrygon aiereba* contra a ação edematogênica do muco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN – protocolo n°126/2013. A captura das raias foi realizada por meio de licença ambiental n.º 6781-1/2014, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Todas as raias capturadas foram depositadas na Coleção de Peixes do Laboratório de Ictiologia Sistemática da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional – TO.

3.1. Escolha das raias para estudo

A espécie *Paratrygon aiereba* foi escolhida para estudo por pertencer a um dos gêneros de raias de água doce presentes na bacia hidrográfica Tocantins-Araguaia e pela escassez de informações a respeito da peçonha desta espécie. A partir dos resultados iniciais, optou-se por verificar a reatividade antigênica dos soros anti-*Paratrygon aiereba* contra o muco de outras duas espécies, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*, pelo fato dessas espécies apresentarem ampla distribuição geográfica no país.

3.2. Coleta das raias e processamento das amostras

Foram coletadas raias *Paratrygon aiereba* (n=17), *Potamotrygon orbignyi* (n=3) e *Potamotrygon henlei* (n=3) no Ribeirão do Carmo, afluente do rio Tocantins no município de Porto Nacional/TO coordenadas geográficas: 10°42.17.41”L48°30.23.62”O; e no reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães (Lajeado) nos municípios de Palmas e Porto Nacional/TO, coordenadas geográficas: 10°42.17.50”L48°30.23.68”O e 10°41.59.73”L48°26.18.55”O, respectivamente (Fig. 10).



Figura 10 – Pontos de coletas das raias. A – Palmas/TO; B - Porto Nacional/TO. Fonte: adaptação do Google Earth.

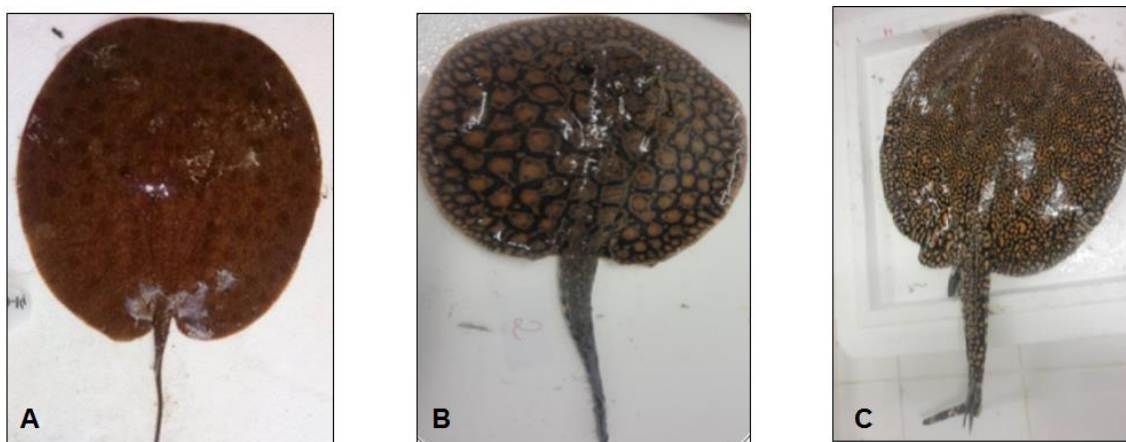


Figura 11 – Fotos das raias utilizadas para a realização do trabalho. A – *Paratrygon aiereba*; B – *Potamotrygon orbignyi*; C – *Potamotrygon henlei*. Fotos: Gabriela Ortega Coelho Thomazi (arquivo pessoal).

A extração do muco e do veneno das raias *Paratrygon* e do muco das raias *Potamotrygon*, foi realizada por meio de raspagem do epitélio que recobre o dorso e a cauda (muco) e o ferrão (veneno) e armazenados a -20°C até o momento do uso (Monteiro-dos-Santos et al., 2011).

Foi realizado um *pool* do veneno (apenas da *Paratrygon aiereba*) e um *pool* do muco por espécie (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*). As amostras foram diluídas em solução salina estéril 0,9% e centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido a um filtro de 0,22 µm com o objetivo de esterilizar as amostras. As amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

3.3. Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 20 a 25g, provenientes do Biotério do IPEN e coelhos *New Zealand* brancos machos, pesando em média 3 a 4 kg, da Granja RG. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*.

3.4. Irradiação das amostras

As amostras de muco de *Paratrygon aiereba*, mantidas em banho de gelo, foram irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Ipen, com a dose de 2kGy de raios gama provenientes de uma fonte selada de ⁶⁰Cobalto (Gammacell 220, Atomic Energy Canada LTD), à temperatura ambiente, na presença de oxigênio atmosférico (Nascimento et al., 1996). A taxa de dose foi de 1,031 kGy/h.

3.5. Imunização dos animais: indução de resposta imune específica

Com o intuito de verificar a imunogenicidade do muco ou veneno extraídos da raia *Paratrygon aiereba* em estudo, a imunização dos animais foi realizada em duas etapas.

3.5.1. Primeira etapa da imunização: produção de anticorpos contra o muco e o veneno nativos de *Paratrygon aiereba*

A primeira etapa consistiu na imunização ativa de animais contra o muco ou veneno nativos de *Paratrygon aiereba* com o intuito de verificar: a imunogenicidade da peçonha deste animal, uma vez que não há relatos na literatura sobre este aspecto; a reatividade antigênica cruzada entre o material extraído do ferrão e do dorso e a padronização dos ensaios.

Dois grupos de camundongos *Swiss* (n=6/grupo) foram imunizados contra o veneno ou muco nativos na concentração de 1,5µg/mL, guardando um intervalo de quinze dias entre os inóculos. Todas as etapas desta imunização foram realizadas seguindo o esquema descrito na Tabela 02.

Tabela 02 - Esquema da 1.^a etapa de imunização para determinação da imunogenicidade do muco e veneno de *Paratrygon aiereba* em camundongos.

1^a dose	Adjuvante de Freund incompleto + 1,5µg/mL de muco ou veneno em solução salina 0,9%
2^a, 3^a e 4^a doses	1,5µg/mL de muco ou veneno em solução salina 0,9%

Foram injetados, por via intradérmica, 200µL de cada uma das amostras, distribuídas em quatro regiões diferentes do animal. As sangrias foram realizadas pelo plexo retro orbital após quinze dias de cada imunização. Os soros foram obtidos por centrifugação a 2500 rpm por 20min e o *pool* dos mesmos aliquoteados e estocados a -20°C até o uso.

Como grupo controle das imunizações foram utilizados animais com as mesmas características (n=6), que receberam apenas adjuvante na primeira dose, nas demais doses receberam apenas solução salina, e as sangrias realizadas nas mesmas condições.

3.5.2. Segunda etapa da imunização: produção de anticorpos contra o muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por ⁶⁰Co

Dois grupos de camundongos *Swiss* (n=10/grupo) foram imunizados contra o muco nativo ou irradiado nas mesmas condições descritas na primeira etapa,

e os procedimentos de administração dos inóculos, obtenção e armazenamento dos soros foram realizados conforme descrição no item 3.5.1 e Tabela 03.

Tabela 03 - Esquema da 2.^a etapa de imunização para determinação da imunogenicidade do muco nativo ou irradiado

Camundongos Swiss	
1^a dose	Adjuvante de Freund incompleto + 1,5µg/mL de muco nativo ou irradiado em solução salina 0,9%
2^a, 3^a e 4^a doses	1,5µg/mL de muco nativo ou irradiado em solução salina 0,9%
Coelhos New Zealand	
1^a dose	Adjuvante de Freund incompleto + 200µg/mL de muco nativo ou irradiado em solução salina 0,9%
2^a, 3^a e 4^a doses	200µg/mL de muco nativo ou irradiado em solução salina 0,9%

As imunizações dos dois grupos de coelhos (n=3/grupo), consistiram em 04 (quatro) doses, com intervalo de quinze dias, com o muco nativo ou irradiado, na concentração de 200µg/mL (Nascimento et al., 1996; Barbaro et al., 2007). Das soluções da Tabela 03, injetou-se 1 mL por via intradérmica em quatro regiões diferentes do animal. As coletas de sangue foram realizadas após quinze dias de cada imunização, pela punção da veia marginal ou central do pavilhão auricular. Os soros foram obtidos por centrifugação a 2000 rpm por 20min e o *pool* dos mesmos aliquotados e estocados a -20°C até o uso. Como controle das imunizações foi utilizado 01 (um) coelho com as mesmas características dos animais utilizados para a produção de soro, que receberam apenas adjuvante na primeira dose, e nas demais doses solução salina, e as sangrias realizadas nas mesmas condições.

3.6. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*Paratrygon aiereba*

A pesquisa de anticorpos IgG produzidos pelos animais contra o muco e o veneno de *Paratrygon aiereba* foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) pelo método indireto (Theakston et al., 1977).

Para a verificação da produção de anticorpos IgG total e para a padronização da concentração do antígeno (5, 10 ou 20 µg/mL) foram testados os soros dos camundongos imunizados contra o muco ou veneno provenientes da 1ª etapa de imunização e o soro dos animais controle (controle negativo, não imunizados). A reatividade antigênica cruzada entre o muco e o veneno foi examinada a partir da adição de soro anti-muco nos poços sensibilizados com veneno (5 µg/mL), e adição de soro anti-veneno nos poços sensibilizados com muco (5 µg/mL), nas mesmas condições citadas.

No soro dos animais provenientes da 2.ª etapa de imunização (camundongos e coelhos imunizados contra o muco nativo ou irradiado por ⁶⁰Co), a dosagem dos anticorpos IgG total foi realizada por ELISA, empregando 5 µg/mL de muco de *Paratrygon aiereba* como antígeno e com a utilização dos conjugados adequados.

Os títulos de IgG total foram determinados em diluições seriadas dos soros (1:200 a 1:102.400). Também foram testadas as subclasses de IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b) nos soros de camundongos (1:200), pela utilização de conjugado específico para cada subclasse (1:5.000).

A reatividade antigênica entre o soro anti-muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba* contra o muco de outras duas espécies de raias (*Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*) também foi examinada conforme a metodologia descrita.

Para a realização do ELISA, as microplacas foram sensibilizadas com o antígeno (muco ou veneno) diluído no tampão de sensibilização Carbonato/Bicarbonato 0,1M pH 8,8 nas concentrações citadas anteriormente. Foram pipetados 100µL/poço da solução tampão/amostra e as microplacas incubadas por 12 horas em câmara úmida a 4°C. Após a sensibilização das microplacas, procedeu-se à lavagem (5 vezes) dos poços com 300µL/poço da solução de tampão Fosfato Salino (PBS) com Tween 0,05% em lavadora de microplaca (HydroSpeed, Tecan Trading AG®). Em seguida as microplacas foram bloqueadas com 250µL/poço da solução de PBS, Tween 0,05% e leite desnatado 3% (PBS-T-L) por 1h em estufa a 37°C, para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos de ligação. Após o bloqueio, os poços passaram por um novo ciclo de lavagens. Os soros dos animais foram diluídos com solução PBS-T-L, pipetados 100µL/poço e as microplacas incubadas em estufa a 37°C por 1h.

Após o período de incubação com os soros, as microplacas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens. Em seguida foi adicionado 100µL/poço do conjugado (camundongo ou coelho) anti-IgG/peroxidase (Sigma-Aldrich®) diluído de 1:10.000 e as microplacas foram incubadas por 1h a 37°C. Após a incubação com o conjugado, as microplacas passaram por um novo ciclo de lavagens. Foram aplicados nos poços 100µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), uma solução cromógena, e as microplacas foram incubadas em câmara escura por 30 minutos. A reação peroxidase/substrato desenvolveu um produto de coloração azul. A reação foi interrompida com a adição de 100µL/poço de ácido sulfúrico 5% (H₂SO₄), obtendo-se um produto final amarelo. A densidade óptica (DO) de cada poço foi obtida por leitura a 492nm em espectrofotômetro para microplaca (Labsystems Multiskan MS). Em todos os ensaios os soros dos animais não imunizados (controle negativo) também foram testados.

3.7. Análise da especificidade dos anticorpos por *Western blotting*

As proteínas do muco ou veneno foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-Page), um método que separa as proteínas de acordo com o seu tamanho (massa molecular), conforme Laemmli (1970).

Foram confeccionados géis de poliácridamida (gel de resolução a 12,5% e gel de empilhamento a 4%). Alíquotas de 20µL de cada amostra homogeneizadas com tampão de amostra (glicerol 20%, β-mercaptoetanol 1%, SDS 1%, Tris-HCl pH 6,8 10mM), aquecidas a 99°C por 4 minutos foram aplicadas no gel que foi submetido a uma corrente de 100mA, por cerca de 2h. Padrões de massa molecular conhecida foram utilizados.

Após o fracionamento das proteínas por eletroforese SDS-Page, o *Western blotting* foi realizado através da transferência das proteínas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®) pela utilização de um aparato de transferência em sistema úmido (Bio®Rad Laboratories) por 45 minutos a 10 volts, utilizando o tampão de transferência Towbin (250mM de Tris pH 8,3, 192mM de glicina, 20% de metanol v/v). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com uma solução de PBS pH 7,4 10mM, Tween 0,05% e leite desnatado a 5%, por 1 hora para evitar adsorção inespecífica. Após

o bloqueio, as membranas foram lavadas 2 vezes por 15 minutos cada ciclo com PBS e Tween 0,05%. Em seguida procedeu-se à incubação “overnight” sob agitação das membranas com os soros 1:100. Após o período de incubação com o soro, as membranas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens. A imunorreatividade das proteínas foi detectada por meio da adição de uma peroxidase conjugada com anti-IgG de camundongos ou de coelho diluída (1:5.000) e incubada por 1h. Após um novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada com solução de TMB (Towbin; Staehelin; Gordon, 1979).

3.8. Cultura de células esplênicas de camundongos

As células esplênicas foram obtidas de camundongos *Swiss* após 15 dias em seguida à 4.^a dose de muco de *Paratrygon aiereba* nativo (n=3) ou irradiado (n=3). Como grupo controle foram utilizados camundongos *Swiss* (n=3) não imunizados.

Os baços foram dissociados de maneira asséptica em fluxo laminar e a separação celular realizada conforme orientações do fabricante com Ficoll-Paque™ Premium 1084 (GE Healthcare®). Após a separação das células, as mesmas foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), contadas em câmara de Neubauer e, por fim, ajustadas numa concentração de 2×10^6 células.

3.9. Ensaio de proliferação de células B: indução da produção de anticorpos *in vitro*

Para a detecção *in vitro* da proliferação de células B esplênicas em resposta ao muco de *Paratrygon aiereba* foi empregado o método *In vitro Induced Antibody Production* (IVIAP) (Caterino-de-Araújo, 1992).

Placas de 96 poços (Costar®, Corning Inc, Lowell, USA) foram sensibilizadas com 100µL de muco (5µg/mL) de *Paratrygon aiereba* em tampão carbonato de sódio 0.1M pH 9.5 em câmara úmida por 4 h. Em seguida, as células esplênicas dos grupos (muco nativo, muco irradiado e não imunizado) obtidas como descrito acima foram distribuídas nas placas a uma concentração de 2×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 completo contendo Soro Fetal Bovino

10% (SFB). Os poços foram estimulados na presença do muco de *Paratrygon aiereba*, Concanavalina A (estímulo inespecífico 10µg/mL) e sem estímulo. As culturas foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas para adsorção dos anticorpos produzidos. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado. A placa de cultura foi lavada, conforme a metodologia do ELISA descrita anteriormente, em seguida adicionado 100µL de conjugado anti-IgG de camundongo/peroxidase e incubada por 1 hora em estufa a 37°C. Após a incubação, as microplacas passaram por um novo ciclo de lavagens. Foram aplicados nos poços 100µL de TMB e após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 5%. A DO de cada poço foi obtida por leitura a 492nm em espectrofotômetro para microplaca.

3.10. Detecção de citocinas por citometria

Foi verificada a produção de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos, cultivadas conforme descrição anterior. E também averiguada a produção de citocinas séricas nos soros provenientes dos mesmos animais utilizados na obtenção dos baços. Dessa forma, foram analisadas as citocinas esplênicas e séricas de camundongos imunizados após 15 dias em seguida à 4.^a dose de muco nativo (n=3) ou irradiado (n=3) e de animais não imunizados (n=3).

Foi utilizado o kit comercial para citometria *Cytometric Bead Array*[®] (CBA) *Mouse Th1, Th2 e Th17* (BD Biosciences[®]). Foram mensurados os níveis de Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interferon-gama (IFN-γ), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α), Interleucina-17A (IL-17) e Interleucina-10 (IL-10), de acordo com as instruções do fabricante. As análises foram conduzidas no citômetro de fluxo (BD Biosciences[®] LSRFortessa), os dados coletados pelo software BD FACSDIVA[®] (BD Biosciences[®]) e analisados através do software FCAP Array V 3.0[®] (BD Biosciences[®]).

3.11. Avaliação da citotoxicidade do muco de *Paratrygon aiereba*

O teste de citotoxicidade utilizado avalia se determinado agente é tóxico pela capacidade de interferir quantitativamente na viabilidade celular quando em contato com células em cultura. Para tanto foi empregado um corante supravital do composto tetrazólio (MTS) e um agente acoplador de elétrons PMS (fenazina metossulfato). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura (Barltrop et al., 1991).

Foram utilizadas células de linhagem celular permanente L929 (fibroblasto murino), adquiridas da ATCC (*American Type Cell Collection*), mantidas em congelamento em nitrogênio líquido.

Uma cultura de L929 foi separada por tripsinização, a suspensão celular foi centrifugada e o precipitado ressuspendido em meio RPMI 1640 com SFB 10%. Foram plaqueadas 10.000 células/cavidade em uma placa de cultura com 96 poços, onde foram adicionados Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) incubadas por 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura (DMEM + 10% SFB) foi desprezado, e adicionado nos poços 100µL de muco de *Paratrygon aiereba* em diferentes concentrações (0,015625 mg/mL a 2,0 mg/mL) diluídos em meio de cultura. A placa de cultura foi incubada por 24h em estufa a 37°C com CO₂ a 5%. Após o período de incubação, o meio com as diferentes concentrações do muco nativo foi retirado e adicionados 100µL de meio de cultura novo. Foram adicionados 20µL de uma solução (20:1) MTS 0,2% e PMS 0,09% e a placa incubada em estufa a 37°C com CO₂ a 5% por 2 horas. Posteriormente, a incorporação do corante foi mensurada a partir da DO de cada poço, obtida por leitura a 490nm em espectrofotômetro para microplaca. Foram utilizados como controle: poços que receberam apenas o meio de cultura, sem células (branco); e poços com células e meio de cultura (controle negativo).

3.12. Soroneutralização *in vitro* da atividade edematogênica

A capacidade dos anticorpos anti-muco *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por ⁶⁰Co de neutralizar o edema induzido pelo muco da raia em estudo

foi avaliada pela metodologia *in vitro* (Gutierrez et al., 1998; Lopes-Ferreira et al., 2000).

O muco (50 μ g/mL) foi incubado por 30 minutos em banho-maria a 37°C com os soros anti-muco nativo ou soro anti-muco irradiado diluídos (1:100 ou 1:1.000). Foram utilizados soros de coelhos após a 3ª dose. Após a incubação, as amostras foram agitadas e injetadas (30 μ L) no coxim plantar da pata posterior de grupos de camundongos (n=25) da linhagem *Swiss*. A solução salina 0,9% utilizada para a diluição das soluções, o soro anti-muco nativo, o soro anti-muco irradiado e o soro controle (sem anticorpos anti-muco) e o muco foram empregados como controles. A neutralização da atividade edematogênica foi verificada nos tempos de 1h, 2h, 4h e 24h após a inoculação. Em todos os animais foi verificado o volume inicial individual de cada pata antes da inoculação das amostras (tempo zero). Os volumes foram mensurados em Plestismômetro (Ugo Basile™, IT) e os resultados expressos como a variação do volume em relação ao volume basal em μ L por período (Kimura et al., 2014).

3.13. Soroneutralização *in vivo* da atividade edematogênica

O teste para verificar a capacidade *in vivo* dos anticorpos anti-muco em neutralizarem a atividade edematogênica induzida pelo muco de raia foi realizada em camundongos *Swiss* imunizados contra o muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba* (conforme a metodologia de imunização descrita anteriormente) e camundongos não-imunizados (controle) (n=5/grupo). Neste ensaio foram testados os mucos de *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei* na concentração de 50 μ g/mL. No coxim plantar da pata posterior direita foram inoculados o muco (30 μ l) e na pata esquerda injetada solução salina 0,9%. A verificação da formação de edema foi conferida após 1h, 2h, 4h e 24h da inoculação. Antes do início do experimento foi verificada a espessura individual de todas as patas (tempo zero). Neste experimento, o desenvolvimento do edema foi avaliado em milímetros (mm) com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess).

3.14. Análise Estatística

Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e aplicação do pós-teste do tipo Bonferroni. Foram consideradas significativas as comparações cujas probabilidades de igualdade foram menores que 5% ($p < 0,05$). Para análise estatística e confecção de gráficos a fim de facilitar a interpretação observacional do estudo foi utilizado o pacote estatístico *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad software, Inc San Diego, Califórnia, USA*).

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em três etapas:

- I. Resposta humoral contra o veneno e o muco de *Paratrygon aiereba*;
- II. Avaliação da resposta imunológica induzida pelo muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co ;
- III. Capacidade neutralizante dos soros anti-muco da raia em estudo contra a atividade edematogênica induzida pelo muco de *Paratrygon aiereba*.

4.1. Resposta humoral contra a peçonha de *Paratrygon aiereba*

4.1.1. Produção sérica de IgG contra o muco e o veneno de *Paratrygon aiereba*

Foi verificada a presença de IgG total sérica nos camundongos *Swiss* imunizados na primeira etapa contra o muco ou veneno de *Paratrygon aiereba* em resposta a diferentes concentrações de antígeno, conforme a metodologia.

O muco de *Paratrygon aiereba* foi capaz de estimular a produção de anticorpos IgG nos camundongos imunizados ($p < 0,001$ em relação aos controles negativos). O mesmo efeito foi verificado em relação ao veneno ($p < 0,01$ em relação aos controles negativos). Demonstrando que ambos são imunogênicos (Fig. 12).

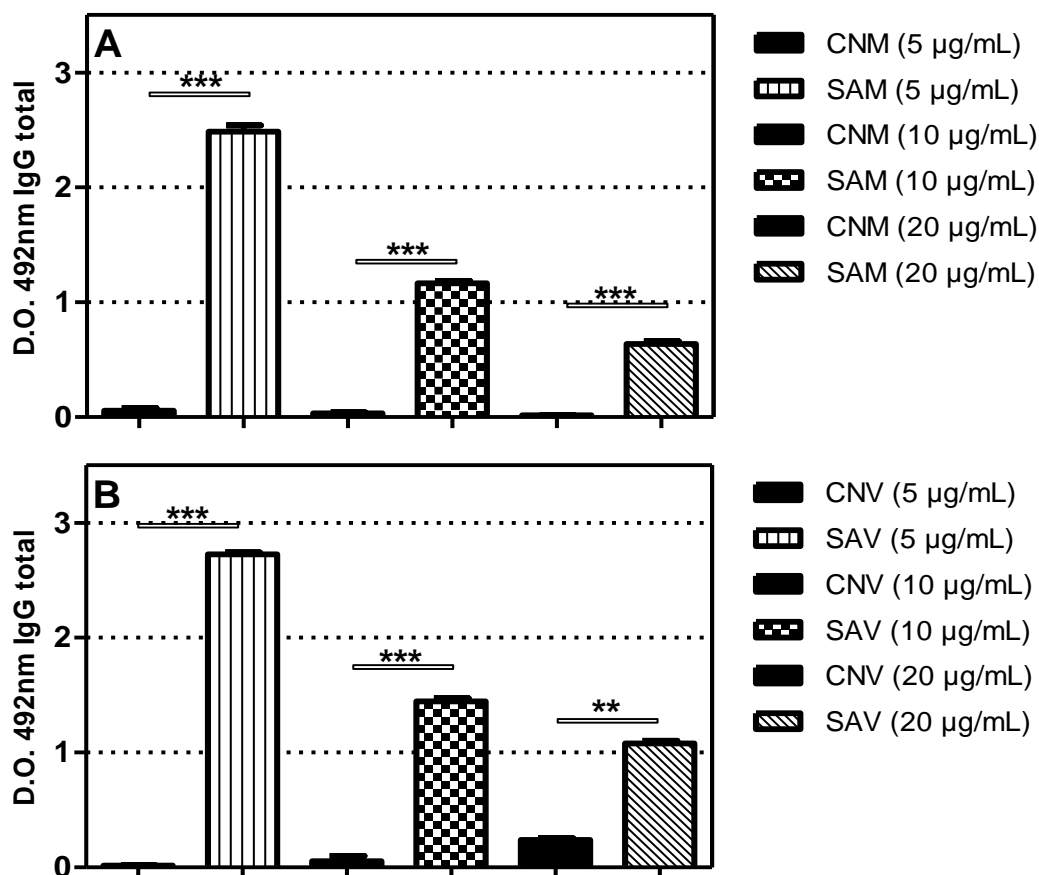


Figura 12 - Detecção de IgG sérica total (1:200) por ELISA e comparação entre a reatividade dos soros a diferentes concentrações de antígeno (5, 10 e 20 µg/mL). A – IgG de camundongos *Swiss* (n=6) imunizados após 4 doses contra o muco de *Paratrygon aiereba*. B - IgG de camundongos *Swiss* (n=6) imunizados após 4 doses contra o veneno de *Paratrygon aiereba*. CNM – controle negativo muco; SAM – soro anti-muco; CNV – controle negativo veneno; SAV – soro anti-veneno. Cada barra representa a média da D.O. (triplicata) e erro padrão de média, os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos controles negativos (soro de camundongos não imunizados): ** p<0,01 e *** p<0,001.

Na sensibilização dos poços para a realização do ELISA empregando muco ou veneno como antígeno, a concentração de 5 µg/mL apresentou uma maior reatividade aos anticorpos IgG séricos em relação à de 10 e 20 µg/mL (p<0,001). Desse modo optou-se pela sensibilização dos poços com 5 µg/mL de antígeno para a realização do ELISA.

4.1.2. Reatividade antigênica cruzada

A reatividade antigênica cruzada entre o muco e o veneno de *Paratrygon aiereba* foi verificada por ELISA (Fig. 13) e WB (Fig. 14) com soros de camundongos *Swiss* provenientes da 1.^a etapa de imunização.

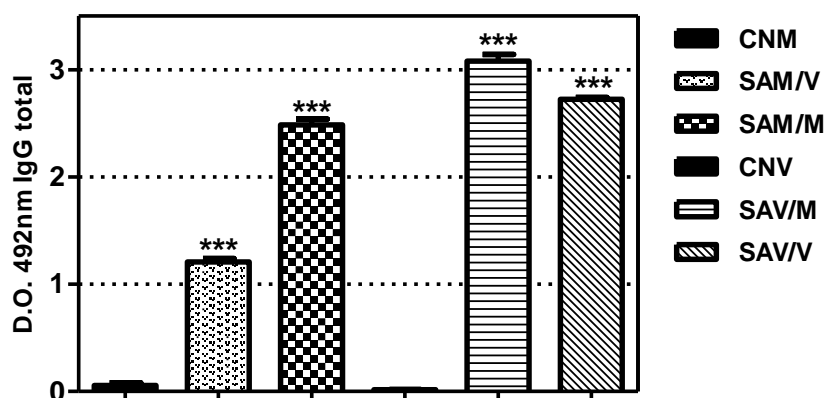


Figura 13 – Detecção de IgG total sérica (1:200) por ELISA em camundongos *Swiss* (n=12) imunizados após 4 doses contra o muco ou veneno de *Paratrygon aiereba* e reatividade antigênica cruzada entre muco e veneno. CNM – controle negativo muco; SAM/M – soro anti-muco contra o muco; SAV/M – soro anti-veneno contra o muco; CNV – controle negativo veneno; SAV/V – soro anti-veneno contra o veneno; SAM/V – soro anti-muco contra o veneno. Cada barra representa a média da D.O. (triplicata) e erro padrão de média, os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos controles negativos (soro de camundongos não imunizados): * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.

As IgGs dos camundongos imunizados contra o veneno reconheceram o muco utilizado para sensibilizar os poços da placa de ELISA (p<0,001 em relação ao controle negativo). E os anticorpos produzidos pelos animais em resposta ao muco reagiram também ao veneno (p<0,05). Como controle negativo foram testados soros de camundongos não imunizados, conforme descrição na metodologia (Fig. 13).

A especificidade e reatividade cruzada das IgGs anti-muco e anti-veneno também foi verificada pela realização de SDS-Page (12,5%) seguida da transferência para membranas de nitrocelulose para realização do WB, conforme a Figura 14.

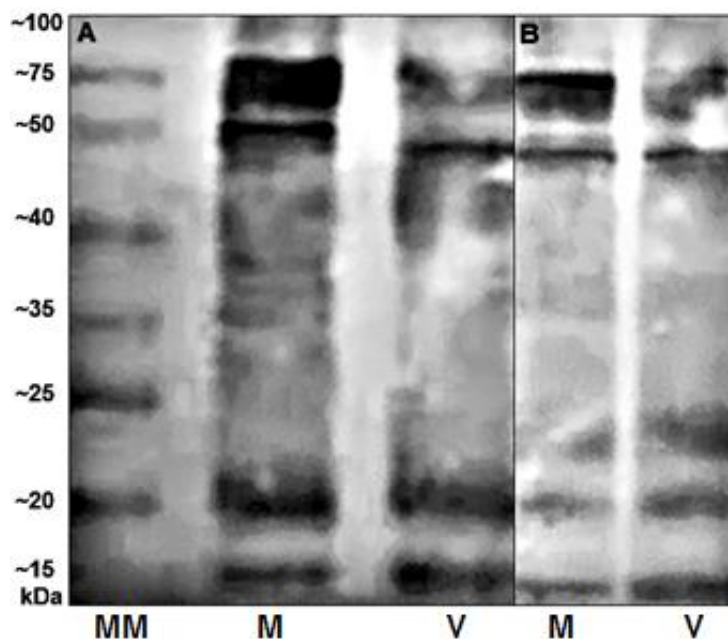


Figura 14 – Avaliação da reatividade antigênica cruzada entre o muco e o veneno de *Paratrygon aiereba* por WB com o emprego de soros de camundongos *Swiss* imunizados. A - Membrana de nitrocelulose incubada com o soro anti-muco. B - Membrana de nitrocelulose incubada com o soro anti-veneno). MM – Massa molecular; M – Muco; V – Veneno; kDa – kilodalton.

Os anticorpos presentes no soro anti-muco reconheceram proteínas do muco e do veneno (Fig. 14A), e também houve resposta das imunoglobulinas no soro anti-veneno às proteínas do muco e do veneno (Fig. 14B). Nota-se que as imunoglobulinas de ambos os soros reconheceram epítomos do muco e do veneno de 75, 50 e abaixo de 23 kDa.

4.2. Resposta imune humoral contra o muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado com raios gama de ^{60}Co

Os resultados apresentados neste segundo tópico fazem referência aos ensaios realizados com os soros provenientes da 2.^a etapa de imunização, a partir da inoculação de muco nativo ou irradiado em diferentes modelos animais.

4.2.1. Produção de anticorpos por camundongos *Swiss*

A titulação por ELISA de IgG sérica anti-muco nativo ou irradiado em camundongos (n=20) demonstrou que a partir da 2.^a dose de imunização foi possível detectar a presença de anticorpos anti-muco nativo ou irradiado, conforme a Tabela 04.

Tabela 04 – Títulos de IgG total sérica anti-muco nativo ou irradiado por ⁶⁰Co de *Paratrygon aiereba* em camundongos *Swiss*.

Doses	Imunização Muco Nativo	Imunização Muco Irradiado
1. ^a Dose	NS	NS
2. ^a Dose	1:25.600***	1:12.800***
3. ^a Dose	1:51.200*	1:51.200*
4. ^a Dose	1:51.200***	1:51.200*

Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle negativo: *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001. NS - Não significativo em relação ao controle negativo: p>0,05.

Após a 2.^a dose de imunização o muco nativo apresentou maior concentração de IgG (1:25.600) que o irradiado (1:12.800) e ambos com diferença estatística em relação ao controle (p<0,001). Em seguida à 3.^a dose, a quantidade de anticorpos contra o muco nativo ou irradiado (1:51.200 ambos) apresentou diferença em relação ao controle negativo (p<0,05). E após 4.^a dose, apesar do título de IgG ser o mesmo para ambos os soros (1:51.200), o soro anti-muco nativo mostrou maior divergência (p<0,001) que o irradiado (p<0,05) em relação ao soro sem anticorpos anti-muco (Tabela 04, Figura 15).

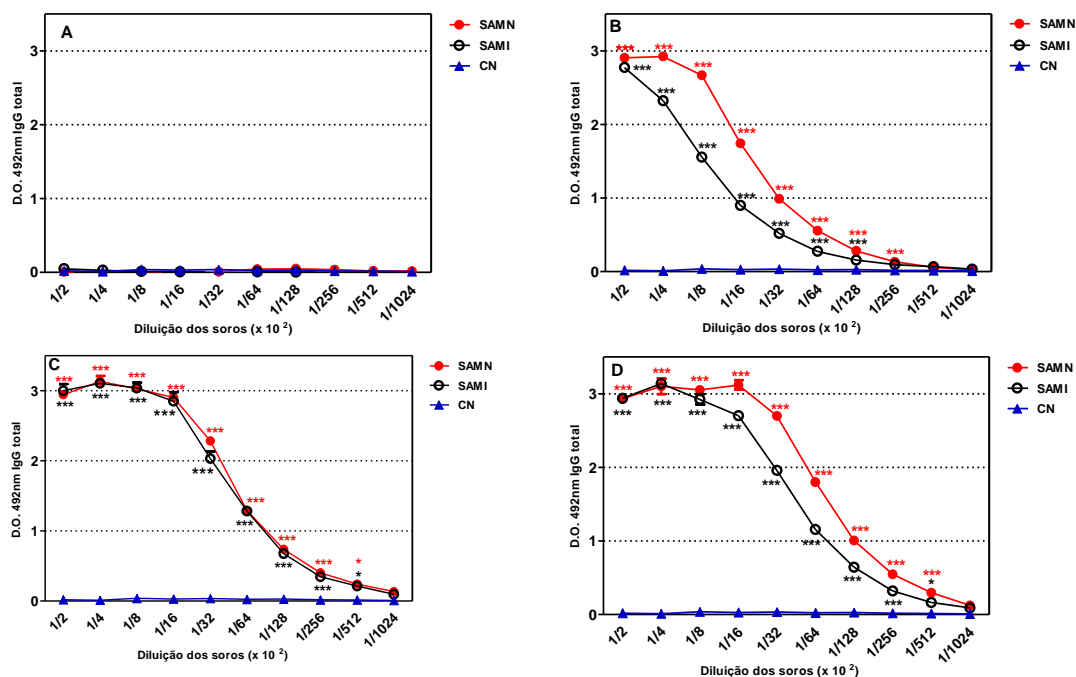


Figura 15 – Títulos séricos de IgG total em camundongos *Swiss* (n=20) imunizados contra o muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por raios gama de ^{60}Co . A – 1^a Dose; B – 2^a Dose; C – 3^a Dose; D – 4^a Dose. SAMN – Soro anti-muco nativo. SAMI – Soro anti-muco irradiado. CN – Controle negativo (soro de animais não imunizados). Cada ponto representa a média da D.O. (triplicata), a barra representa o erro padrão de média e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle negativo: *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

A partir desses resultados fica demonstrado que os camundongos imunizados contra o muco produziram altos títulos de anticorpos específicos, e a quantidade de IgG em resposta ao muco nativo foi maior que ao irradiado.

4.2.2. Produção de anticorpos por coelhos

A titulação sérica por ELISA de anticorpos anti-muco em coelhos *New Zealand* imunizados contra o muco de *Paratrygon aiereba* nativo (n=3) ou irradiado (n=3) demonstrou que a partir da 1.^a dose os animais produziram altos títulos de IgG (Tabela 05).

Tabela 05 - Títulos de IgG total sérica anti-muco *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por ^{60}Co em coelhos New Zealand em relação ao controle negativo.

Doses	Imunização Muco Nativo	Imunização Muco Irradiado
1. ^a Dose	1:51.200**	1:6.400***
2. ^a Dose	1:51.200*	1:12.800***
3. ^a Dose	1:25.600*	1:25.600***
4. ^a Dose	1:102.400*	1:51.200***

Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle negativo (soro de coelhos não imunizados); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Em relação ao controle negativo (soro de coelhos não imunizados, conforme a descrição na metodologia), houve diferença entre os títulos de IgG após a 1.^a, 2.^a e 4.^a doses em resposta ao muco nativo e irradiado, em que a concentração de IgG foi maior em resposta ao muco nativo. Na 3.^a dose, o título de anticorpos contra o muco nativo ou irradiado mensurados foi igual (1:25.600 ambos), mas os títulos de IgG do soro anti-muco irradiado apresentou uma diferença maior em relação ao controle ($p < 0,001$) do que o anti-muco nativo ($p < 0,05$).

A comparação do perfil da resposta humoral entre os grupos imunizados contra muco nativo ou irradiado pode ser verificada na Figura 16.

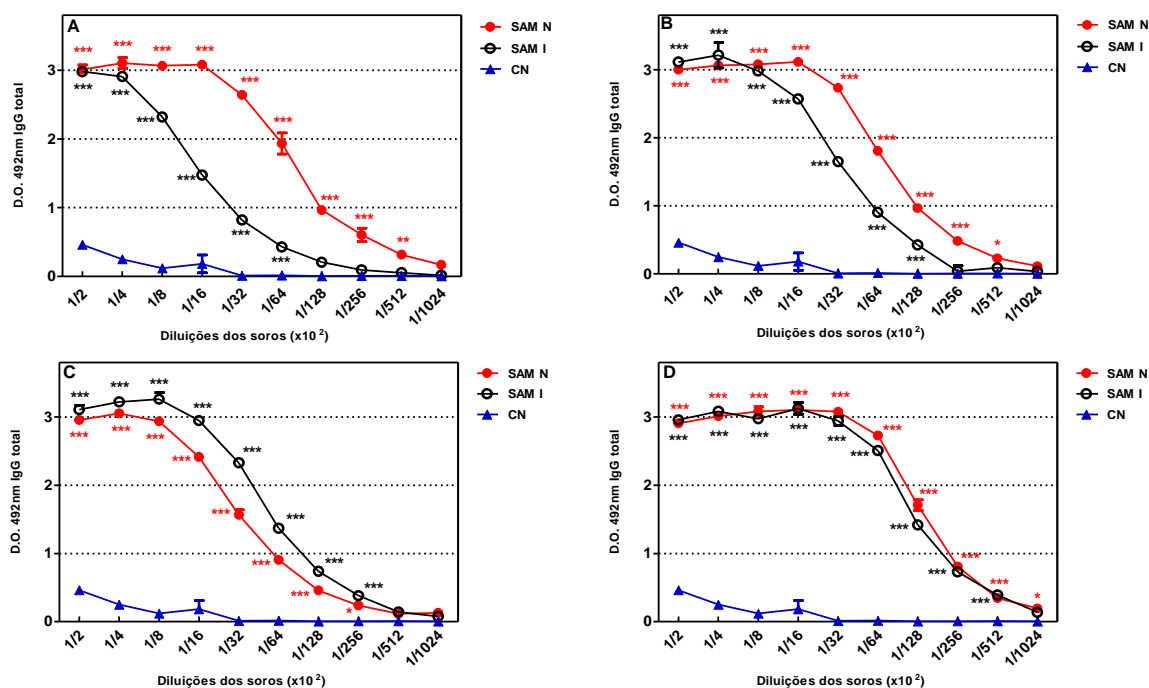


Figura 16 – Títulos de IgG total anti-muco em coelhos imunizados contra o muco de *Paratygon aiereba* nativo ou irradiado por ^{60}Co . A – 1ª Dose; B – 2ª Dose; C – 3ª Dose; D – 4ª Dose. SAMN – Soro anti-muco nativo. SAMI – Soro anti-muco irradiado. CN – Controle negativo (soro de animais não imunizados). Cada ponto representa a média da D.O. (triplicata), a barra representa o erro padrão de média e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle negativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Os coelhos imunizados com muco produziram altos níveis de anticorpos, porém a quantidade de IgG induzida em resposta ao muco nativo foi maior que a observada no muco irradiado na maioria das doses.

4.2.3. Investigação das subclasses de IgG

Diferentes subclasses de IgG foram investigadas por ELISA nos soros dos camundongos Swiss ($n=20$) imunizados contra a 4.ª dose de muco de *Paratygon aiereba* nativo ou irradiado por ^{60}Co , em conformidade com a Figura 17.

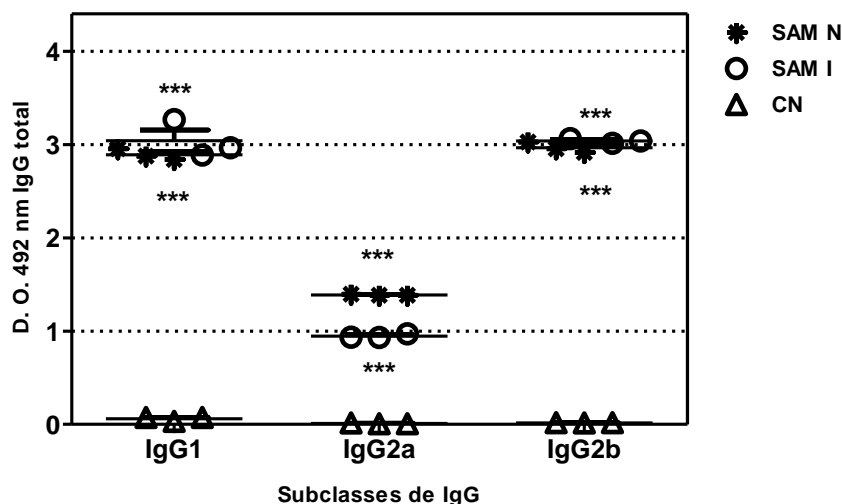


Figura 17 – Determinação sérica (1:200) das subclasses de IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b) em camundongos *Swiss* imunizados contra a 4.^a dose de muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por ⁶⁰Co. SAMN – Soro anti-muco nativo. SAMI – Soro anti-muco irradiado. CN – Controle negativo (soro de animais não imunizados). Cada ponto representa a réplica da D.O. (triplicata), a barra representa o erro padrão de média e os asteriscos indicam diferença em relação ao controle negativo (***) p<0,001).

Em relação ao soro controle (soro sem anticorpos anti-muco), houve diferença estatística significativa para as três subclasses (p<0,001).

Não houve diferença entre IgG1 e IgG2b no soro dos camundongos imunizados contra o muco nativo ou irradiado. Em relação à IgG2a, o muco nativo foi capaz de induzir uma resposta maior o irradiado (p<0,001).

4.2.4. Reatividade antigênica cruzada contra o muco de diferentes espécies de raias de água doce

A reatividade antigênica cruzada entre os soros anti-muco *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado foi verificada frente ao muco de outras duas espécies de raias de água doce: *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*.

Os anticorpos IgG total titulados nos soros anti-muco de *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado de camundongos e coelhos imunizados após a 4.^o dose, que

reagiram aos antígenos do muco de *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei* aponta para uma reatividade antigênica cruzada entre eles (Tabela 06).

Tabela 06 - Títulos de IgG total detectados nos soros anti-muco *Paratrygon aiereba* nativo ou irradiado por ^{60}Co em diferentes modelos experimentais frente ao muco de duas espécies de raias de água doce.

	Títulos de IgG total	
	<i>Potamotrygon henlei</i>	<i>Potamotrygon orbignyi</i>
Soros Camundongos		
Anti-muco <i>P. aiereba</i> nativo	1:25.600**	1:25.600***
Anti-muco <i>P. aiereba</i> irradiado	1:25.600**	1:25.600***
Soros Coelhos		
Anti-muco <i>P. aiereba</i> nativo	1:51.200*	1:25.600***
Anti-muco <i>P. aiereba</i> irradiado	1:102.400**	1:51.200***

Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle negativo (soro de animais não imunizados): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A concentração de IgG no soro de camundongos em resposta ao muco das outras espécies de raias de água doce foram similares. Já as IgGs dos coelhos anti-muco irradiado foram mais responsivas ao muco de *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*.

Comparando-se a média da absorbância (triplicata) do soro anti-muco de camundongos frente ao muco de *Potamotrygon orbignyi*, o soro anti-muco nativo foi mais responsivo que o irradiado nas diluições de 1:200 a 1:3.200 ($p < 0,001$). E em resposta ao muco de *Potamotrygon henlei*, o soro nativo também respondeu mais nas diluições de 1:200 a 1:1.600 ($p < 0,001$) que o irradiado.

Confrontando-se a média da DO (triplicata) dos soros anti-muco de coelhos frente ao muco de *Potamotrygon orbignyi*, o soro anti-muco irradiado foi mais responsivo que o nativo nas diluições de 1:3.200 a 51.200 ($p < 0,01$). E em resposta ao muco de *Potamotrygon henlei*, o soro irradiado também respondeu mais nas diluições de 1:1.600 a 1:51.200 ($p < 0,001$) que o nativo.

Na Figura 18A estão representados os resultados dos ELISAs realizados utilizando-se soros dos camundongos e na 18B soros dos coelhos, ambos imunizados com 4 doses, de acordo com a metodologia.

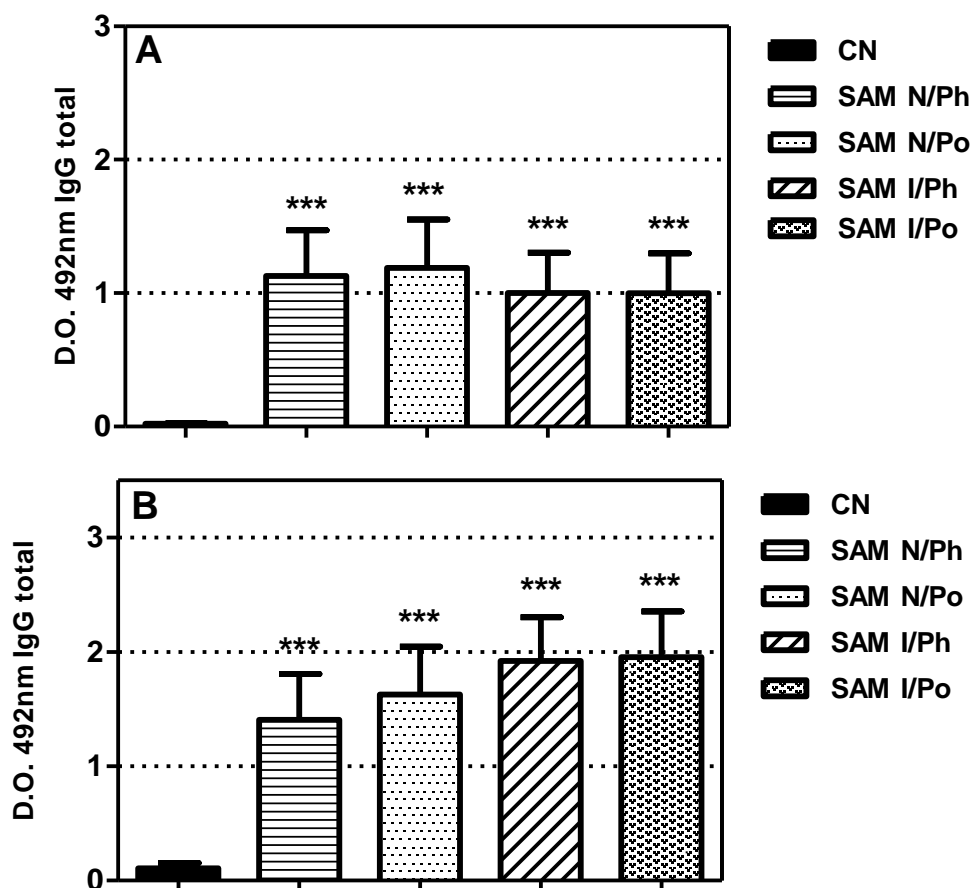


Figura 18 – Reatividade antigênica cruzada entre o muco de diferentes espécies de raias de água doce contra o soro anti-muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba*. A – Soro de camundongos imunizados; B- Soro de coelhos imunizados. CN – controle negativo; SAM N/Po – soro anti-muco nativo *Paratrygon aiereba* contra o muco de *Potamotrygon orbignyi*; SAM N/Ph – soro anti-muco nativo *Paratrygon aiereba* contra o muco de *Potamotrygon henlei*; SAM I/Po – soro anti-muco irradiado *Paratrygon aiereba* contra o muco de *Potamotrygon orbignyi*; SAM I/Ph – soro anti-muco irradiado *Paratrygon aiereba* contra o muco de *Potamotrygon henlei*. Cada barra representa a média da D.O. (triplicata) e erro padrão de média, os asteriscos indicam diferença significativa em relação aos controles negativos: *** $p < 0,001$.

As Figuras 19 e 20 referem-se à avaliação da antigenicidade cruzada por WB. Foi possível verificar que os anticorpos presentes nos soros anti-muco nativo ou irradiado produzidos por camundongos ou coelhos interagiram com proteínas presentes no muco de *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi*.

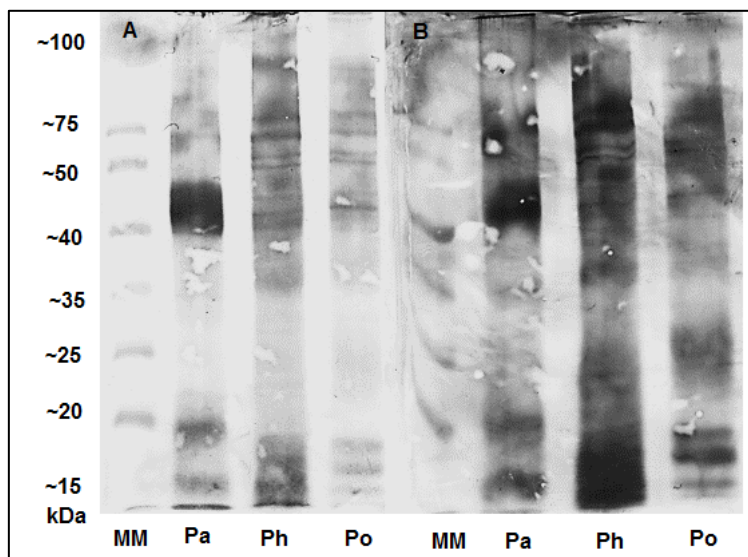


Figura 19 – Avaliação da reatividade antigênica entre o soro de camundongo anti-muco de *Paratrygon aiereba* contra os mucos de *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi* por WB. A) Membrana de nitrocelulose incubada com soro anti-muco nativo. B) Membrana de nitrocelulose incubada com soro anti-muco irradiado. MM – Massa molecular; Pa – Muco de *Paratrygon aiereba*; Ph – Muco de *Potamotrygon henlei*; Muco de *Potamotrygon orbignyi*.

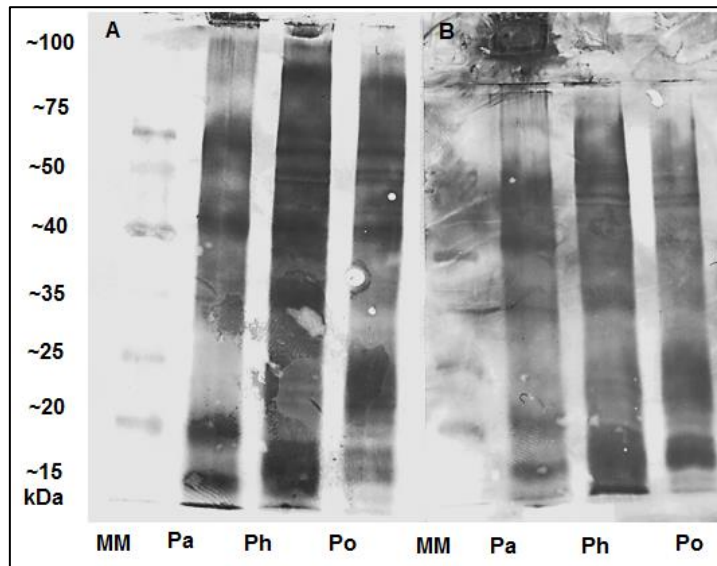


Figura 19 – Avaliação da reatividade antigênica entre o soro de coelhos anti-muco *Paratrygon aiereba* contra os mucos de *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi* por WB. A) Membrana de nitrocelulose incubada com soro anti-muco nativo. B) Membrana de nitrocelulose incubada com soro anti-muco irradiado. MM – Massa molecular; Pa – Muco de *Paratrygon aiereba*; Ph – Muco de *Potamotrygon henlei*; Muco de *Potamotrygon orbignyi*.

Os anticorpos anti-muco nativo e irradiado de *Paratrygon aiereba* reconheceram várias bandas proteicas, tanto no muco de *Paratrygon aiereba* quanto no muco das outras duas espécies de raias, *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi*. Esse resultado foi observado nos soros produzidos por camundongos e coelhos.

4.2.5. Indução da produção de anticorpos *in vitro* (IVIAP)

A produção *in vitro* de anticorpos de camundongos Swiss foi realizada a partir da cultura de células do baço estimuladas pelo muco de *Paratrygon aiereba*, comparando as respostas dos grupos previamente imunizados contra o muco nativo (n=3), irradiado (n=3) e não imunizado (n=3) (Figura 21).

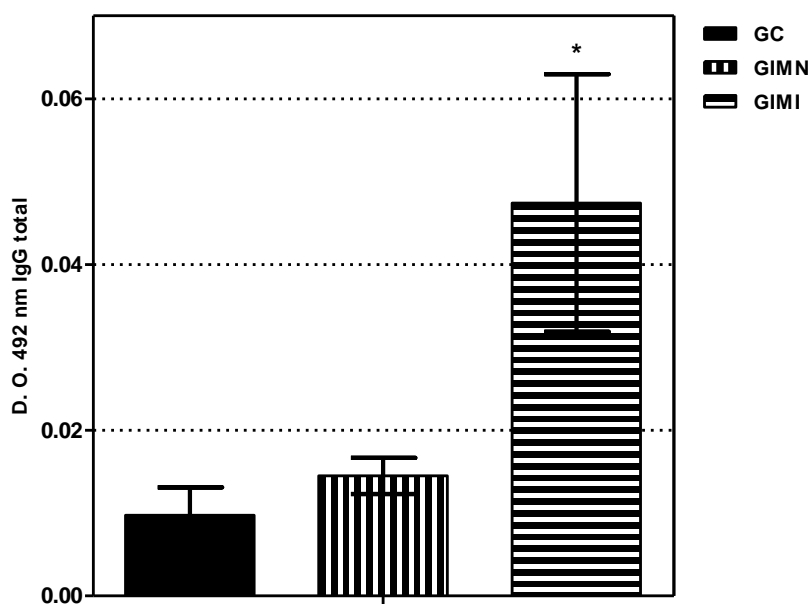


Figura 21 – Produção *in vitro* de anticorpos IgG por linfócitos esplênicos de camundongos Swiss frente ao muco de *Paratrygon aiereba*. GC – Grupo controle (não imunizado); GIMN – Grupo imunizado com muco nativo; GIMI - Grupo imunizado com muco irradiado. Cada barra representa a média da D.O. (triplicata) e erro padrão de média, o asterisco indica diferença significativa (* $p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

Ao confrontar o resultado entre os grupos em resposta ao estímulo do muco nativo de *Paratrygon aiereba*, foi detectado maior produção de IgG pelas células do baço dos animais previamente imunizados contra o muco irradiado ($p < 0,05$).

4.2.6. Indução de citocinas pelo muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba*

A resposta imune celular induzida pelo muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba* foi verificada a partir da quantificação de citocinas séricas e esplênicas utilizando o kit CBA.

4.2.6.1.1. Produção de citocinas por células esplênicas

As citocinas produzidas por linfócitos esplênicos em resposta ao estímulo do muco, foram analisadas comparando-se os resultados encontrados nos grupos previamente imunizados contra o muco nativo ou irradiado e grupo não imunizado (Fig. 22).

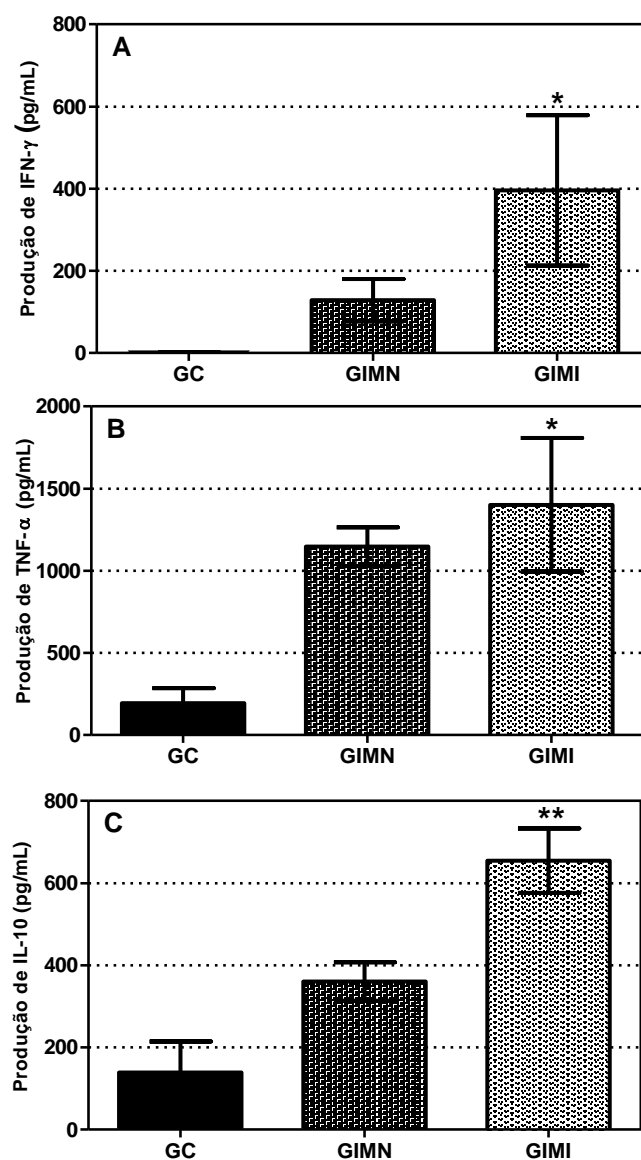


Figura 22 – Expressão de citocinas (pg/mL) por células esplênicas de camundongos Swiss imunizados contra o muco nativo (n=3) ou irradiado (n=3) de *Paratrygon aiereba*. IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-10 (C). GC – Grupo controle (não imunizado); GIMN – Grupo imunizado com muco nativo; GIMI - Grupo imunizado com muco irradiado. Barras representam as médias e erro padrão de média, os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: *p<0,05 e ** p<0,01.

Foi observada a produção significativa de IL-10 (p<0,01), IFN- γ e TNF- α (p<0,05) nas culturas esplênicas de camundongos imunizados contra o muco irradiado de *Paratrygon aiereba* e estimuladas com o muco. Já a produção das citocinas IL-2, IL-6 e IL-17A não foram significativas.

4.2.6.1.2. Detecção de citocinas séricas

No soro dos camundongos imunizados contra o muco irradiado foi detectada maior produção de TNF- α ($p < 0,05$), enquanto com o muco nativo foi verificada IL-17A e IL-6 ($p < 0,05$) (Fig. 23).

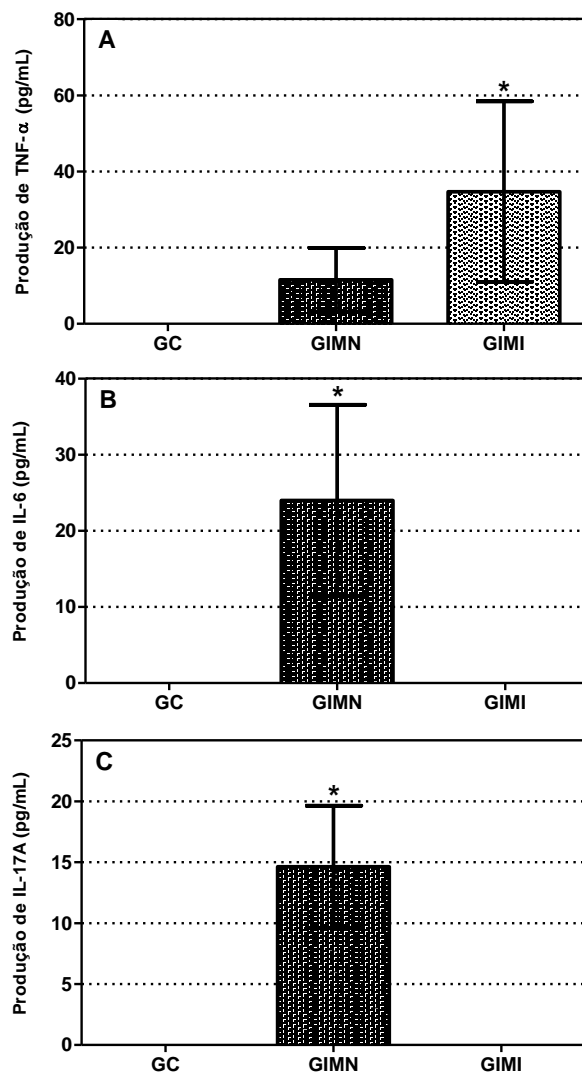


Figura 23 – Expressão sérica de citocinas (pg/mL) de camundongos Swiss imunizados contra o muco nativo ($n=3$) ou irradiado ($n=3$) de *Paratrygon aiereba*. TNF- α (A); IL-6 (B); IL-17A (C). GC – Grupo controle (não imunizado); GIMN – Grupo imunizado com muco nativo; GIMI - Grupo imunizado com muco irradiado. Barras representam as médias e erro padrão de média, os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0,05$.

Não foi observada diferença significativa para IL-4 entre os grupos ($p>0,05$) e não foram detectadas IL-2, IFN- γ e IL-10 séricas.

4.3. Avaliação da citotoxicidade do muco de *Paratrygon aiereba*

A citotoxicidade do muco nativo de *Paratrygon aiereba* foi avaliada mediante a viabilidade celular de fibroblastos de camundongos frente ao muco (Fig. 24).

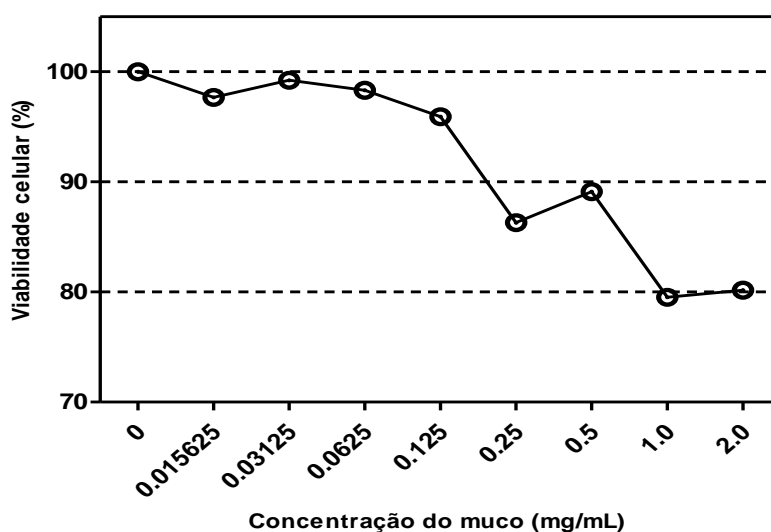


Figura 24 – Viabilidade celular (%) a diferentes concentrações do muco de *Paratrygon aiereba*. Cada ponto representa a média da D.O.

Pelos dados da viabilidade celular, o muco de *Paratrygon aiereba* não apresentou citotoxicidade. A viabilidade celular manteve-se igual ou acima de 80% nas concentrações de 0,015625 a 2,0 mg/mL, demonstrando que não houve comportamento citotóxico nas condições testadas.

4.4. Avaliação da capacidade neutralizante dos soros anti-muco da raia em estudo contra a atividade edematogênica induzida

4.4.1. Soroneutralização do edema *in vitro*

O muco (50µg/mL) de *Paratrygon aiereba*, utilizado como controle positivo, foi capaz de induzir edema de 1h a 4h após a inoculação, com declínio de 4 a 24h ($p < 0,01$ em relação aos controles) (Fig. 25).

O soro anti-muco nativo incubado previamente com o muco não foi capaz de inibir o edema nas diluições testadas (1:100 e 1:1.000), sem diferença estatística com o edema induzido pelo muco ($p > 0,05$) (Fig. 25A).

Já o soro anti-muco irradiado previamente incubado com o muco, diluído 1:100 apresentou interferência significativa na atividade edematogênica nas primeiras quatro horas ($p < 0,01$). E na diluição de 1:1.000 foi capaz de reduzir a formação de edema nas 1^a e 4^a horas ($p < 0,01$) (Fig. 25B). O soro anti-muco irradiado não neutralizou a atividade edematogênica, mas foi capaz de reduzir o edema.

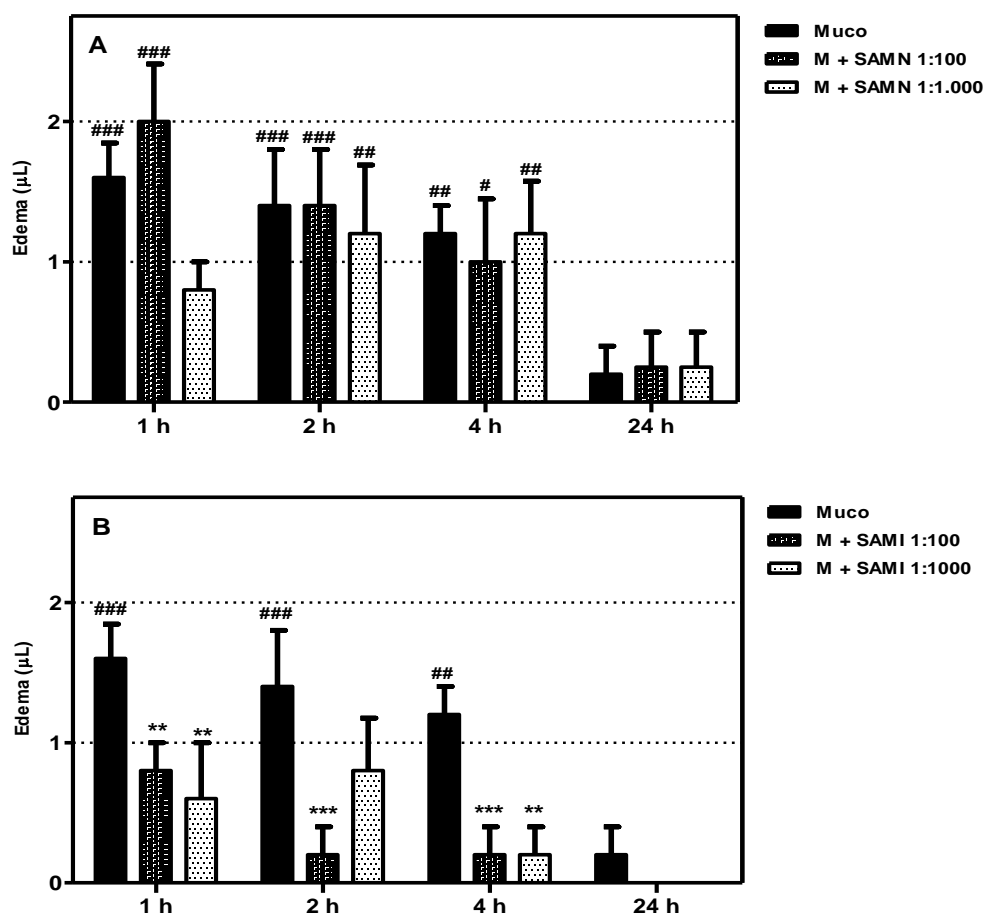


Figura 25 – Comparação da soroneutralização *in vitro* da atividade edematogênica induzida em camundongos Swiss (n=25) pelo muco (50µg) de *Paratrygon aiereba* incubado previamente com o soro anti-muco nativo ou irradiado produzido por coelhos. A) Soro anti-muco nativo de *Paratrygon aiereba*; B) Soro anti-muco irradiado de *Paratrygon aiereba*. M + SAM N – Muco (50µg) mais soro anti-muco nativo; M + SAM I – Muco (50µg) mais soro anti-muco irradiado. Cada barra representa a média das leituras no pletismômetro e o erro padrão de média. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao muco (50µg) de *Paratrygon aiereba*: ** p<0,01 e *** p<0,001. Cerquilhas indicam diferença significativa em relação à solução salina 0,9%: ## p<0,01 e ### p<0,001.

4.4.2. Soroneutralização do edema *in vivo*

Na Figura 26 segue o resultado da comparação entre os grupos que receberam muco ou solução salina.

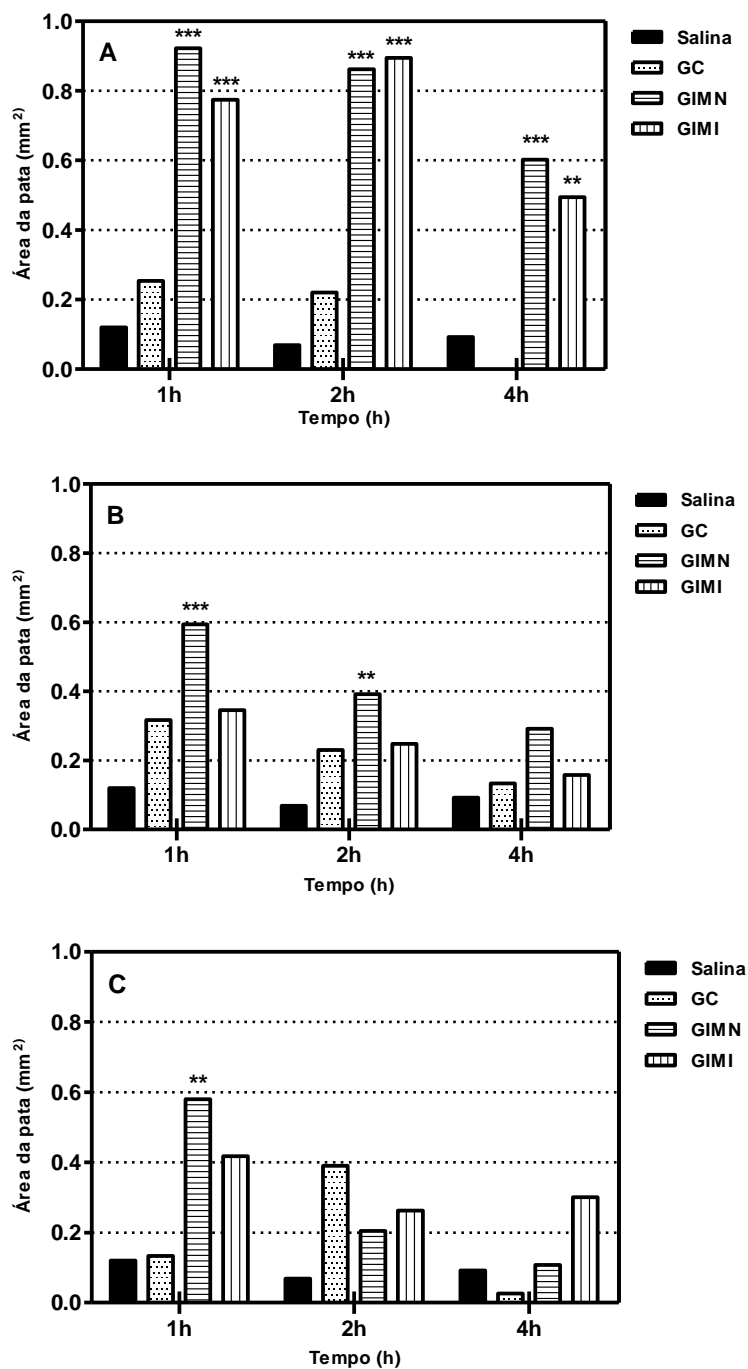


Figura 26 – Soroneutralização *in vivo* do edema. A – Edema induzido pelo muco de *P. aiereba*; B - Edema induzido pelo muco de *P. henlei*; C - Edema induzido pelo muco de *P. orbigny*. GC - Grupo não imunizado; GIMN – Grupo imunizado contra o muco nativo de *P. aiereba*; GIMI - Grupo imunizado contra o muco irradiado de *P. aiereba*. Cada barra representa a média das leituras e o erro padrão de média. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os anticorpos anti-muco *Paratrygon aiereba* se mostraram ineficazes na soroneutralização *in vivo* do edema induzido pelos mucos das raias *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi* (Fig. 26A).

O edema induzido pelo muco de *Paratrygon aiereba* apresentou diferença estatística relevante nos grupos imunizados contra o muco nativo ou irradiado em relação ao grupo não imunizado nas primeiras 4 horas ($p < 0,001$).

O edema induzido por *Potamotrygon henlei* e *Potamotrygon orbignyi* nos grupos imunizados previamente contra o muco nativo de *Paratrygon aiereba*, apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo não imunizado na primeira hora ($p < 0,05$). Não houve diferença expressiva entre os grupos não imunizados e os grupos imunizados contra o muco irradiado ($p > 0,05$) (Fig. 26B e C).

5. DISCUSSÃO

Para a realização deste trabalho, grupos de animais foram imunizados contra a peçonha da raia de água doce *Paratrygon aiereba*, onde o muco ou veneno foram inoculados por via intradérmica, e na primeira dose das imunizações foi utilizado adjuvante de Freund incompleto (formulação com óleo mineral sem produto bacteriano). Os adjuvantes são empregados para estimular reações imunes inatas no local de exposição ao antígeno, liberando lentamente o antígeno e aumentando a eficiência da imunização (Alter; Sekaly, 2015).

As imunizações foram realizadas a partir de quatro doses quinzenais com o intuito de induzir uma resposta imune adaptativa, ou seja, verificar se a peçonha da raia em estudo é capaz de induzir uma resposta específica e ser reconhecida pelo sistema imunológico.

O reconhecimento de antígenos proteicos administrados com adjuvantes por células apresentadoras de antígeno (APC), como as células dendríticas (CD), são mediadas por linfócitos T auxiliares (CD4+) (Alter; Sekaly, 2015). Esses antígenos são internalizados em vesículas, processados e apresentados em associação às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Goldberg; Rizzo, 2014). A resposta imune que é desencadeada a partir da ativação dos linfócitos T podem ser de dois tipos: resposta imune humoral, mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B antígenos-específicos; e resposta imune celular, caracterizada por linfócitos T efetores e produção de citocinas (Mosmann et al., 1989).

Nesse seguimento, foram realizados ensaios para verificar a capacidade antigênica do muco e do veneno de *Paratrygon aiereba*. O ELISA indireto foi empregado para a pesquisa de anticorpos IgG, em que os antígenos, no caso o muco ou o veneno de *Paratrygon aiereba*, foram imobilizados nos poços da microplaca e reagiram com as IgGs presentes nos soros dos animais imunizados. Já o *Western blotting*, foi empregado para verificar se os anticorpos anti-muco ou anti-veneno seriam capazes de reconhecer bandas proteicas específicas no muco ou veneno (Ferreira; Moraes, 2013).

A partir da realização desses ensaios foi possível verificar que tanto o muco quanto o veneno de *Paratrygon aiereba* são antigênicos, estimularam a produção de anticorpos, e que esta capacidade antigênica provavelmente se

deve ao fato que venenos animais, inclusive de peixes, são compostos por uma variedade de proteínas e peptídeos biologicamente ativos (Conceição et al., 2006; 2009; 2011; Saraiva et al., 2011; Komegae et al., 2013; Ziegman; Alewood, 2015).

Muco e veneno também apresentaram reatividade antigênica cruzada. A presença de proteínas específicas reconhecidas por anticorpos anti-muco e anti-veneno indicam que as proteínas do muco do dorso e do ferrão podem ser consideradas determinantes antigênicos ou epítomos, além de sugerir que essas proteínas imunogênicas apresentam composição análoga.

Monteiros-dos-Santos e colaboradores (2011) relataram que o muco e o veneno da raia *Potamotrygon henlei* desencadeiam os sintomas do envenenamento em animais e apresentam perfil proteico similar, coincidindo com os estudos de Lameiras et al. (2014) para a raia *Plesiotrygon* e que vão ao encontro dos resultados encontrados neste trabalho para o muco e o veneno de *Paratrygon aiereba*.

A partir da verificação de que o muco foi capaz de estimular resposta imune humoral e de apresentar reatividade antigênica contra o veneno, optou-se por dar continuidade à pesquisa utilizando apenas o muco, visto que este está presente em maiores quantidades neste animal, sua obtenção é mais fácil e também por implicar no emprego de um menor número de espécimes de raias para a obtenção das amostras.

Deste modo, foi dado início à segunda etapa de imunização. Camundongos *Swiss* e coelhos *New Zealand* foram submetidos a exposições subsequentes de muco nativo ou irradiado a 2kGy com raios gama de ^{60}Co .

A produção de anticorpos IgG, que são predominantes em respostas imunes adaptativas e que foi altamente significativa tanto com o muco nativo quanto com o muco irradiado nos camundongos e coelhos estudados, sugerem a possibilidade de memória imunológica.

Nos soros dos camundongos foi verificado que depois da 2^a, 3^a e 4^a doses, a concentração de anticorpos anti-muco nativo foi maior que anti-muco irradiado. Nos coelhos também foi detectada uma maior concentração de anticorpos IgG em resposta ao muco nativo, com exceção da 3.^a dose. E a partir da 1^a dose os coelhos produziram IgG com altos títulos, diferentemente dos camundongos.

Normalmente, coelhos são utilizados como modelos experimentais para a produção de antissoro policlonal por serem bons respondedores imunológicos (Burns, 2005). E diferenças da resposta imune entre diferentes modelos experimentais foram observadas por Martín e colaboradores (2015), que verificaram que coelhos desenvolveram resposta humoral mais rápida do que camundongos ao *Phlebotomus perniciosus*.

Apesar do soro anti-muco irradiado ter apresentado uma concentração de anticorpos IgG menor, é importante destacar que: a) o muco irradiado estimulou resposta imunológica específica nos animais imunizados ativamente; b) a concentração de anticorpos anti-muco irradiado é significativa em relação ao soro controle (animais não imunizados); c) o soro anti-muco irradiado respondeu ao muco nativo.

A irradiação do muco por raios gama de ^{60}Co justifica-se a partir de trabalhos publicados anteriormente por nosso grupo, demonstrando que as radiações ionizantes promovem alterações físico-químicas nas moléculas de proteínas de venenos de serpentes e toxinas isoladas, atenuando a atividade proteolítica de toxinas e mantendo suas propriedades imunológicas (Nascimento et al., 1996; Boni-Mitake et al., 2001; Camilo et al., 2005; Alves, 2009; Caproni et al., 2009; Ferreira Jr. et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Rocha, 2016).

Além disso, a radiação gama tem se demonstrado útil na atenuação ou esterilização de agentes biológicos dos mais variados tipos, por promover a perda da capacidade reprodutiva, no caso de parasitas intracelulares e outros microrganismos, (Hiramoto, 2002), mantendo o potencial imunogênico adequado (Costa, 2013; Zorgi et al., 2016).

A resposta imune humoral desencadeada pelo muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba* também foi constatada através da proliferação de esplenócitos estimulados com o muco *in vitro* (IVIAP). As células esplênicas de camundongos (imunizados com muco nativo ou irradiado e não imunizados) tiveram o seu crescimento reestimulado frente ao muco, corroborando a capacidade deste de induzir resposta imunológica adaptativa, um componente importante para a imunidade humoral (Mesquita Jr. et al., 2010).

Apesar dos níveis de anticorpos quantificados no IVIAP terem sido menores que os do ELISA, podemos destacar a capacidade dos anticorpos anti-muco irradiado de reconhecer e responder ao muco na sua forma nativa, e dos

esplenócitos dos animais imunizados contra o muco irradiado serem mais responsivos do que os demais grupos (imunizados contra o muco nativo e não imunizados). Esses dados estão de acordo com trabalhos que utilizam a irradiação de toxinas ou venenos de serpentes e de parasitas, pois a radiação gama é capaz de melhorar as propriedades imunogênicas destes compostos (Camilo et al., 2005; Zorgi et al., 2016). E assim como no trabalho desenvolvido por Hiramoto (2002), investigando a produção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* após a imunização com taquizoítos irradiados, os títulos de anticorpos resultantes do ensaio por *IVIAP* também foi inferior aos do ELISA, assim como neste estudo.

Foi observado um equilíbrio entre as quantidades de IgG1 e IgG2b séricas nos grupos imunizados contra o muco nativo e irradiado. Alguns estudos reportam que as subclasses IgG1 e IgG2b comportam-se como anticorpos líticos (Stefani et al., 1983; Lima Martins et al., 1985; Pyrrho et al., 1998). Já em relação à IgG2a, a concentração desta imunoglobulina foi maior no grupo imunizado contra o muco nativo. O isotipo IgG2a desempenha um papel crítico em condições patológicas e imunitárias protetoras em camundongos (Savitsky et al., 2010).

A subclasse IgG1 está relacionada com a predominância de respostas de células T *helper* do tipo 2 (Th2) a antígenos proteicos e reações mediadas por IgE (Baudino et al., 2008), participação na imunidade humoral, auxiliando a produção de anticorpos por linfócitos B (Sprent; Surh, 2002). IgG2 relaciona-se com a função das células T *helper* do tipo 1 (Th1), como a ativação de macrófagos, opsonização e ativação do complemento. IgG2a e IgG2b são as subclasses mais predominantes em autoimunidade, inflamação, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e contra patógenos intracelulares (Baudino et al., 2008; Nimmerjahn et al., 2010).

A literatura reporta a predominância da subclasse IgG2 e resposta Th1 para proteínas irradiadas, pelo fato destas células estarem envolvidas na ativação de macrófagos (Cardi et al., 1998; Delves; Roitt, 2000; Alves, 2009). No presente estudo, porém, o muco irradiado de *Paratrygon aiereba* induziu a produção de IgG1, IgG2a e IgG2b, ou seja, não houve polarização da resposta de células T.

Camundongos da linhagem *Swiss* não apresentam uniformidade genética (heterogênicos ou *outbreed*) e são empregados na indução da produção de

anticorpos por, geralmente, responder com altos títulos de anticorpos e diferentes subclasses de imunoglobulinas (Andrade et al., 2002), diferentemente de outras linhagens (isogênicas ou *inbred*) que apresentam polarização de resposta para Th1 ou Th2 (Matsushita, Katz, 1992).

Desta forma, as características genéticas do modelo de roedor escolhido (*outbred*) pode explicar o padrão de resposta Th1/Th2 encontrado neste trabalho para o muco nativo e irradiado.

As citocinas são mediadores proteicos solúveis que conduzem uma rede complexa de interações celulares, as quais regulam a imunidade celular, a humoral e a resposta inflamatória de fase aguda (Tarrant, 2010). As subclasses de IgG dependem da expressão de citocinas (Nimmerjahn; Ravetch, 2005), assim como os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em subtipos de células efetoras (Th1, Th2 ou Th17) em resposta a citocinas (Tarrant, 2010).

Nessa direção, a expressão de citocinas foi examinada pelo kit comercial CBA, um imunoenensaio utilizado para quantificar a expressão de citocinas comumente associadas a respostas celulares Th1/Th2/Th17 (Morgan et al., 2004), a fim de verificar o perfil da resposta imunológica adaptativa induzida pelo muco nativo ou irradiado de *Paratrygon aiereba*.

Os níveis de citocinas esplênicas encontrados foram: a) no grupo imunizado contra o muco irradiado verificou-se uma resposta imune celular com maiores níveis de TNF- α produzido pelas células do baço, seguido de IL-10 e IFN- γ . TNF- α e IFN- γ são produzidos por células Th1, enquanto IL-10 é produzida por células Th2 (Kidd, 2003); b) o grupo imunizado contra o muco nativo produziu níveis baixos destas citocinas pelas células esplênicas semelhante ao grupo não imunizado; c) os níveis das citocinas IL-2, IL-6 e IL-17A não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (imunizados com muco nativo ou irradiado e não imunizado); d) não foi detectada a produção de IL-4 por nenhum grupo.

Já os níveis das citocinas séricas foram: a) o muco irradiado induziu maior expressão de TNF- α , que é produzido por células Th1; b) o muco nativo induziu mais IL-6 e IL-17A, ambas citocinas induzem resposta Th17 (Kim; Park; Chung, 2016); c) não foram detectadas as produções de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos três grupos.

Relacionando os resultados dos níveis de citocinas com as subclasses de IgG pesquisadas, é possível aferir que: a) o muco irradiado induziu as subclasses IgG1, IgG2b e menor concentração de IgG2a; b) as citocinas séricas e esplênicas produzidas nos grupos imunizados contra o muco irradiado estão relacionadas com respostas Th1 (TNF- α e IFN- γ) e Th2 (IL-10). Este resultado indica uma possível resposta imune integrada Th1/Th2 (Lopes-Ferreira; Grund; Lima, 2014).

O resultado obtido pelo *IVIAP* corrobora os resultados da dosagem de citocinas esplênicas em resposta ao muco irradiado. Neste ensaio o grupo imunizado contra o muco irradiado foi mais responsivo ao muco do que os demais grupos, o que vai ao encontro do resultado da dosagem de citocinas produzidas por células esplênicas, em que o grupo de animais imunizados contra o muco irradiado foi mais responsivo, produzindo mais citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) que os outros grupos.

O muco nativo induziu as subclasses IgG1, IgG2b e menor concentração de IgG2a, o que levaria a uma resposta balanceada Th1/Th2 (Balkwill, 2000), e na expressão de citocinas séricas foi verificada uma tendência de resposta Th17 (Oliveira et al., 2011).

O mecanismo através do qual as citocinas induzem a diferenciação seletiva das células T CD4⁺ em Th1 e Th2 não é totalmente conhecido. Mas sabe-se que elas podem agir quando a célula T é ativada pela primeira vez por uma APC ou durante a fase proliferativa (Smith et al., 2006). A natureza do antígeno, como no caso deste trabalho, uma proteína nativa ou irradiada, pode desempenhar um papel importante no direcionamento da resposta imune desencadeada.

Conforme os resultados encontrados, é possível notar que os animais apresentaram um perfil Th1 e Th2. Resultado similar foi relatado pelo grupo de Lopes-Ferreira, que demonstrou a capacidade do veneno total do peixe marinho niquim (*Thalassophryne natterii*) de estimular respostas imunes balanceadas Th1/Th2, atribuindo a toxinas isoladas a indução de Th1 ou Th2. A toxina *Nattectina* induz resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ e IgG2a (Saraiva et al., 2011) e uma outra toxina, a *Natterina*, induz resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de IgG1 (Lopes-Ferreira; Grund; Lima, 2014).

Células Th1 quando são estimuladas secretam IFN- γ , uma das citocinas esplênicas produzidas pelos animais imunizados contra o muco irradiado em

resposta ao reestímulo do muco. A IFN- γ estimula a proliferação, diferenciação de linfócitos B e promove a mudança de subclasses de IgG (Smith; Denning, 201), como observado neste trabalho.

O muco irradiado estimulou a produção de TNF- α no soro de animais imunizados e no sobrenadante da cultura de esplenócitos. Esta citocina é produzida por células Th1 e é o principal mediador da resposta inflamatória aguda (Balkwill, 2000), estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação e ativa essas células. Também induz a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina e VCAM-1 pelas células endoteliais, a secreção de quimiocinas pelo endotélio e por macrófagos, a produção da citocina IL-1 β por fagócitos mononucleares (Balkwill, 2001), induz a produção de IL-6 (Littlewood et al., 1991) e desempenha funções importantes na hiperalgesia inflamatória e neuropática (Oliveira et al., 2011).

As células do baço dos camundongos imunizados contra o muco irradiado também induziram a produção de IL-10. A produção desta citocina resulta na ativação de células Th2. Além de aumentar a proliferação de mastócitos e impedir a produção de IFN- γ pelas células NK (Oliveira et al., 2011).

A IL-6, uma das citocinas séricas encontradas no grupo de animais imunizados contra muco nativo, é pró-inflamatória, relacionada com a regulação de células Th17. É um potente indutor de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, age nos linfócitos B para a proliferação de células produtoras de anticorpos (Heinrich; Castell; Andus, 1990), atuando na imunidade inata e adaptativa (Van Der Poll; Van Deventer, 1998). Está associada a doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas (Drutskaya et al. 2016; Esenwa; Elkind, 2016). TNF- α e IL-1 são potentes indutores desta citocina (Oliveira et al., 2011).

Células Th17 produzem IL-17, responsável pela ação inflamatória dessas células. Esta citocina também foi detectada no soro de animais imunizados contra o muco nativo. A IL-17 tem ligação entre a imunidade adaptativa mediada por células T e sistema imunológico inato, principalmente pelo componente inflamatório das respostas inatas. Tem relação com inflamação crônica e doenças auto-imunes (Kim, Park, Chung, 2016). Estimula a produção de TNF- α e de IL-6, que recruta neutrófilos para os sítios de ativação de células T e inflamação, desempenhando a função efetora das células Th17, que é induzir a

inflamação neutrofílica, que faz parte da resposta imune adaptativa (Oliveira et al., 2011).

A pesquisa de citocinas e quimiocinas induzidas pela peçonha de raias de água doce foi relatada na literatura. Monteiro dos Santos et al. (2011) verificou a indução de IL-1, IL-6 e KC pelo muco e veneno de *Potamotrygon henlei* e de MCP-1 apenas pelo veneno. E em 2014, Kimura e colaboradores verificaram a indução pelo veneno de *Potamotrygon motoro* de IL-6, KC e MCP-1. Em ambos trabalhos os ensaios foram realizados a partir da inoculação da peçonha na pata de camundongos e as cito/quimiocinas detectadas por ELISA.

Apesar de terem sido empregados métodos diferentes, também foi verificada a expressão de IL-6 sérica neste trabalho, uma citocina pró-inflamatória, no grupo imunizado contra o muco nativo.

Peçonhas de outros animais também foram descritas como indutoras da produção de citocinas e quimiocinas, como a peçonha dos peixes *Thalassophryne nattereri* e *T. maculosa*, as quais induziram a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Lima et al., 2003; Pareja-Santos et al., 2008), o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) (Cruz et al., 2008), da aranha *Loxocles gaucho* (IL-6, MCP-1 e KC) (Barbaro et al., 2010).

Alves (2009) verificou que a Bothropstoxina-1 (BTHX-1) uma das toxinas da serpente *Bothrops jararacussu* irradiada induz a expressão de IFN- γ e IL-2, em camundongos isogênicos, ou seja, padrão de resposta Th1. As células do baço do grupo imunizado contra o muco irradiado de *Paratrygon aiereba* também produziram IFN- γ .

Outro aspecto dos soros anti-muco nativo e irradiado por ^{60}Co de *Paratrygon aiereba* também foi analisado. A reatividade antigênica do soro de camundongos e coelhos foi constatada por ELISA e WB contra o muco de *Paratrygon aiereba* e de outras espécies de raias de água doce, comumente encontradas na bacia dos rios Tocantins/Araguaia e relacionadas com acidentes em humanos, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*.

Esses resultados são importantes, uma vez que o soro anti-muco *Paratrygon aiereba* foi capaz de reconhecer epítomos do muco de *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon henlei*. No caso da viabilidade de um soro antirraia, é imprescindível que este soro seja eficaz contra várias espécies, já que a

identificação da espécie do animal responsável pelo acidente não é possível na maioria das vezes.

Outro fato observado foi que os soros anti-muco irradiado produzidos por camundongos e coelhos reconheceram determinantes antigênicos do muco das três raias citadas, ou seja, houve a manutenção da imunogenicidade do muco após o processo de irradiação, corroborando o fato de que a irradiação mantém as propriedades imunogênicas de compostos proteicos (Caproni et al., 2009).

A reatividade antigênica cruzada também foi verificada por Barbaro e equipe (2007), que observaram que o veneno de *Potamotrygon falkneri* e da raia marinha *Dasyatis guttata* induziram a formação de anticorpos em coelhos e apresentaram reatividade antigênica cruzada entre eles.

Adicionalmente aos resultados discutidos até o momento, foi averiguada a citotoxicidade do muco de *Paratrygon aiereba*, indicando não ser citotóxico por não interferir na viabilidade celular na metodologia e concentrações testadas, conforme Barltrop et al. (1991).

Diversos trabalhos tratam da caracterização da inflamação, uma das reações mais frequentes no envenenamento por raias. Monteiro-dos-Santos e colaboradores (2011) confirmaram a presença de mediadores inflamatórios e alterações na microcirculação induzida pelo muco e veneno de *Potamotrygon henlei*. Kimura et al. (2014; 2015) verificaram a capacidade de indução de edema no local da inoculação do veneno de *Potamotrygon motoro*, aumento do número de leucócitos, mediadores da inflamação, participação de mastócitos, histamina e produtos oriundos da cicloxigenase.

Agrupando os resultados de trabalhos experimentais, como os citados anteriormente, ao quadro clínico observado nas vítimas de acidentes por raias, os principais problemas decorrentes das ferroadas por esses peixes podem ser resumidos em dor, edema e necrose (Garrone Neto; Haddad Jr. 2010; Monteiro-dos-Santos et al, 2014).

A partir da obtenção do soro anti-muco de *Paratrygon aiereba* com títulos satisfatórios de IgG, foi verificada a capacidade de soroneutralização da atividade edematogênica induzida pelo muco da raia em estudo, uma vez que o edema faz parte de um dos problemas decorrentes do acidente por raias (Garrone Neto; Haddad Jr. 2010; Silva Jr. et al., 2015).

A soroterapia é empregada para neutralização de veneno inoculado após acidente por animal peçonhento e neste tipo de tratamento são empregados soros heterólogos, ou seja, produzidos pela sensibilização de espécies diferentes da qual receberá o soro anti-veneno como tratamento (Brasil, 2001). Na soroneutralização *in vitro* o edema foi induzido em camundongos pelo muco de *Paratrygon aiereba* e o soro anti-muco empregado foi produzido por coelhos.

O muco de *Paratrygon aiereba* induziu atividade edematogênica até 4h após a inoculação nos camundongos. Resultados similares para outras espécies de raias estão na literatura (Monteiro-dos-Santos et al., 2011; Kimura et al., 2014).

O soro anti-muco nativo de *Paratrygon aiereba* não inibiu a atividade edematogênica do muco. Por outro lado, o soro anti-muco irradiado mostrou importante redução do edema podal. Apesar do edema não ter sido neutralizado, o soro anti-muco irradiado pré-incubado com o muco foi capaz de reduzir a atividade edematogênica do muco.

Esse resultado mostra que além do muco irradiado a 2kGy ser capaz de estimular a produção de anticorpos específicos, estas imunoglobulinas são capazes de reconhecer algum composto do muco que é responsável pela atividade edematogênica, pois no muco deve haver a presença de agente responsável pelo edema que é antigênico.

Possivelmente, o processo de irradiação do muco de *Paratrygon aiereba* resultou num composto mais antigênico (Camilo et al., 2005), pois as proteínas irradiadas sofrem modificações diretas ou indiretas causadas pela radiólise da água podendo gerar agregados pela indução da quebra de cadeias polipeptídicas tornando-a mais imunogênica (Nascimento et al., 1996).

A investigação da habilidade de anticorpos preexistentes de neutralizar o edema, ou seja, a soroneutralização *in vivo* do edema induzido pelo muco de diferentes espécies de raias, mostrou atividade edematogênica rápida e intensa induzida pelo muco nos animais que possuíam anticorpos específicos contra o muco de *Paratrygon aiereba*, sugerindo uma reação de hipersensibilidade. As reações de hipersensibilidade podem ocorrer a partir da exposição repetida a um antígeno, com intensa indução de resposta Th2, mediadas por IgE e pela liberação de mediadores inflamatórios (Abbas; Lichtman; Pillai, 2011).

A neutralização de sintomas locais do envenenamento tem sido alvo de pesquisas. Rucavado e Lomonte (1996) verificaram que efeitos locais como edema, hemorragia e miotoxicidade causados pelo veneno de *Bothrops asper* não são abolidos em animais pré-imunizados, apenas reduzidos, corroborando os achados de Gutierrez et al. (1998). Em coelhos imunizados contra o veneno de *Loxosceles*, Guimarães et al. (2013) também não obtiveram neutralização do edema. Lopes-Ferreira e colaboradores (2000) e Piran-Soares et al. (2007), relataram neutralização da nocicepção, necrose e de alterações na microcirculação em camundongos previamente imunizados contra o veneno de *Thalassophryne natterii*, mas não houve neutralização do edema. E em 2008, Soliani obteve neutralização parcial do edema e da nocicepção provocados por *Potamotrygon orbignyi*.

Uma provável explicação para a neutralização insuficiente de danos locais por anti-venenos seria pelo fato de que logo após a inoculação do veneno, ocorre uma rápida liberação de mediadores endógenos envolvidos com os danos locais, ou seja, até os anticorpos atingirem os tecidos afetados os mecanismos inflamatórios já foram iniciados (Picolo et al., 2002). Outro ponto é a concentração de anticorpos nos tecidos não ser suficiente para neutralizar as toxinas que atuam localmente, em que a utilização de fragmentos de anticorpos poderia atingir os tecidos mais rapidamente do que o anticorpo total (Gutierrez et al., 1998).

Finalmente, os dados deste trabalho permitem sugerir que existe a possibilidade de um soro antirraia, a partir da comprovação, por trabalhos futuros, de soroneutralização de outros sintomas, como da nocicepção e necrose. Os resultados aqui apresentados são inéditos e corroboram com trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de que a radiação ionizante é capaz de manter as propriedades antigênicas originais, com produção de anticorpos altamente responsivos e melhor resposta imunológica. O protocolo de imunização empregado neste trabalho permitiu comprovar que o muco da raia *Paratrygon aiereba* é capaz de induzir resposta imune adaptativa celular e humoral em animais imunizados ativamente.

6. CONCLUSÕES

- O protocolo de imunização possibilitou a obtenção de soros com títulos satisfatórios de anticorpos policlonais.
- O muco e o veneno de *Paratrygon aiereba* são imunogênicos e apresentam reatividade antigênica cruzada.
- O muco de *Paratrygon aiereba* irradiado a 2kGy por raios gama de ^{60}Co é imunogênico.
- O soro anti-muco irradiado de *Paratrygon aiereba* é capaz de responder ao muco nativo.
- Os anticorpos específicos estimulados em camundongos e coelhos em resposta ao muco nativo ou irradiado foram capazes de reconhecer antígenos presentes no muco de outras espécies de raias.
- Houve proliferação de células B *in vitro* por células esplênicas de camundongos imunizados contra o muco irradiado.
- Nos soros anti-muco nativo e irradiado verificou-se um balanço de resposta Th1/Th2 pela dosagem das subclasses de IgGs.
- Células do baço de camundongos imunizados contra o muco irradiado responderam ao antígeno, com produção significativa das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10.
- No soro de camundongos imunizados contra o muco irradiado houve expressão de TNF- α , e no grupo imunizado contra o muco nativo de IL-6 e IL-17.
- O soro anti-muco irradiado a 2kGy por raios gama de ^{60}Co foi capaz de reduzir a atividade edematogênica induzida pelo muco de *Paratrygon aiereba* *in vitro*.
- A atividade edematogênica avaliada em animais pré-imunizados não foi neutralizada, tampouco reduzida.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Abib L, Laraba-Djebari F. **Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom**. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003;81:118-24.

Aguiar AA, Valentin, JL. **Biologia e ecologia alimentar de elasmobrânquios (*Chondrichthyes: Elasmobranchii*): uma revisão dos métodos e do estado da arte no Brasil**. *Oecologia Australis*. 2010;14 (2):464-489.

Allen T. **Shark Attacks: their causes and avoidance**. New York: The Lyons Press, 2001; 285 p.

Almeida MP, Lins PMO, Charvet-Almeida P, Barthem RB. **Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*) on Marajó Island (Pará, Brazil)**. *J. Biol.* 2010; 70(1):155-162.

Alter G, Sekaly, RP. **Beyond adjuvants: antagonizing inflammation to enhance vaccine immunity**. *Vaccine*. 2015; 33:B55-B59.

Alves JB . **Resposta imune frente à Bothropstoxina-1 irradiada com ⁶⁰Co: identificação das principais citocinas envolvidas e a participação de substâncias scavengers**. 2009. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388p

Andriani E.P. **Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas** 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Antoniuzzi MM, Benvenuti L, Lira MS, Jared SGS, Garrone Neto D, Jared C, Barbaro KC. **Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays**. *Toxicon*. 2011; 57:297–303.

Araújo M, Charvet-Almeida P, Almeida MP, Pereira H. **Freshwater stingrays (*Potamotrygonidae*): status, conservation and management challenges**. *Information document AC*. 2004; 20:1-6.

Atkinson PRT, Boyle A, Hartin D, Mcauley D. **Is hot water immersion an effective treatment for marine envenomation?** *Emerg Med J*. 2006;23(7): 503–508.

Balkwill F. *The Cytokine Network*. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Balkwill F. **Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?** Cytokine & Growth Factor Reviews. 2001;13:135-141.

Barbarino A, Lasso CA. **Pesquería y aspectos biológicos de la raya manta *Paratrygon aiereba* (Müller y Henle, 1841) (*Myliobatiformes, Potamotrygonidae*), en el río Apure (Venezuela).** Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales. 2005; 163:93-108.

Barbaro KC, Lira MS, Araújo CA, Pareja-Santos A, Távora BCL, Prrezotto-Neto JP, Kimura LF, Lima C, Lopes Ferreira M, Santoro ML. **Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom.** Toxicon. 2010; 56: 972-979.

Barbaro KC, Lira MS, Malta MB, Soares SL, Garrone Neto D, Cardoso JLC, Santoro ML, Haddad Jr V. **Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays.** Toxicon. 2007; 50:676–87.

Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. **5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators.** Bioorg. & Med. Chem. Lett. 1991; 1:611-614.

Baudino L, Nimmerjahn F, Silveira AS, Martinez-Soria E, Saito T, Carroll M, Ravetch JV, Verbeek JS, Izui S. **Differential contribution of three activating IgG fc receptors (FCγRI, FCγRIII, and FCγRIV) to IgG2a- and IgG2b- induced autoimmune hemolytic anemia in mice.** J. Immunol. 2008; 180:1948-1953.

Baumann K, Casewell NR, Ali SA, Jackson TNW, Vette I, Dobson JS, Cutmore SC, Nouwens A, Lavergne V, Fry BG. **A ray of venom: combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*).** Journal of proteomics. 2014; 109:188-198.

Bavington CD, Lever R, Mulloy B, Grund MM, Page CP, Richardson NV, Makenzie JD. **Anti-adhesiv glycoproteins in echnoderm mucus secretion.** Comp. Biochme. Physiol. 2004; 1239:607-617.

Benhamed S, Guardiola FA, Mars M, Esteban MA. **Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes.** Vet. Microbiol. [On line]. 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008>>

Bicalho RX, Rocha OA, Heneine LGD, Magalhães A, Heneine IF. **The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom.** Toxicon. 1990; 28(2):171-179.

Bochner R, Struchiner CJ. **Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação.** Cad. Saúde Pública. 2002; 18(3):735-746.

Boni-Mitake M, Costa H, Spencer PJ, Vassilieff VS, Rogero JR. **Effects of ^{60}Co gamma radiation on croptamine.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2001; 34:1531-1538.

Bradford MM. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Analytical Biochemistry. 1976; 72:248-254.

Bragadeeswaran S, Priyadharshini S, Prabhu K, Rani SRS. **Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arel* and *Arius caelatus*.** Asian Pac. J. Trop. Med. 2011; 4:305-309.

Brasil. Agência Nacional de Água. *Plano Estratégico de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica dos rios Tocantins e Araguaia.* Relatório Síntese. Brasília, 2009.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. *Procedimentos para administração de soros*, parte IV, p. 200-230, 2001.

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

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

Burns R. *Immunization strategies for antibody production. Methods in molecular biology. Immunochemical Protocols.* 3 rd. Totowa, New Jersey. R. Burns® Humana Press Inc., 2005.

Camillo MAP, Silva JAA, Yonamine CM, Hashizume JL, Silva MSC, Higa OZ. **Biological activity and structural alterations in gyroxin induced by gamma radiation.** International Nuclear Atlantic Conference – INAC, 2005.

Caproni P, Baptista JA, Almeida TL, Passos LAC, Nascimento N. **Study of irradiated bothropstoxin-1 with ^{60}Co gamma rays: immune system behavior.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2009; 15(2):216-225.

Cardi BA, Nascimento N, Andrade Jr. HF. **Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co γ -rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors.** Int. J. Radiat. Biol. 1998; 73(5): 557-564.

Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS. ***Potamotrygonidae* (river stingrays).** p. 22-28. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.* Porto Alegre, EDIPUCRS. 2003. 729p.

Carvalho MR, Lovejoy NR. **Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of the Neotropical freshwater**

stingrays from the Amazon basin (*Chondrichthies: Potamotrygonidae*). Zootaxa. 2011; 2776:13-48.

Carvalho MR, Ragno MP. **An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*)**. Papéis Avulsos de Zoologia. 2011; 51 (7): 101-139.

Casare MS. **Estudo das interações dos produtos de radiólise da água com a miotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2009. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Caterino-de-Araujo A. **Rapid in vitro detection of HIV-1-specific antibody secretion by cells-culture with virus antigens**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1992; 87(2):239-247.

Chahl L, Kirk E. **Toxins which produce pain**. Pain. 1975; 1:3–49.

Charvet-Almeida P, Araújo MLG, Rosa RS, Rincón C. **Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status**. Shark News. 2002; 14:1–2.

Charvet-Almeida P, de Almeida MP. **Contribuição ao conhecimento, distribuição e aos desafios para a conservação dos elasmobrânquios (raias e tubarões) no sistema Solimões-Amazonas**. In: *Conservação da várzea. Identificação e caracterização de regiões biogeográficas*. Albernaz LKM (org.) Manaus: Ibama/ProVárzea, 2008. p. 199-235.

Church JE, Hodgson WC. **The pharmacological activity of fish venoms**. Toxicon. 2002; 40:1083–1093.

CNEN. **Comissão Nacional De Energia Nuclear**. Aplicações da Energia Nuclear. Org. ELIEZER DE MOURA CARDOSO. Disponível em < <http://www.cnem.gov.br/ensino/apostilas/aplica.pdf> >

Conceição K, Bruni FM, Monteiro-dos-Santos J, Lopes RM, Marques EE, Fernandez JH, Lopes-Ferreira M. **The action of fish peptide Orpotrin analogs on microcirculation**. J. Pept. Sci. 2011;17:192–199.

Conceição K, Konno K, Melo RL, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lima C, Richardson M, Pimenta DC, Lopes-Ferreira M. **Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi***. Peptides. 2006; 27:3039–46.

Conceição K, Monteiro-Dos-Santos J, Seibert CS, Silva Jr. PI, Marques EE, Richardson M, Lopes-Ferreira M. ***Potamotrygon* cf. *henlei* stingray mucus: biochemical features of a novel antimicrobial protein**. Toxicon. 2012; 60:821–829.

Conceição K, Monteiro-dos-Santos JM, Bruni FM, Klitzke CF, Marques EE, Borges MH, Melo RL, Fernandez JH, Lopes-Ferreira M. **Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom**. Peptides. 2009; 30:2191–2199.

Costa A. **Avaliação da imunidade e proteção induzida em modelos experimentais por extrato solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* irradiado por ⁶⁰Co.** 2013. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.

Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva N P, Andrade LEC. **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Revista Brasileira de Reumatologia. 2010; 50(4):434-447.

Cruz, H. A., Garcia-Jimenez, S., Mendonça, Z. R., Petricevich, V. L.. **Pro and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom.** Mediators of Inflammation. 2008; 87:327-337.

Daniel JP, Heneine LDG, Tavares CAP, Nascimento MCS, Heneine IF **Generation of protective immune sera by *C. d. terrificus* venom detoxified by controlled iodination.** Braz. J. Med. Biol. Res. 1987; 20:713-720.

Delves PJ, Roitt IM. **The imunes – first of two parts.** Adv. in Immunol. 2000; 343:37-49.

Domingos MO, Franzolin MR, Dos Anjos MT, Franzolin TMP, Albes RCB, De Andrade GR, Lopes RJL, Barbaro KC. **The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing.** Toxicon. 2011; 58:147–153.

Drutskaya MS, Efimov GA, Astrakhantseva IV, Kruglov AA, Nedospasov SA. **Making anti-cytokine therapy more selective: Studies in mice.** Cytokine. [Article in press] 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.022>

Elliott DG. *The skin: the many functions of fish integument.* Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier Inc. 2011.

Esenwa C, Elkind CMS. **Inflammatory risk factors, biomarkers and therapy in ischaemic stroke.** Nat Rev Neurol. 2016;12(10):594-604.

Fenner PJ, Williamson JA, Skinner RA. **Fatal and non-fatal stingray envenomation.** The Medical Journal of Australia. 1988; 151(11-12):621-625.

Ferreira AW, Moraes SL. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Ferreira Jr RS, Nascimento N, Couto R, Alves JB, Meira DA, Barraviera B. **Immune response and neutralization capacity of antibodies produced in young sheep immunized with *Crotalus durissus terrificus* native or ⁶⁰Cobalt irradiated venom.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2009; 46(3):207-214.

Fino P, Onesti MG, Felli A, Scuderi N. **Clinical Examination And Treatment Of A leg ulcer caused by a stingray puncture.** The International Journal of Lower Extremity Wounds. 2015; 14(2):183-6.

Flowers HH. **The effects of X-irradiation on the biological activity of cottonmouth moccasin (*Ancistrodon piscivorus*) venom.** *Toxicon*. 1963;1: 131-136.

Frederico RG, Farias IP, Araújo MLG, Charvet-Almeida P, Alves-Gomes JA. **Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*).** *Neotropical Ichthyology*. 2012; 10 (1):71-80.

Garrone Neto D, Haddad Jr V, Vilela MJA, Uieda VS. **Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia.** *Biota Neotropica*. 2007; 7(1): 205-08.

Garrone Neto D, Haddad Jr V. **Acidentes Por Raias.** In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CM, Haddad Jr V. (Ed.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2009. cap. 30, p.295-313.

Garrone Neto D, Haddad Jr, V. **Arraias em rios da região sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43(1): 82-88.

Garrone Neto, D., Cordeiro, R.C., Haddad Jr., V. **Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, TO, Brasil.** *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 21, n. 3, p. 795-803, 2005.

Goldberg AC, Rizzo LV. **Estrutura do MHC e função: apresentação de antígenos. Parte 2.** *Einstein (São Paulo)*. 2015;13(1):157-162.

Gomes HL, Menezes TN, Carnielli JBT, Andrich F, Evangelista KS, Chávez-Olórtegui C, Vassallo DV, Figueiredo SG. **Stonefish antivenom neutralizes the inflammatory and cardiovascular effects induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom.** *Toxicon*. 2011; 57:992–999,.

Gualberto RM, Mendonça A P, Santos MC. **Uma Contribuição para a Notificação de Acidentes com Arraias: Desenvolvimento de um Sistema Web para Gerir as Notificações.** *J. Health Inform.* 2016; 8(2):57-65.

Guarnieri MC. **Estudos dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*.** 1992. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Guimarães G, Dias-Lopes C, Duarte CG, Felicori L, Avila RAM, Figueiredo LFM, Moura J, Faleiro BT, Barro J, Flores K, Silva W, Tintaya B, Yarleque A, Bonilla C, Kalapothakis E, Salas CE, Chávez-Olortegui C. **Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms.** *Toxicon*. 2013; 70:90–97.

Gutierrez JM, Leon, G, Rojas, G, Lomonte, B, Rucavado, A, Chaves, F. **Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom.** *Toxicon*. 1998; 36(11):1529-1538.

Haddad Jr V, Fávero Jr EL, Ribeiro FAH, Ancheschi BC, Castro GIP, Martins RC, Pazuelo GB, Fujii JR, Vieira RB, Garrone Neto D. **Trauma and envenoming caused by stingrays and other fish in a fishing community in Pontal do Paranapanema, State of São Paulo, Brazil: epidemiology, clinical aspects, and therapeutic and preventive measures.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45 (2):238-242.

Haddad Jr V, Garrone Neto D, De Paula Neto JB, Marques FPL, Barbaro KC. **Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom.** *Toxicon*. 2004; 43:287–94.

Haddad Jr V. **Animais aquáticos de importância médica no Brasil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2003;36(5): 591-597.

Haddad Jr V. **Cutaneous infections and injuries caused by traumatic and venomous animals which occurred in domestic and commercial aquariums in Brazil: a study of 18 cases and an overview of the theme.** *An Bras Dermatol*. 2004; 79:157-167.

Halstead BW, Bunker NC. **Stingray attacks and their treatment.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1953; 2(1);115-128.

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

Halstead BW. **Venomous marine animals of Brazil.** *Memórias do Instituto Butantã*. 1966; 33;126.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. **Interleukin-6 and the acute phase response.** *Biochem. J*. 1990; 265:621-636.

Henene IF, Lahmann WM, Rocha OA. **A toxoid prepared for cholera toxin by iodination.** *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1992; 25:913-917.

Hiramoto RM. **Avaliação da resposta imune e celular, em camundongos inoculados com taquizoítos irradiados de *Toxoplasma gondii*.** 2002. Tese (Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

INVESTCO. **Atualização do zoneamento da faixa de proteção do reservatório da UHE Luís Eduardo Magalhães (Lajeado).** Relatório. 2005.

Kidd P. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.** *Altern Med Rev*. 2003; 8(3):223-46.

Kim BS, Park YJ, Chung Y. **Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation.** Arch Pharm Res. 2016. DOI 10.1007/s12272-016-0823-8.

Kimura LF, Prezotto-Neto JP, Antoniazzi MM, Jared SG, Santoro ML, Barbaro KC. **Characterization of inflammatory response induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice.** Experimental Biology and Medicine. 2014; 239:601-609.

Kimura LF, Prezotto-Neto JP, Tavora BCLF, Faquim-Mauro EL, Pereira NA, Antoniazzi MM, Jared SG, Teixeira CFP, Santoro ML, Barbaro KC. **Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice.** Toxicon. 2015; 103:65-73.

Kirchhoff KN, Klingelhofer I, Dahse H, Morlock G, Wilke T. **Maturity-related changes in venom toxicity of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*.** Toxicon. 2014; 92:97-101.

Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ. ***Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus.** FEMS Microbiology Letters. 2008; 288 (2):216-220.

Komegae EN, Grund LZ, Lopes-Ferreira M, Lima C. **The longevity of Th2 humoral response induced by proteases natterins requires the participation of long-lasting innate-like B cells and plasma cells in spleen.** PLoS ONE. 2013; 8(6):1-13.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970; 227:680–685.

Lameiras JLV, Da Costa OTF, Moroni FT, Araújo JR, Caranhas SME, Marques CMA, Dos-Santos MC, Duncan WLP. **Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (*Chondrichthyes* - *Potamotrygonidae*) from the Amazon Basin.** Toxicon. 2014; 77:105–13.

Lameiras JLV, Da Costa OTF, Dos Santos MC, Duncan WLP. **Arraias de água doce (*Chondrichthyes* – *Potamotrygonidae*): biologia, veneno e acidentes.** Revista Scientia Amazonia. 2013; 2(3):11-27.

Li Y, Foran P, Fairweather NF, Paiva A, Weller U, Dougan G, Dolly JO. **A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes its proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain.** Biochemistry. 1994; 33:7014-7020.

Lima C, Clissa PB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-Da-Silva MM, Lopes-Ferreira M. **Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model tissue injury.** Toxicon. 2003;42:499-507.

Lima LAFD, Ferreira ML. **Estudo clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim);**

Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). An. bras. dermatol. 2000; 75 (4): 435-443.

Lima Martins MV, Sanchez GA, Krettli AU, Brener Z. **Antibody- dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies.** Parasite Immunol. 1985; 7(4):367-376.

Littlewood AJ, Russel J, Harvey GR, Hughes DE, Russel RGG, Gowen M. **The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts *in vitro*.** Endocrinology. 1991; 129:1513-1520.

Lopes-Ferreira M, Moura-da-Silva AM, Mota I, Takehara HA. **Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom.** Toxicon. 2000; 38:1149-1156.

Lopes-Ferreira M, Grund LZ, Lima C. ***Thalassophryne nattereri* fish venom: from the envenoming to the understanding of the immune system.** J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2014; 13:20-35.

Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lopes-Ferreira M. **Biological and biochemical properties of the brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*.** Toxicon. 2006; 47:575–83.

Magalhães MR, Da Silva Jr N, Ulhoa CJ. **A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization.** Toxicon. 2008; 51:1060-7.

Martín-Martín I, Molina R, Jiménez M. **Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits.** PLoS ONE. 2015; 10(11):1-15.

Matsushita S, Katz DH. **B cell sensitivity to IgE suppressive activity of IFN-gamma is polymorphic and controlled by a non-H-2-linked gene.** Cell Immunol. 1992; 143:212-9.

Mesquita Jr D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC. **Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B.** Rev. Bras. Reumatol. 2010; 50(5):552-580.

Meyer PK. **Stingray injuries.** Wilderness Environ. Med. 1997; 8:24-28.

Michaels HB, Hunt JW. **A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach.** Radiat. Res. 1978; 74: 23-34.

Monteiro WM, Oliveira SS, Sachett JAG, Silva IM, Ferreira LCL, Lacerda MVG. **Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon.** Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(3):389-392.

Monteiro-Dos-Santos J, Conceição K, Seibert CS, Marques EE, Silva Jr PI, Soares AB, Lima C, Lopes-Ferreira M. **Studies on pharmacological properties**

of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. International Immunopharmacology. 2011; 11:1368-77.

Monteiro-Dos-Santos J, Seibert CS, Araújo GC, Bertolin AO, Marques EE. **Habitat de arraia em rios e o perigo de acidentes valorado pelo acidentado na Bacia Tocantins Araguaia**. Revista Scientia Amazonia. 2014; 3(2):24-38.

Monteiro-Dos-Santos J. **Toxicidade da peçonha de arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* (*Chondrichthyes Potamotrygonidae*) em relação ao sexo e fases do desenvolvimento ontogenético (jovem e adulto)**. 2012. (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

Moon S, Song KB. **Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid**. Food Chemistry. 2001; 74:479-483.

Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. **Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology**. Clin Immunol. 2004; 110(3):252-66.

Moro G, Rosa RS, Charvet-Almeida P. **New record of *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) in the Parnaíba river basin Northeast Brazil**. In: Anais do II Encontro Colombiano sobre *Condrictios*. Universidad Icesi, Cali. 2010:106.

Mosmann TR, Coffman RL. **Heterogeneity of cytokines secretion patterns and functions of helper T cells**. Adv. Immunol. 1989; 46:111-147.

Murata Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 1988. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Nascimento N, Seibert CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. **Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects**. Toxicon. 1996; 34(1):123-131.

Nascimento N. **Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxina**. 1995. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Nascimento N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada. Aspectos bioquímicos e farmacológicos**. 1991. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Nascimento, JB. *Tocantins: história e geografia*. Goiânia, Bandeirante, 2009. 144p.

Nimmerjahn F, Luxa A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D, Smith P, Ravetch JV. **Fc γ RIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo**. PNAS. 2010; 107(45):19396–19401.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. **Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding.** *Science*. 2005; 310:1510-1512.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. **Citocinas e Dor.** *Rev Bras Anesthesiol*. 2011;61(2):255-265.

Oliveira Jr NG, Fernandes GR, Cardoso MH, FF, Cândido ES, Garrone Neto D, Mortari MR, Schwartz EF, Franco OL, Alencar AS. **Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (*Myliobatiformes: Potamotrygonidae*) from Brazil.** *Scientific Reports*. 2016;6:1-13.

Oliveira KC, Spencer PJ, Ferreira Jr RS, Nascimento N. **New insights into the structural characteristics of irradiated crotoamine.** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2015; 21(14):1:10.

Oliveira, LP. **Avaliação da citotoxicidade do extrato do ferrão de arraia *Potamotrygon falkneri* (*Myliobatiformes: Potamotrygonidae*).** 2015. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Oumehdi HO, Djebari FL. **Irradiated *Cerastes cerastes* venom as a novel tool for immunotherapy.** *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2008; 30:37–52.

Pareja-Santos A, Bruni VM, Sosa-Rosales JI, Souza VM, Lopes-Ferreira M, Lima C. **Delayed local inflammatory leukocyte infiltration in an important component of *Thalassophryne maculosa* venom.** *Toxicon*. 2008; 52:103-114.

Pedroso CM, Jared C, Charvet-Almeida P, Almeida MP, Garrone Neto D, Lira MS, Haddad Jr V, Barbaro KC, Antoniazzi MM. **Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays.** *Toxicon*. 2007; 50:688–697.

Phisalix LD, Bertrand G. **Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin di vipère.** *C. R. Acad. Sci*. 1894; 118:356-358.

Picolo G, Chacur M, Gutiérrez JM, Teixeira CFP, Cury Y. **Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms.** *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(10):1221-1228.

Piran-Soares AA, Komegae EN, Souza VMO, Fonseca LA, Lima C, Lopes-Ferreira M. **Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom.** *Toxicon*. 2007; 49:920–930.

Van Der Poll T, Van Deventer SJ. **The role of interleukin 6 in endotoxin-induced inflammatory responses.** *Prog. Clin. Biol. Res*. 1998; 397:365-377.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PALMAS. Projeto Praia da Graciosa: temporada 2000. Palmas: PMP, 1999. 57p.

Pukrittayakamee S, Warrel DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. **The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms.** *Toxicon*. 1988; 26(7): 629-637.

Pyrrho AS, Moraes JLC, Peçanha LMT, Gattass CR. ***Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice.** *Parasitol Res*. 1998; 84(4):333-337.

Rocha AM. **Comparação entre a nefrotoxicidade da Crotoxina nativa e a irradiada com raios gama de ^{60}Co em camundongos.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, São Paulo.

Rosa RS. **A systematic revision of the South American freshwater stingrays (*Chondrichthyes: Potamotrygonidae*).** Unpublished Ph.D. Dissertation, The College of William and Mary, Williamsburg, Virginia, 1985, 523p.

Rucavado A, Lomonte B. **Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice.** *Toxicon*. 1996; 34, 5:567-577.

Sadhasivam G, Muthuvel A, Pachaiyappan A, Thangavel B. **Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*.** *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013; 54:8489.

Sá-Oliveira JCS, Costa EA, Pena FPS. **Acidentes Por Raias (*Potamotrygonidae*) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental-APA do rio Curiaú, Macapá-AP.** *Biota Amazônia*, Macapá. 2011;1(2):74-78.

Saraiva TC, Grund LZ, Komegae EN, Ramos AD, Conceição K, Orii NM, Lopes-Ferreira M, Lima C. **Nattectin a fish C-type lectin drives Th1 responses *in vivo*: licenses macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function.** *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(10):1546-56.

Savitsky DA, Yanai H, Tamura T, Taniguchi T, Honda K. **Contribution of IRF5 in B cells to the development of murine SLE-like disease through its transcriptional control of the IgG2a locus.** *PNAS*. 2010; 107(22):10154–10159.

Schiera A, Battifoglio ML, Scarabelli G, Crippa D. **Stingray injury in a domestic aquarium.** *International Journal of Dermatology*. 2002; 41:44–45.

Short HE, Mallick SMK. **Detoxication of snake venoms by the photodynamic action of methylene blue.** *Indian J. Med. Res*. 1935; 22:529-536.

Silva JBCP. **Revisão taxonômica e morfológica do complexo *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (*Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae*)**. 2009. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo.

Silva Jr. NJ, Ferreira KRC, Pinto RNL, Aird SD. **A Severe accident caused by an ocellate river stingray (*Potamotrygon motoro*) in central Brazil: how well do we really understand stingray venom chemistry, envenomation, and therapeutics?** *Toxins*. 2015. 7:2272-2288.

Silva, LAGC. **Biomass presentes no estado do Tocantins**. Biblioteca Digital, Câmara dos Deputados. Nota Técnica. Brasília, 2007.

Smith KM, Garside P, Mcneil RC, Brewer JM. **Analysis of costimulatory molecule expression on antigenic-specific T and B cells during the induction of adjuvante induced Th1 and Th2 type responses**. *Vaccine*. 2006; 24:3035-43.

Smith NLD, Denning DW. **Clinical implications of interferon- γ genetic and epigenetic variants**. *Immunology*. 2014; 143:499–511.

Soliani FMB. **Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos**. 2008. Dissertação (Mestrado), São Paulo.

Souza PA. **Análise e avaliação de impactos ambientais decorrentes da Praia da Graciosa, Palmas – TO**. Palmas: UNITINS, 1999. 66p.

Spencer PJ. **Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ^{60}Co** . 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, São Paulo.

Spencer PJ. **Efeitos da radiação na estrutura da Bothropstoxina-I**. 1999. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Sprent J, Surh CD. **T Cell Memory**. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20:551-79.

Stefani MM, Takehara HA, Mota I. **Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice**. *Immunol Lett.* 1983;7(2):91-97.

Tarrant JM. **Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use**. *Toxicological Sciences*. 2010; 117(1):4–16.

Tejasen P, Ottolenghi A. **The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom**. *Toxicon*. 1970; 8:225-233.

Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. **MicroELISA for detecting and assaying snake venom and antivenom antibody**. *Lancet*. 1977; 2:639–641.

Torrez PPQ, Quiroga MM, Said R, Abati PAM, França FOS. **Tetanus After Envenomations Caused By Freshwater Stingrays**. *Toxicon*. 2015; 97:32-35.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350-4354.

Wales A, Kusel JR. **Biochemistry of irradiated Parasite vaccines: suggested models for their mode of action**. *Parasitol. Today*. 1992; 8(11):358-363.

Weiss B F, Wolfenden HD. **Survivor of a stingray injury to the heart**. *Medical journal of Australia*. 2001;175 (1):33-34.

Yoshimura EM. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria**. *Revista Brasileira de Física Médica*, 2009; 3(1):57-67.

Zhao, X., Findly, R.C., Dickerson, H.W. **Cutaneous antibody secreting cells and B cells in a teleost fish**. *Dev. Comp. Immunol*. 2008; 32:500–508.

Ziegman R, Alewood P. **Bioactive components in fish venoms**. *Toxins*. 2015;7:1497-1531.

Zorgi NE, Galisteo Jr AJ, Sato MN, Nascimento N, Andrade Jr HF. **Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irradiated *Toxoplasma gondii* tachyzoites**. *Med Microbiol Immunol*. 2016; 205(4):297-314.