



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE
CAMPUS DE PALMAS

DERVAL GOMES RIBEIRO NETO

ARRAIAS DE ÁGUA DOCE: O ANIMAL E SUA HISTÓRIA AMBIENTAL

PALMAS - TO
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS

DERVAL GOMES RIBEIRO NETO

ARRAIAS DE ÁGUA DOCE: O ANIMAL E SUA HISTÓRIA AMBIENTAL

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Simone Seibert.

PALMAS - TO
2021

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

R484a Ribeiro Neto, Derval Gomes.

ARRAIAS DE ÁGUA DOCE: O ANIMAL E SUA HISTÓRIA
AMBIENTAL. / Derval Gomes Ribeiro Neto. – Palmas, TO, 2021.

61 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Ciências do Ambiente, 2021.

Orientadora : Dr^a Carla Simone Seibert

1. Chondrichthyes. 2. Potamotrygonidae. 3. História e ambiente. 4.
Histologia Tegumentar. I. Título

CDD 628

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

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

DERVAL GOMES RIBEIRO NETO

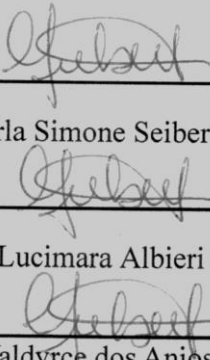
ARRAIAS DE ÁGUA DOCE: O ANIMAL E SUA HISTÓRIA AMBIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e avaliada pela orientadora Prof.^a Dr.^a Carla Simone Seibert e pela banca examinadora.

Linha de pesquisa: Biodiversidade e Recursos Naturais.

Data de aprovação: 29/09/2021

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Carla Simone Seibert– Orientadora

Prof.^a Dr.^a Lucimara Albieri de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira

Instituto Butantan -IB

Dedico este trabalho aos meus pais:

Manuel e Rosi.

AGRADECIMENTOS

Acredito que este é um momento injusto e um dos mais difíceis de toda pesquisa científica, pois muitas pessoas me ajudaram direta e indiretamente para a confecção deste trabalho. Desde já peço desculpas a amigos e colegas que talvez não me lembre de citá-los aqui, mas saibam que todos foram importantíssimos, tanto na minha construção como ser humano, quanto na confecção desta dissertação.

Gostaria de agradecer a meus pais, pelo apoio emocional e incondicional na minha dedicação aos estudos, a eles tenho toda a gratidão do mundo. Afinal, foram horas choramingando minhas ansiedades, com excesso de futuro e os problemas emocionais corriqueiros, mas ambos bravamente me ensinaram o melhor caminho a seguir. E desistir nunca foi uma opção! Manuel Pires, meu grande amigo e herói, e Tia Rosi, professora, educadora excepcional e amiga.

À minha esposa Juliana, que sempre me ajudou muito com ótimos conselhos nas coletas dos espécimes e na confecção de parte do material.

Gostaria de agradecer imensamente à professora Dr.^a Carla Simone Seibert, pela paciência e pela orientação.

À professora Dr.^a Elineide Eugênio Marques, pela disposição, pelos conselhos e pela ajuda na triagem das arraias após a pesquisa de campo.

À Dr.^a Diva Denelle Spadacci Morena, pela sua ajuda e pela paciência, tanto no período que passei no Instituto Butantan quanto posteriormente (via internet).

A Magna Aparecido Maltauro Soares, que ensinou gloriosamente a técnica em histologia. Guardo anotado comigo seus ensinamentos.

Ao Instituto Butantan, ao Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que me acolheu e forneceu o suporte necessário para que parte desta pesquisa fosse realizada, e ao Laboratório de Biologia Celular.

Ao laboratório de Histologia da UFT, à Bia, pelos ótimos conselhos e pelo auxílio no processo de fabricação do descalcificante e do emblocamento do material.

A todas as pessoas que participaram direta e indiretamente deste trabalho.

Esta pesquisa só foi possível graças ao apoio financeiro da CAPES (bolsa de mestrado DS), da PROAP/Ciamb UFT, Edital PROCAD 2013, com o financiamento do projeto “Fortalecimento de programas de pós-graduação na Amazônia e na Extra-Amazônia com ênfase em envenenamentos ofídicos: uma estratégia de formação de pessoal e interdisciplinaridade”.

RESUMO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o contexto histórico das arraiais de água doce e os aspectos morfohistológicos do tegumento da arraia *Potamotrygon rex*. Para tanto, foi realizada revisão bibliográfica contextualizada com uso da base de dados da CAPES, *Sciverse Hub*, *Sciverse Science Direct*, *Sciverse Scopus*, *Scirus* e *Pubmed*. Os resultados demonstraram que o ambiente força os indivíduos a se diversificarem e a se adaptarem, e as arraiais são um exemplo de adaptação e tolerância aos ambientes dulcícolas. Durante o processo adaptativo, esses animais sofreram severas modificações para suportar um ambiente com menor quantidade de sal. Entre elas, estão incapacidade de retenção de ureia, ausência de excreção de sal, pois a glândula retal é reduzida, e modificações nas células receptoras (ampolas de Lorenzini). Outro órgão que teve que se adaptar ao novo tipo de ambiente foi o tegumento. A pele das arraiais pode ser considerada a primeira linha de defesa contra agentes patógenos, além de participar da regulação de diversos processos fisiológicos, como regulação iônica e osmótica, locomoção e reprodução. Para tanto, as células epidérmicas desempenham diversas funções específicas, contudo são pouco estudadas. Neste sentido, investigamos também a morfologia das células do dorso e do ferrão da arraia de água doce *P. rex*. Verificamos que dorso e o ferrão apresentam células especializadas na produção de substâncias específicas. Ao utilizar técnicas histoquímicas, encontramos a coexistência de mucopolissacarídeos ácidos e neutros no tegumento do dorso, bem como grandes reservatórios de proteína, cuja função específica não está bem descrita na literatura.

Palavras-chave: Chondrichthyes. Potamotrygonidae. História e ambiente. Histologia. Pele.

ABSTRACT

The general objective of the present study was to evaluate the historical context of freshwater stingrays and the morphohistological aspects of the integument of the stingray *Potamotrygon rex*. Therefore, we carried out a contextualized bibliographic review using the CAPES database, Sciverse Hub, Sciverse Science Direct, Sciverse Scopus, Scirus and Pubmed. The results showed that the environment forces them to diversify and adapt, and stingrays are an example of adaptation and tolerance to freshwater environments. During the adaptive process, these animals underwent several modifications to adapt to an environment with the least amount of salt. Among them are inability to retain urea, lack of salt excretion, as the rectal gland is reduced, and changes in receptor cells (Lorenzini ampoules). Another organ that had to adapt to the new type of environment was the integument. Stingray skin can be considered the first line of defense against pathogens, in addition to participating in the regulation of several physiological processes, such as ionic and osmotic regulation, locomotion and reproduction. Therefore, epidermal cells perform several specific functions, however they are poorly studied. In this sense, we also investigated the morphology of the dorsum and sting cells of the freshwater stingray *P. rex*. We found that the back and the stinger have cells that are specialized in the production of specific substances. By using histochemical techniques, we found the coexistence of acidic and neutral mucopolysaccharides in the back tegument, as well as large protein reservoirs whose specific function is well applied in the literature.

Keywords: Chondrichthyes, Potamotrygonidae, History and Environment, Histology, Skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Locais de coleta dos tecidos do dorso e ferrão da arraia <i>P. rex</i> , numerados de acordo com a sua posição. A – Dorso da arraia: 1 – mediana da cauda; 2 – base da cauda; 3 – região cefálica; 4 – nadadeira lateral esquerda; 5 – nadadeira lateral direita. B – Ferrão: 1 – ápice; 2 – meio; e 3 – base. C – Esquema mostrando as regiões do ferrão analisadas com microscopia de luz.	11
Figura 2 - Mapa de Elevação do Brasil, evidenciando as falhas geológicas. Ao centro é possível ver a falha Tocantins-Araguaia.	16
Figura 3 - Irradiação dos peixes. Relações filogenéticas de peixes com maxilas. Este diagrama representa os prováveis parentescos entre os principais grupos de gnatostomados basais. Linhagens extintas estão marcadas com uma adaga (+). Linhas negras mostram apenas parentesco; elas não indicam as épocas de divergência nem a presença não assinalada de táxons no registro fóssil. Os números em negrito indicam caracteres derivados que distinguem as linhagens. São mostrados apenas os parentescos melhor corroborados.	18
Figura 4 - Aparato de Peçonha- Ferrão da <i>Potamotrygon rex</i> . Estrutura retroserrilhada, pontiaguda que em conjunto com as toxinas presentes na epiderme ocasionam o envenenamento do acidentado.	20
Figura 5 - Acidentes ocasionados por arraias de água doce. A- Necrose superficial instalada ao redor do local da ferroadada 48 horas após o acidente. B- Escara enegrecida, resultante do tecido necrosado pela ação das toxinas, em acidente com cerca de oito dias de evolução.	21
Figura 6 – Delimitação da área do médio e alto rio Tocantins, do município de Ipueiras ao município de Lajeado - TO, Brasil.	24
Figura 7 – Exemplar adulto da arraia <i>P. rex</i> . A – Vista dorsal da arraia. B – Cauda da arraia apresentando dois ferrões fixados na porção mediana da cauda, na região dorsal, onde o ferrão mais externo (*) é maior do que o mais interno.	28
Figura 8 – MEV do ferrão da arraia <i>P. rex</i> . A e B – Células formando o tegumento do animal (*). Em algumas regiões em que o epitélio se destacou, é possível observar a região mineralizada (RM). C – Estrutura mineralizada próxima ao ápice do ferrão, evidenciando os sulcos ventro-laterais (setas). D – Detalhe da parte mineralizada do ferrão, evidenciando seu ápice pontiagudo. E – Lateral – formação de pequenas projeções (setas) nas laterais do ferrão. F – Detalhe de projeções laterais do ferrão, denominadas serrilhas (*). G – Cristas laterais em desenvolvimento (setas). H – Cristas laterais totalmente desenvolvidas (setas).	29
Figura 9 – Fotomicrografia da epiderme do dorso. A – Detalhe das células dispostas em camadas. B – Detalhe das células epiteliais. C – Ferrão. D, E, F – Detalhe da região dorso lateral do ferrão. Célula Epitelial Basal (e); e Célula Eosinofílica (seta). Legendas: RM (região mineralizada), TC (tecido conjuntivo), d (denticulo dérmico), c (cromatóforos), mb (membrana basal).	31
Figura 10 – Micrografias coradas em H&E demonstrando a morfologia celular ao longo do dorso da arraia <i>P. rex</i> . A – Mediana da cauda. B – Base da cauda. C – Região cefálica. D – Nadadeira lateral esquerda. E – Nadadeira lateral direita. Legendas: TC (tecido conjuntivo); d (denticulo dérmico).	32
Figura 11 – Histoquímica do dorso (A, B, C, D, E) e ferrão da arraia <i>P. rex</i> (F, G, H). A – Micrografia demonstrando as células de muco positivas ao método histoquímico de PAS. B – Ampliação da imagem evidenciando que as células epiteliais também apresentaram citoplasma positivo ao PAS, bem como a membrana basal (mb). C – Células epiteliais positivas ao <i>Alcian Blue</i> . D – Células epiteliais positivas ao Azul de Bromofenol, detalhe (*) região arredondada fortemente positiva ao Azul de Bromofenol. E – Células eosinofílicas positivas ao Azul de Bromofenol. F, G e I – Regiões do ferrão com todas as células positivas ao Azul de Bromofenol. H – Setas demonstrando reservatórios proteicos presentes no ferrão. Legenda: RM (região mineralizada).	33

SUMÁRIO

PREFÁCIO	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. METODOLOGIA	10
3.1 HISTÓRIA AMBIENTAL, DIVERSIDADE E TOXICIDADE DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE	10
3.2 HISTOLOGIA E MORFOLOGIA DO TEGUMENTO E FERRÃO DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE <i>P. REX</i>	10
3.2.1 <i>Animais</i>	10
3.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO FERRÃO	11
3.2.3 <i>Histologia</i>	12
3.2.4 <i>Histoquímica</i>	12
4. HISTÓRIA AMBIENTAL, DIVERSIDADE E TOXICIDADE DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE	13
4.1 A DERIVA CONTINENTAL: UMA VIAGEM NO TEMPO	13
4.2 BREVE HISTÓRICO: CONDRICTES E AS ARRAIAS	17
4.3 AS ARRAIAS NO CONTINENTE SUL-AMERICANO – A BACIA ARAGUAIA-TOCANTINS	21
4.4 AS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE E A TOXICIDADE NO TEGUMENTO	24
5. HISTOLOGIA E MORFOLOGIA DO TEGUMENTO E FERRÃO DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE <i>P. REX</i>	28
5.1 RESULTADOS	28
5.1.1 <i>Estrutura geral</i>	28
5.1.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do ferrão</i>	28
5.1.3 <i>Análise histológica e histoquímica</i>	30
5.2 DISCUSSÃO	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO I – AUTORIZAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	56

PREFÁCIO

No quarto período da graduação, iniciei os estudos de taxonomia e ecologia de aranhas, mas, desde antes, já sonhava em trabalhar com animais peçonhentos. Foi com o livro do Foelix que tive o primeiro contato com o mundo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na adaptação e na evolução dos organismos. Quando cheguei ao sétimo período, conheci a professora Carla e tive contato com as disciplinas de Fisiologia Animal Comparada. Pude, então, acurar meus conhecimentos sobre os mecanismos de adaptação dos seres vivos aos diversos tipos de ambiente. Nesse mesmo período, fui monitor da disciplina de Citologia e comecei a questionar como as células se comportavam em face dos distúrbios ambientais, foi quando me deparei com um mundo espetacular. Esse mundo não era conhecido até meados do século XVI, e, até então, a origem de muitas doenças era desconhecida. Me lembro que, a primeira célula que vi foi um desenho esquemático em uma enciclopédia antiga, na casa de minha falecida avó prof. Maria José Alves (Tia Zefa). Lembro também, de relacionar bacteriófagos às naves espaciais. Quando tive a oportunidade de utilizar o microscópio, pude, como Hooke e Leeuwenhoek, me maravilhar com outro mundo, o universo microscópico. A princípio, lembro-me de relacionar as células que via no microscópio como as “celas dos monges” descritas por Robert Hooke em seu livro *Micrographia* (1665). No entanto, o que eu via não eram células de cortiça, eram células de um pimentão, que tive a oportunidade de observar, durante a aula de anatomia vegetal. Eram hexágonos quase perfeitos, que me lembravam “favos de mel”, mas eram a parede celular. Senti-me como Carl Sagan desvendando os mistérios do cosmos.

Assim que coleei grau, pensei: “então é isto? Isto é o fim?”. Entrei em uma imersão pessoal, quando revivi muitas vezes os períodos de minha graduação. Filosoficamente, eu estava coberto por todo o conhecimento acumulado durante os períodos de graduação. Não conseguia pensar em mais nada, além do mestrado. Mas existia uma ponta que estava solta e que me perturbava. O sonho distante de trabalhar com animais peçonhentos e os mecanismos adaptativos dos seres vivos aos ambientes foi o que me motivou a voltar os olhos para a graduação novamente e, posteriormente, ao mestrado em Ciências do Ambiente.

Decidi então voltar para Porto Nacional e ficar na casa da minha namorada, que me aconselhou a fazer a modalidade licenciatura em Biologia, ou seja, voltar para a graduação e assim, ampliar minhas possibilidades de emprego. No dia da minha inscrição

no vestibular, encontrei a professora Carla e conversamos a respeito de uma pesquisa com arraias que a Juliane, sua aluna de Doutorado, estava realizando. Cordialmente me propus a trabalhar e não importava se era no campo ou em laboratório. A partir de então, passei a auxiliar a Juliane em coletas e análises de dados de seu trabalho, posteriormente, surgiu a minha proposta de projeto para o mestrado. A parte experimental da presente dissertação foi desenvolvido juntamente ao projeto “ESTUDO DA INTERAÇÃO ORGANISMO-AMBIENTE DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO E TOXICIDADE DA PEÇONHA” cuja autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais -CEUA está em anexo.

1. INTRODUÇÃO

As arraias são peixes cartilagosos pertencentes à classe dos elasmobrânquios, grupo que também inclui os tubarões. Podem habitar desde o mar aberto a ambientes estuarinos e dulcícolas (PRATT; CASEY, 1990; ALMEIDA *et al.*, 2008). Apresentam um corpo achatado dorsoventralmente, com as nadadeiras peitorais muito desenvolvidas e recoberto por escamas placoides, que são de origem dérmica, compostas por esmalte, dentina, vasos e nervos (COMPAGNO, 1990; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; NELSON, 2006; ROSA; CARVALHO, 2007; CARVALHO; LOVEJOY, 2011; CARVALHO, 2016). No mundo, formam um grupo de aproximadamente 630 espécies descritas, distribuídas em 4 ordens e 26 famílias (LAST *et al.*, 2016; FROESE; PAULY, 2021). Atualmente existem quatro (4) ordens descritas: Torpediniformes (arraias elétricas), Rinoprístiformes (peixes-serra), Rajiformes (arraias verdadeiras) e Myliobatiformes (arraias marinhas e dulcícolas) (NELSON, 2006; COMPAGNO *et al.*, 2008; FOTENELLE *et al.*, 2021).

Os Myliobatiformes anteriormente eram incluídos na ordem Rajiformes, no entanto, estudos filogenéticos apoiaram a hipótese monofilética para esse grupo que são derivados dos peixes patins (família Rajidae; ordem Rajiformes) (COMPAGNO, 1973; NELSON, 2006). As arraias peçonhentas pertencem à ordem dos Myliobatiformes, que é a única ordem de arraias que apresentam ferrões na cauda (LOVEJOY, 1996; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004; NELSON, 2006). A presença de ferrões não é uma novidade evolutiva para esse grupo, pois alguns tubarões extintos do gênero *Ctenacanthus* Agassiz, 1937, apresentavam espinhos ou ferrões próximos às suas nadadeiras (LONG, 2011). Atualmente, duas espécies de tubarões apresentam um ferrão junto à nadadeira dorsal: o *Squalus acanthias*, encontrado no Oceano Atlântico; e o *Heterodontus francisci*, no Oceano Pacífico (HOLDEN; MEADOWS, 1962; COMPAGNO, 2002). As arraias, de modo geral, possuem uma longa história de isolamento filogenético das linhagens de tubarões viventes, mas acredita-se que se derivaram dos esqualoides, um tipo de tubarão de hábitos bentônicos (POUGH, 2003).

A ordem dos Myliobatiformes é formada por arraias marinhas e dulcícolas, e atualmente apresenta 11 famílias descritas (LAST *et al.*, 2016). Entretanto, apenas a família Potamotrygonidae possui espécies exclusivamente adaptadas a ambientes dulcícolas (HOORN, 2006; LOVEJOY *et al.*, 2006). Embora, este grupo apresente uma sistemática mal resolvida e algumas espécies aguardem por uma descrição

(CARVALHO, 2016; LAST, 2016). Estes representam cerca de 42 espécies descritas (SILVA; LOBODA, 2019). Os potamotrygonídeos são endêmicos da América do Sul e seus ancestrais se adaptaram aos ambientes dulcícolas há cerca de 40-50 milhões de anos (LOVEJOY; ALBERT; CRAMPTON, 2006; ROSA; LASSO, 2013; FOTENELLE *et al.*, 2021). Segundo Lovejoy *et al.* (1998), os ancestrais dos potamotrygonídeos teriam invadido os ambientes dulcícolas por meio das incursões marinhas ocasionadas pelas variações no nível do mar que levaram à formação de grandes lagos, que, posteriormente, foram dessalinizados, tornando-se corpos d'água similares aos encontrados atualmente (THORSON; HAMMER; OETINGER, 1983).

Considerando a importância do entendimento da história das arraias de água doce e também, dos mecanismos veiculados à sua manutenção, no que tange a estrutura e função da sua epiderme, essa dissertação foi organizada em duas etapas. A primeira com uma ampla revisão bibliográfica para descortinar a história desse grupo de animais e as adaptações fisiológicas que possibilitaram seu avanço para o ambiente dulcícola. E a segunda etapa, que investiu no estudo morfohistológico do tegumento do dorso e ferrão da arraia *Potamotrygon rex*, que visou caracterizar uma espécie de arraia endêmica do rio Tocantins.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o contexto histórico das arraias de água doce e os aspectos morfo-histológicos do tegumento da arraia *Potamotrygon rex*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a história de inserção das arraias marinhas no ambiente de água doce, sua diversidade e a toxicidade do seu tegumento;
- Descrever a morfologia e a histologia do tegumento que reveste o dorso e o ferrão da arraia de água doce *P. rex*.

3. METODOLOGIA

3.1 História ambiental, diversidade e toxicidade das arraias de água doce

Foi realizado levantamento bibliográfico nos portais de busca de Periódicos CAPES (www.periodicos.capes.gov.br), *Sciverse Hub* (www.hub.sciverse.com), *Sciverse Science Direct* (www.sciencedirect.com), *Sciverse Scopus* (www.scopus.com), *Scirus* (www.scirus.com), *Pubmed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) e *Google Acadêmico* (scholar.google.com.br). Para o levantamento, utilizaram-se os seguintes termos: “Amazon river”, “Tocantins-Araguaia basin”, “orogenic cycles from South America”, “Tectonic Evolution of South America”, “Evolution of Chondrichthyes”, “Myliobatiformes”, “Potamotrygonidae”, “Potamotrygon”, “stingray injuries”, “fresh water stingrays”, “stingray venom”, “stingray accidents”, “ictismo”. Foram encontradas 320 publicações do período de 1938 a 2020, das quais 146 foram usadas como referência bibliográfica para compor o trabalho de revisão.

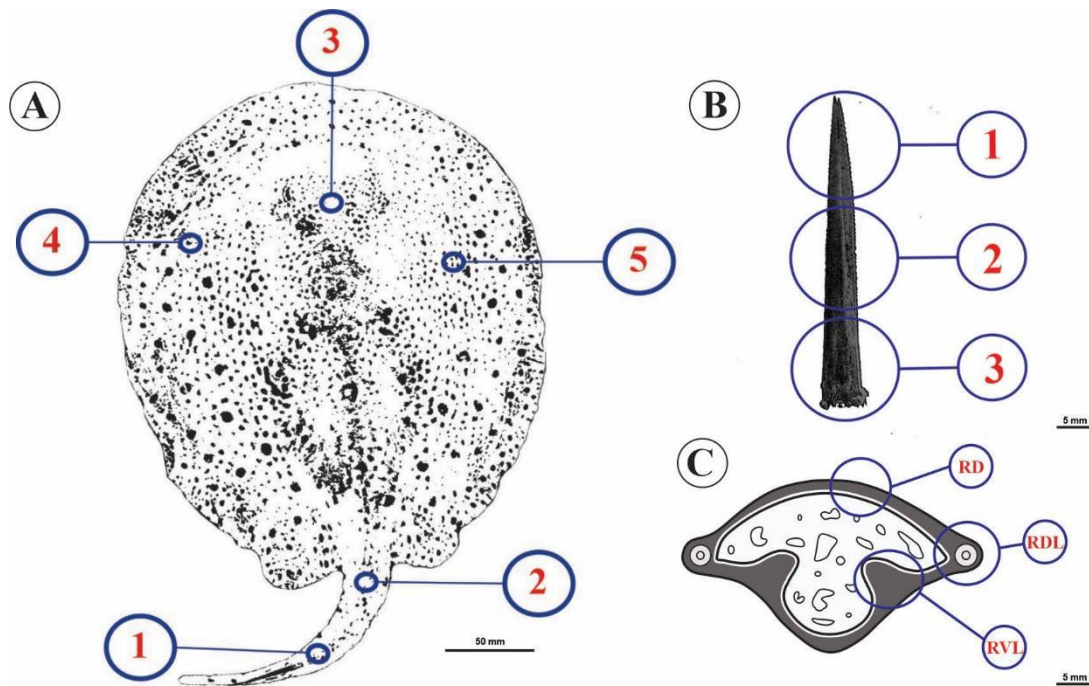
3.2 Histologia e morfologia do tegumento e ferrão das arraias de água doce *P. rex*

3.2.1 Animais

Foram coletadas amostras¹ do tegumento do dorso e do ferrão de seis indivíduos da arraia de água doce *Potamotrygon rex*, no médio e alto rio Tocantins, município de Porto Nacional (S10°41'5, 23068''; W48°25'11,85024''). Foram extraídas cinco regiões distintas do dorso do animal (Figura 1A) e o ferrão separado em três partes (Figura 1B). Para as arraias com dois ferrões, o mais interno foi utilizado para o estudo no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o outro para a microscopia de luz. Os cortes transversais do ferrão foram analisados em três regiões distintas: região dorsal (RD), região dorso-lateral (RDL) e região ventro-lateral (RVL) (Figura 1C).

¹ Este estudo foi realizado com autorização do SISBIO (Processo nº 71164-1) e está cadastrado no SisGen (Processo nº AE07024) e foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFT, Processo nº 23.101.006.451/2019-36).

Figura 1 – Locais de coleta dos tecidos do dorso e ferrão da arraia *P. rex*, numerados de acordo com a sua posição. A – Dorso da arraia: 1 – mediana da cauda; 2 – base da cauda; 3 – região cefálica; 4 – nadadeira lateral esquerda; 5 – nadadeira lateral direita. B – Ferrão: 1 – ápice; 2 – meio; e 3 – base. C – Esquema mostrando as regiões do ferrão analisadas com microscopia de luz.



Fonte: o autor.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura do ferrão

Os ferrões foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão PBS 0,1M (pH 7,2 – 7,4) por 12 horas. As amostras foram armazenadas em tampão fosfato e encaminhadas ao Instituto Butantan para a impregnação de OsO_4 ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, em seguida, lavados em tampão cacodilato. Após as lavagens, o material foi submetido à limpeza utilizando-se ultrassom, desidratado com uso de concentrações crescentes de álcool etílico (30% a 100%) e seco ao ponto crítico de CO_2 . Então, foi montado em *stubs*, com auxílio de fita adesiva, e metalizado com ouro. Os fragmentos assim obtidos foram examinados e fotografados no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250, a 10kV.

3.2.3 Histologia

Para o exame no microscópio de luz, as amostras do dorso do animal, devidamente identificadas, foram imediatamente imersas em formol a 10% em tampão PBS 0,1M (pH 7,2- 7,4), onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foram submetidas à descalcificação, utilizando-se EDTA a 7% (pH 7,0 – 7,2), com trocas periódicas do descalcificante. Os ferrões, após a fixação, permaneceram em solução aquosa de ácido nítrico a 7% por aproximadamente 15 dias, com trocas periódicas do descalcificante. Posteriormente, foram desidratados em álcool etílico com uso de concentrações crescentes (70% a 100%) e incluídos em parafina.

Para descrever a morfologia geral do tegumento e do ferrão, os cortes, com 5 µm de espessura, foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

3.2.4 Histoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos aos seguintes métodos histoquímicos: ácido periódico de *Shiff* (PAS) e *Alcian Blue* pH 2,5, para a identificação de mucopolissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente, e Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais.

Os cortes foram observados e fotografados com o microscópio de luz DM 500 LS (Leica), equipado com câmera digital DFC420 (Leica) e programa de imagem Leica Application Suite versão 3.1.0.

4. História ambiental, diversidade e toxicidade das araias de água doce

4.1 A deriva continental: uma viagem no tempo

Há cerca de 200 milhões de anos, o ambiente terrestre era completamente diferente do que vemos hoje. Os continentes eram fundidos formando um supercontinente, chamado Pangeia, que era cercado por um único oceano denominado Pantalassa. Durante milhões de anos, esse supercontinente passou por severas modificações, formando os supercontinentes da Laurasia e da Gondwana. Essa foi a teoria proposta pelo geólogo e meteorologista alemão Alfred Wegener (1912) em sua obra *A Origem dos Continentes e Oceanos (Die Entstehung der Kontinente und Ozeane)*. No entanto, a teoria da deriva continental já era abordada na literatura há muito tempo. Francis Bacon, por exemplo, em 1620, sugeriu que a costa leste do continente sul-americano e a costa oeste da África se encaixavam, observação feita anteriormente também por Abraham Ortelius, no ano de 1596. Entretanto, esses trabalhos careciam de maiores explicações, e Wegener trouxe luz com excelentes argumentos acerca da deriva continental, que anteriormente era feita apenas com observações dos desenhos dos contornos dos continentes sul-americano e africano. Wegener baseou seus argumentos nas evidências que existiam na época, como, por exemplo, a existência de grupos fósseis e grupos de vegetação semelhantes em áreas separadas por oceanos, bem como as formações rochosas. Mesmo com explicações plausíveis, a teoria de Wegener não foi bem aceita por parte da comunidade científica da época, pois ainda faltavam evidências geológicas para demonstrar como ocorria a movimentação dos continentes (LAVINA, 2010).

O desastre com o navio transatlântico RMS Titanic, em 1912, motivou estudos de técnicas de ecolocalização, técnica conhecida desde 1490, quando Leonardo da Vinci usou um tubo inserido na água para detectar navios. No entanto, a ecossonda só foi construída e testada pelo engenheiro canadense Reginald Fessenden em 1912. Fessenden construiu um sistema experimental testado com sucesso em 1914, no Porto de Boston. No teste, Fessenden (1914) demonstrou a profundidade do som, uma comunicação submarina que denominou como *Echo Ranging*, que detectou *icebergs* a três quilômetros de distância. Esse método foi aprimorado durante a Primeira Guerra Mundial devido à necessidade dos navios em detectar submarinos e minas e, no caso dos submarinos,

detectar os possíveis obstáculos no fundo do mar, algo que impulsionou as pesquisas sobre propagação do som no oceano (JONES, 1985; HACKMANN, 1986).

A invenção do sonar (eco localizador) mostrou ao homem um novo tipo de ambiente, outrora desconhecido. Essa descoberta foi como encontrar um novo continente, o fundo do mar. No final da década de 40, expedições científicas a fim de mapear o assoalho oceânico foram montadas, utilizando equipamentos “recém” fabricados para coletar milhares de amostras de rochas. Notou-se que o assoalho marinho possuía um gigantesco sistema de cadeias de montanhas submarinas, que foram chamadas de dorsais meso-oceânicas (SCLATER; ANDERSON; BELL, 1971). Detectou-se também a presença de fendas e fissuras subaquáticas que sequer conseguiam mensurar a profundidade.

Com o aperfeiçoamento da datação das rochas feito em 1956 pelo químico Clair Patterson, os cientistas conseguiram determinar a idade das rochas oceânicas. Foi notado que, quanto mais perto das dorsais meso-oceânicas, as rochas eram mais recentes do que as que estavam próximas aos continentes. Porém, apenas em 1960 os cientistas Harry Hess e Robert Dietz propuseram que a crosta terrestre estaria em constante movimento ao longo das dorsais meso-oceânicas e que o novo fundo oceânico era formado pela ascensão de uma nova crosta quente dentro das fraturas oceânicas. Nascia, portanto, a teoria da tectônica de placas, que foi estabelecida ao final de 1968 pelo geólogo Tuzo Wilson, que descreveu, pela primeira vez, a tectônica como placas rígidas que se moviam pela superfície terrestre (WILSON, 1963).

A tectônica de placas ajudou a confirmação da teoria da deriva continental e possui uma aceitação global atingida por poucas teorias científicas, e assim os cientistas puderam descrever como de fato ocorreu a separação dos continentes: há aproximadamente 225 milhões de anos no período Jurássico Superior, uma rachadura em um solo de basalto no fundo oceânico, ocasionada pelo deslocamento das placas tectônicas, separou o supercontinente (Pangeia) em dois mega continentes: a Laurásia, no Hemisfério Norte, e a Gondwana, no Hemisfério Sul. Há cerca de 130 milhões de anos, a instabilidade das placas dividiu o então mega continente do Hemisfério Sul em dois: a Gondwana Leste (o qual unia os continentes atuais da Antártica, da Índia, de Madagascar e da Austrália) e Gondwana Oeste (América do Sul e África) (MANTESSO-NETO *et al.*, 2004).

Os locais onde os continentes estão hoje não são fixos, pois possuem uma constituição rochosa em grande parte de granito e, portanto, é menos densa, ou seja, flutua sobre o assoalho basáltico oceânico, mais denso. Os grandes blocos continentais são

chamados de placas tectônicas e estão em movimento contínuo ao longo das eras geológicas, impelindo forças advindas das correntes de convecção do manto. Sendo assim, os continentes estão em constante “deriva”, colidindo uns com os outros e também se fraturando e se fragmentando em continentes menores, continuamente extinguindo e originando bacias oceânicas ao longo das eras geológicas, em um ciclo chamado de “Ciclos Orogenéticos”, ou ciclo de abertura e fechamento de bacias oceânicas (BRITONEVES, 1999; HUBERT; RENNO, 2006; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO; LIMA; MENEZES, 2011). Quando as placas tectônicas se colidem, deformam-se originando cadeias de montanhas como o Himalaia e os Andes (*oros* = montanha, *genesis* = origem). As grandes bacias hidrográficas do continente sul-americano são o resultado de pelo menos quatro grandes ciclos orogenéticos, ou seja, quatro grandes fusões e outras quatro grandes rupturas continentais, além do atual processo orogenético andino.

Entre os ciclos orogenéticos que resultaram na atual estrutura geológica do continente sul-americano, dois explicam a evolução atual da paisagem sul-americana e sua biogeografia. São eles: o terceiro episódio de fusão continental e os quatro eventos de fissão ou ruptura continental. Tais eventos são conhecidos na literatura especializada como ciclo Brasileiro/Pan-Africano e Ruptura do Supercontinente Pangeia (BRITONEVES, 1999; HUBERT; RENNO, 2006; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO; LIMA; MENEZES, 2011). O ciclo Brasileiro/Pan-Africano constitui, no conjunto, uma série de eventos complexos ocorridos entre 900 e 540 milhões de anos em que antigos continentes se amalgamaram e originaram a maior parte das províncias estruturais hoje presentes no continente sul-americano. Foi durante o ciclo Brasileiro/Pan-Africano que antigos continentes (suas porções são hoje denominados crátons) colidiram entre si, formando extensas áreas de dobramentos em seu entorno (hoje denominados cinturões orogênicos antigos). Juntas, essas diferentes províncias constituem-se na maioria dos chamados Escudos Cristalinos, ou seja, a maior porção do atual continente sul-americano.

Dessas antigas cadeias montanhosas, hoje totalmente erodidas, restam expostas apenas suas raízes mais profundas, contíguas aos crátons adjacentes. Os crátons, centrais nos escudos, são mais estáveis tecnicamente (RIBEIRO, 2006; RIBEIRO; LIMA; MENEZES, 2011). Já os antigos cinturões orogenéticos circundantes guardam heranças de sua origem enquanto resultado de colisões continentais, entre elas, um intrincado sistema de antigas falhas geológicas. Ao longo dos eventos tectônicos que se desenrolaram posteriormente, muitos deles ativos até hoje, esses sistemas de falhas pré-cambrianas foram e continuam sendo reativados, originando importantes elementos da

paisagem sul-americana, tais como bacias tectônicas modernas como o Pantanal e a depressão do Araguaia-Tocantins (Figura 2), entre outras (RIBEIRO; LIMA; MENEZES, 2011).

Figura 2 - Mapa de Elevação do Brasil, evidenciando as falhas geológicas. Ao centro é possível ver a falha Tocantins-Araguaia.



Fonte: Alessandra Souza, 2020

A orogênese dos Andes modificou a paisagem da América do Sul e a Bacia Amazônica. Anteriormente, o rio Amazonas desaguava no mar do Caribe (HOORN, 2010a, b). Com a sedimentação dos Andes ocorrendo por conta de chuvas torrenciais e intemperismos, gradualmente, foi se segmentando e, posteriormente, mudando sua posição (SACEK, 2014).

4.2 Breve histórico: condrictes e as arraias

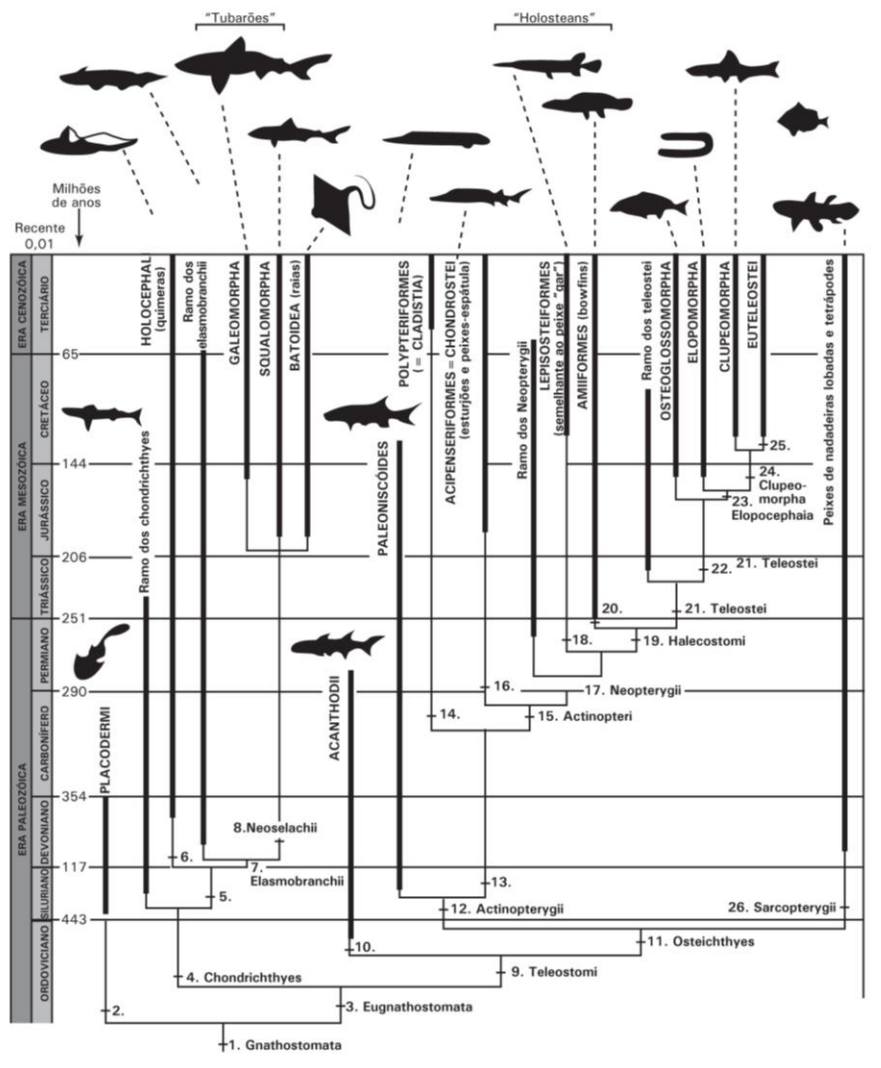
Há cerca de 450 milhões de anos, o planeta Terra passava pelo segundo maior evento de extinção em massa da história em que mais de 60% dos invertebrados marinhos foram extintos (SHEEHAN, 2001). Evidências científicas demonstram que, durante aquele período, houve deslocamento do grande continente Gondwana para a região polar sul, o que ocasionou uma rápida glaciação (BRENCHLEY *et al.*, 1994). A rápida velocidade de início e declínio da glaciação provavelmente contribuiu para a extinção em massa ao limitar o tempo disponível para acomodação evolutiva das espécies aos novos ambientes e para a destruição dos *habitats* pelas correntes marítimas (HARPER; RONG; SHEEHAN, 1999; HARPER; RONG; ZHAN, 1999; SHEEHAN, 2001; HARPER; HAMMARLUND; RASMUSSEN, 2014).

Foi durante aquele período que os ancestrais dos peixes que conhecemos hoje tiveram sua origem. O orvodociano pode ter sido catastrófico para algumas espécies marinhas, no entanto, proporcionou que o grupo dos peixes se diversificassem (Figura 3). Foi durante aquele período que peixes cartilagosos (Chondrichthyes) e os ósseos (Teleostomi) se originaram a partir de um ancestral comum chamado Eugnathostomata (POUGH; HARVEY, 1993). O primeiro registro fóssil para os elasmobrânquios (tubarões, arraias) apresenta \cong 430 milhões de anos no siluriano, período da era Paleozoica do eon Fanerozoico, em que o planeta se recuperava do evento de extinção em massa do orvodociano. Entretanto, a radiação dos elasmobrânquios se deu apenas no devoniano, período conhecido como a “era dos peixes” em que os tubarões invadiram os ambientes dulcícolas em extensão maior do que é apresentado hoje (POUGH; HARVEY, 1993).

A classe Chondrichthyes se divide em dois grandes grupos: Elasmobranchii, que são tubarões e as arraias modernas; e Holocephale, que forma o grupo das quimeras (POUGH; HARVEY, 1993; ALMEIDA *et al.*, 2008). As arraias (ou raias) apresentam corpo achatado dorso-ventralmente e nadadeiras peitorais muito desenvolvidas, fundidas à cabeça, formando um contorno único denominado disco; cinco ou seis pares de fendas branquiais situados na parte ventral anterior do corpo; e dentículos dermo-epidérmicos que podem ser reduzidos, modificados ou ausentes (ROSA, 1985, ROSA; CASTELLO; THORSON, 1987; ROSA, 1990; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; DEYNAT, 2006; ROSA; CARVALHO; WANDERLEY, 2008; CARVALHO; LOVEJOY, 2011; CARVALHO, 2016). As arraias (Elasmobranchii) são derivadas de uma especiação de

tubarões atuais, adaptadas aos *habitats* bentônicos, algo que pode ser evidenciado por espécies de tubarão pertencentes aos esquatinóides dos Squalea, que ilustram como seria um estágio intermediário transicional até as arraias, o que também foi evidenciado por análise molecular (DOUADY *et al.*, 2003; WINCHELL; MARTIN; MALLATT, 2004; VELEZ-ZUAZO; AGNARSSON, 2011; NAYLOR *et al.*, 2012).

Figura 3 - Irradiação dos peixes. Relações filogenéticas de peixes com maxilas. Este diagrama representa os prováveis parentescos entre os principais grupos de gnatostomados basais. Linhagens extintas estão marcadas com uma adaga (+). Linhas negras mostram apenas parentesco; elas não indicam as épocas de divergência nem a presença não assinalada de táxons no registro fóssil. Os números em negrito indicam caracteres derivados que distinguem as linhagens. São mostrados apenas os parentescos melhor corroborados.



Fonte: POUGH; JANIS; HEISER, 2008. p.64

As arraias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae e estão inseridas no único grupo de elasmobrânquios adaptados a viver e se reproduzir exclusivamente em ambientes dulcícolas (HOORN, 2006; LOVEJOY; ALBERT; CRAMPTON, 2006; HOORN *et al.*, 2010a, b). Muitos estudos apontam que a origem da família Potamotrygonidae se deu a partir de um ancestral marinho que teria invadido o ambiente de água doce e, posteriormente, se diversificado para região neotropical. Em 1981, Brooks e colaboradores, baseados em um estudo filogenético de parasitas (nematódeos) que habitam o sistema digestório de arraias marinhas e de água doce, propuseram que o grupo irmão das arraias de água doce seria o gênero *Urobotis*. No entanto, estudos moleculares colocaram como grupo irmão o gênero *Himantura*, que apresenta representantes tanto no Oceano Atlântico quanto no Pacífico (LOVEJOY *et al.*, 1998).

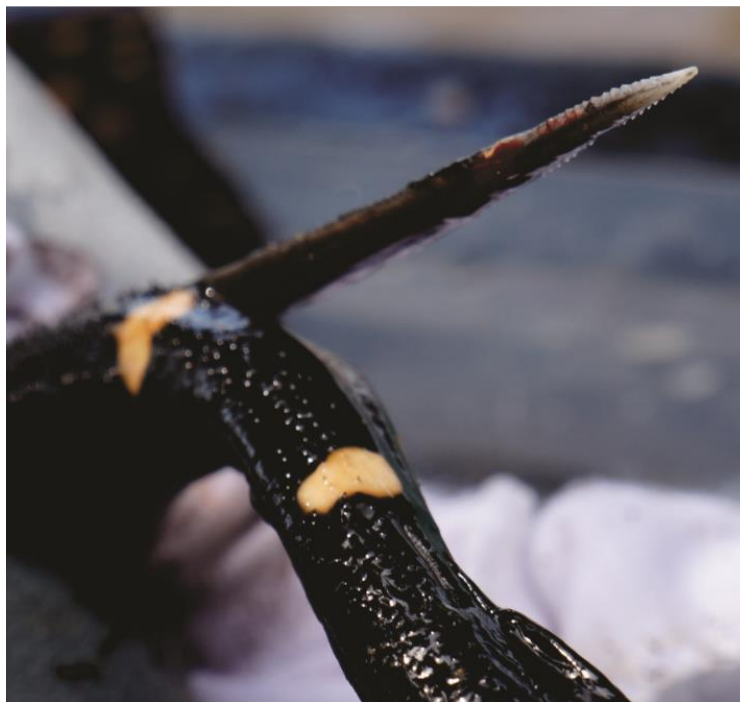
Para Lovejoy, Albert e Crampton (2006), as arraias provavelmente chegaram aos ambientes de água doce por intermédio da “incurção marinha”, algo que ocorreu com a separação do continente sul-americano do africano, anteriormente denominado como Gondwana. A separação dos continentes fez com que se criassem pequenos lagos de água salina. Com o passar dos anos, o sal da água foi se sedimentando, tornando a água mais salobra e, posteriormente, tornou-se um ambiente dulcícola. Esses eventos fizeram com que gradativamente as espécies de arraias que viviam nesses pequenos lagos se adaptassem aos diversos tipos de ambientes. Uma prova disso são os indivíduos do gênero *Himantura* e *Dasyatis* (Dasyatidae), seus representantes podem ocorrer tanto em águas doces quanto em estuarinas, ou nas ilhas do Oceano Pacífico (BIGELOW; SCHROEDER, 1953; ROSA, 1985; LOVEJOY, 1996). Incapacidade de retenção de ureia, redução da glândula retal, que ocasionou ausência da excreção de sal, modificações nas ampolas de Lorenzini, órgãos que podem detectar mudanças ambientais como temperatura, salinidade e campos elétricos, também são exemplos de adaptações que esse grupo sofreu ao longo dos anos para tolerar o ambiente dulcícola (THORSON; COWAN; WATSON, 1967; THORSON; HAMMER; OETINGER, 1983; ROSA; CHARVET-ALMEIDA; QUIJADA, 2010; LUCIFORA; GARCÍA; WORM, 2011).

Portanto, muitos órgãos sofreram severas modificações para a adaptação destes animais aos ambientes dulcícolas dentre eles a pele ou tegumento. O tegumento das arraias dulcícolas é pouco abordado na literatura, mas é sabido que este órgão exerce uma função importante no equilíbrio osmótico dos peixes, bem como na proteção contra agentes patógenos (MEYER, SEEGERS; STELZER, 2007; RAKERS *et al.*, 2010; ELLIOTT, 2011b).

Especificamente em elasmobrânquios, a epiderme pode apresentar quatro a oito camadas de células, o que pode variar dependendo da região do corpo ou da espécie (MEYER; SEEGERS, 2012). Ao comparar a epiderme de tubarões e arraias, observam-se muitas células secretoras colunares como característica epidérmica dominante. Nas arraias, a epiderme é mais compacta e parcialmente homogênea, e a distribuição das células colunares é irregular ao longo do corpo (MEYER; SEEGERS, 2012).

Uma das características do tegumento das arraias é a produção de toxinas que é feito pelo tecido epitelial que reveste o ferrão (Figura 4), algo que representa uma certa dualidade em relação ao encontro ocasional com seres humanos. Que por um lado pode ser negativo, visto que o animal pode ocasionar acidentes (Figura 5) e por outro lado positivo pois são fontes ricas de substâncias farmacologicamente ativas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006;2009; 2012).

Figura 4 - Aparato de Peçonha- Ferrão da *Potamotrygon rex*. Estrutura retroserrilhada, pontiaguda que em conjunto com as toxinas presentes na epiderme ocasionam o envenenamento do acidentado.

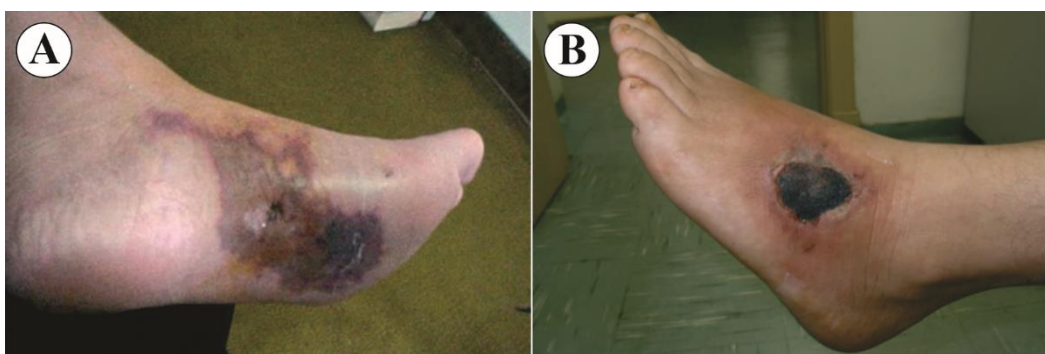


Fonte: o autor

Por isso, os estudos de caracterização morfológica/histológica do ferrão de arraias demonstraram grande importância na clínica terapêutica dos acidentes, e para determinar a linha dos ancestrais dos Potamotrigonideos. Em um estudo histológico com arraias marinhas, Dehghani *et al.* (2010) encontraram células especializadas na produção de toxinas dispersas por todo o ferrão, assim como naqueles encontrados nas arraias de água

doce descritas por Pedroso *et al.* (2007). Eles identificaram semelhanças morfológicas entre as células epidérmicas presentes no ferrão das espécies do gênero *Himantura* e *Potamotrygon*, algo que confirmou a hipótese proposta por Loverjoy *et al.* (1998), demonstrando a importância de trabalhos de caracterização morfológica, bem como de caracterização do veneno, para compreender a relação entre os animais que habitam esses dois ambientes.

Figura 5 - Acidentes ocasionados por arraias de água doce. A- Necrose superficial instalada ao redor da ferroadada 48 horas após o acidente. B- Escara enegrecida, resultante do tecido necrosado pela ação das toxinas, em acidente com cerca de oito dias de evolução.



Fonte: Garrone Neto e Haddad Jr., 2010 p. 85

4.3 As arraias no continente sul-americano – a Bacia Araguaia-Tocantins

Atualmente o continente sul-americano possui um território de mais de 18 milhões de quilômetros quadrados, localizado a oeste do meridiano de Greenwich, na porção ocidental do globo. Seu relevo é caracterizado por planícies e planaltos, representados por baixas altitudes (IBGE, 1999). Por conta de sua posição geográfica, a América do Sul possui grande diversidade climática que vai do frio montanhoso até o árido deserto. Além disso, possui uma ampla abundância de recursos hídricos, entre eles, destacam-se a Bacia Amazônica e a Bacia Araguaia-Tocantins. Com um número exorbitante de recursos hídricos e diversas formas de relevo, a América do Sul possui uma vegetação exígua que percorre desde as mais altas planícies montanhosas ao leito dos rios (MANTENSSO-NETO, 2004; REBOITA *et al.*, 2012; ROSS, 2016).

O rio Amazonas apresenta 6.500 km de extensão e área de drenagem superior a 5,8 milhões de quilômetros quadrados (BARTONELLI, 2012). Sua bacia hidrográfica é formada por sete países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela. No Brasil, o rio se estende por mais de 3,8 milhões de quilômetros quadrados e banha os

estados do Acre, do Amazonas, do Amapá, de Rondônia, de Roraima, do Pará e do Mato Grosso (BARTONELLI, 2012). O conjunto de rios que formam a Bacia do rio Amazonas fornece um sistema aquático que favorece a especiação e pode prover condições ideais para o desenvolvimento da diversidade de peixes (SANTOS; FERREIRA, 1999). A Bacia Amazônica também pode ser considerada mais rica em biodiversidade, além da mais diversificada em espécies de peixes de água-doce do mundo, onde o número de espécies descrito pode ultrapassar 5.000 (SANTOS; FERREIRA, 1999; ROSA; CARVALHO, 2007).

A Bacia Araguaia-Tocantins é uma das mais importantes do Brasil, apresenta área de drenagem com aproximadamente 767.000 km² (BARTONELLI, 2012). Especificamente, o rio Tocantins drena uma área com cerca de 343.000 km², nasce na região central do Brasil (estado do Goiás), corre do Sul para o Norte (CLARO-GARCÍA, 2013) e termina no delta do Amazonas, na Baía de Marajó, próximo à cidade de Belém, no estado do Pará (SANTOS *et al.*, 2004). A ictiofauna da Bacia do Araguaia-Tocantins está intimamente relacionada à Bacia do rio Amazonas, especialmente no curso inferior (GOULDING; BARTHEM; FERREIRA, 2003), mas é notável por conter alto grau de endemismo e alta diversidade (SANTOS *et al.*, 2004; HUBERT; RENNO, 2006; LUCINDA; AGOSTINHO; OLIVEIRA, 2007; ABELL *et al.*, 2008; BERTACO; CARVALHO, 2010; CARVALHO; BERTACO; JEREP, 2010; BERTACO; JEREP; CARVALHO, 2011; BARTOLETTE *et al.*, 2012; CARVALHO, 2016).

A desembocadura dos rios Amazonas e Tocantins forma o estuário amazônico, que geograficamente apresenta um arquipélago de ilhas fluviomarinhas onde se destaca a Ilha de Marajó com seus diversos ambientes e *habitats* (ALMEIDA *et al.*, 2008). A baixa variabilidade sazonal da temperatura e com alterações na salinidade pela influência das correntes marinhas torna esse ambiente único, onde é possível a ocorrência tanto de arraias marinhas quanto arraias dulcícolas (PAULY, 1984; SANYO TECHNO MARINE, 1998).

É possível encontrar arraias de água doce na maioria dos grandes rios da América do Sul que drenam para o Oceano Atlântico e para o mar do Caribe. Esses animais ainda não foram encontrados nos rios pertencentes à Bacia do São Francisco e em algumas bacias costeiras do leste do Brasil (ROSA, 1985; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003).

No Brasil, a maior diversidade de espécies de Potamotrigonideos está localizada na Bacia Amazônica (ROSA, 1985; ARAÚJO, 1998; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA,

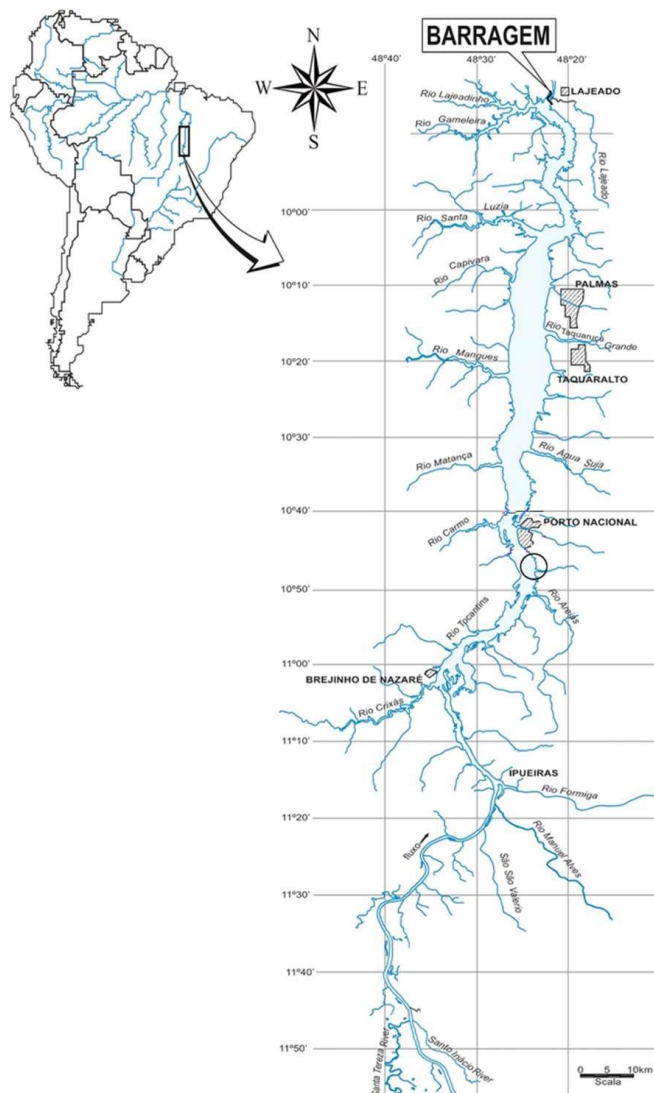
2003). Esses peixes cartilaginosos estão distribuídos em quatro gêneros, reconhecidos atualmente como *Potamotrygon*, com 35 espécies, *Plesiotrygon* e *Heliontrygon*, com duas, e *Paratrygon*, com apenas uma espécie (ROSA, 1985; ROSA; CASTELLO; THORSON, 1987; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; DEYNAT, 2006; ROSA; CARVALHO, 2007; ROSA; CARVALHO; WANDERLEY, 2008; CARVALHO; LOVEJOY, 2011; CARVALHO, 2016; SILVA; LOBODA, 2019).

Nas Bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, são encontradas seis espécies de arraias que apresentam ampla distribuição: *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon henlei*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*. No entanto, esses são ambientes de grande endemismo e podemos observar a espécie *Potamotrygon wallacei*, que é endêmica ao rio Negro (CARVALHO, 2016; DUNCAN, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e as espécies *Potamotrygon rex* e *Potamotrygon garmani*, à Bacia do rio Tocantins (CARVALHO, 2016; FONTENELLE; CARVALHO, 2017). Embora haja registro de Garavello *et al.* (2010) da ictiofauna no trecho do médio Tocantins, o volume de informações sobre a fauna de peixes da bacia hidrográfica desse rio ainda está subamostrada, e o conhecimento da ictiofauna continental dessa área de transição entre ecorregiões e biomas carece de mais estudos (LANGEANI *et al.*, 2009). Nas listas mundiais, 89% das espécies de arraias dulcícolas não apresentam classificação por não apresentarem dados suficientes para estimar o número de espécies e adotar medidas de conservação (LAST *et al.*, 2016).

A espécie *P. rex* ocorre exclusivamente na região do médio e alto rio Tocantins. A classificação da compartimentação da drenagem em três segmentos é muito comum entre os estudos geomorfológicos, em que se utiliza a denominação de alto, médio e baixo curso para auxiliar nas pesquisas relacionadas aos processos hidrológicos de uma bacia (FRANÇA, 2019). Especificamente as regiões do médio e alto rio Tocantins ficam entre os municípios de Peixe e Pedro Afonso (Figura 6).

Cabe salientar que as regiões do médio e alto rio Tocantins são regiões impactadas pelo uso e pela ocupação do solo e pela construção de usinas hidrelétricas (UHE), o que alterou permanentemente esses ambientes (SANTOS *et al.*, 2020).

Figura 6 – Delimitação da área do médio e alto rio Tocantins, do município de Ipueiras ao município de Lajeado - TO, Brasil.



Fonte: Santos *et al.* (2020, p. 412).

4.4 As arraias de água doce e a toxicidade no tegumento

As arraias de água doce vivem no fundo dos rios e geralmente repousam sob a areia e, quando estão em período reprodutivo ou em busca de alimento, migram do fundo para locais mais rasos (RINCON FILHO, 2006; GARRONE NETO; 2009). Em um trabalho com duas espécies de arraias da família Potamotrygonidae, Garrone Neto (2012) notou que os indivíduos juvenis geralmente estavam associados a praias arenosas e locais com profundidade abaixo de quatro metros ao longo de todo o dia. Por outro lado, as arraias de grande porte (adultos) realizavam migrações batimétricas utilizando locais com profundidade superior a oito metros de profundidade durante o dia e áreas mais rasas durante a noite.

Um outro estudo realizado com duas espécies de arraias da família Potamotrygonidae (*Potamotrygon rex* e *Paratrygon aiereba*) caracterizou sua distribuição nos diferentes ambientes (lagoas, tributários e calha do rio Tocantins) no médio e alto rio Tocantins. Os resultados demonstraram que as arraias não apresentaram preferência de ocupação pelos ambientes analisados, contudo foram mais coletadas em locais próximos às margens, com maior frequência no período noturno (SANTOS *et al.*, 2020). Outro estudo, também realizado no médio e alto rio Tocantins, avaliou as respostas fisiológicas das arraias *Potamotrygon rex* em relação a variações do ambiente, ocorridas durante o ciclo hidrológico (períodos chuvoso/estiagem), e verificaram-se alterações ambientais e fisiológicas nos animais. Foram observadas mudanças no peso, hematócrito, hemoglobina e glicose plasmática desses animais em detrimento da mudança dos ciclos hidrológicos, o que sugere a plasticidade da espécie para suportar as variações sazonais da região (SANTOS *et al.*, 2020).

Esse ciclo hidrológico observado para a região Norte e Centro-Oeste do Brasil traz um período seco no inverno e outro período úmido bem acentuado, com chuvas torrenciais no verão (RINCON FILHO, 2006). É no período de estiagem (seca) que o volume de água dos rios reduz drasticamente, expondo extensos bancos de areia que formam as praias de água doce, que atraem banhistas e pescadores esportivos de diversas partes do país (SANTOS *et al.*, 2014), algo que aproxima as arraias das pessoas.

No entanto, o Estado do Tocantins possui uma elevada incidência de acidentes durante todo o ano, devido à existência permanente de praias de areia formadas pelo alagamento de barragens e da construção de usinas hidroelétricas, sendo procuradas por moradores ribeirinhos para recreação e pesca, bem como, pela população em geral no período de férias (SANTOS *et al.*, 2014). No Tocantins, em 2017, a Secretaria de Saúde registrou 405 casos de acidentes por arraias nas praias de Palmas, sendo 40% dessas ocorrências nos meses de junho e agosto, período com maior concentração de turistas nas praias.

As arraias são animais dóceis, não agridem ou atacam, entretanto, quando pisadas, nas nadadeiras laterais ou no centro do dorso, movimentam sua cauda e a direcionam para o agente agressor. O aparelho de inoculação de veneno das arraias é denominado de ferrão ou espinho (CARAS, 1974; GARRONE-NETO; HADDAD JR., 2009), que se localiza na cauda do animal (linha dorsal mediana), contudo a posição do ferrão pode variar de acordo com a espécie (ROSA, 1985, ROSA; CASTELLO; THORSON, 1987; THORSON *et al.*, 1988; CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003; DEYNAT, 2006;

ROSA; CARVALHO, 2007; ROSA; CARVALHO; WANDERLEY, 2008; CARVALHO; LOVEJOY, 2011; CARVALHO, 2016).

O ferrão perfura o tecido do agressor causando uma lesão mecânica, e o conteúdo presente no ferrão se deposita no tecido lesado (HALSTEAD, 1967), aumentando os sintomas de dor e o quadro inflamatório característico do acidente, que também pode desencadear necrose. A dor na primeira hora é descrita como insuportável (SANTOS *et al.*, 2014).

Os envenenamentos por arraias de água doce podem resultar em incapacitação temporária ou definitiva. Além disso, o ferimento pode demorar meses para cicatrizar. Alguns indivíduos também podem manifestar tonturas, mialgia, enxaqueca, febre, sudorese, náuseas e vômitos no período pós-acidente. Geralmente, as vítimas ficam com cicatrizes ou sequelas (PIOLA *et al.*, 2001; GUTIERREZ; BENÍTEZ GUERRA; BENÍTEZ GUERRA, 2004; HADDAD JR. *et al.*, 2004; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010; CASTRO *et al.*, 2016; PASSOS *et al.*, 2016; ABATI *et al.*, 2017) e, em alguns casos, pode ocorrer amputação do membro afetado (SÁ-OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Não há um tratamento específico para esse tipo de acidente, a abordagem terapêutica é baseada no uso de analgésicos, anti-inflamatórios, água morna para aliviar a dor intensa e uso de antibióticos para prevenir infecção secundária (HADDAD JR. *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010).

Muitos estudos foram realizados com as arraias do médio e alto rio Tocantins para elucidar os componentes presentes no tegumento desses animais, que desencadeiam os sintomas clínicos do acidente. Magalhães *et al.* (2006) publicaram sobre a determinação das atividades tóxicas do veneno das arraias *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. Posteriormente, novos peptídeos como Orpotrin e Porfflan foram relatados no muco da arraia dessa mesma espécie (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006, 2009), além de uma nova proteína antimicrobiana presente no muco do dorso da arraia *Potamotrygon cf. henlei* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012), espécie descrita recentemente como *Potamotrygon rex* (CARVALHO, 2016). Estudos caracterizaram os sintomas pós-envenenamento no muco e no tegumento o ferrão (SANTOS *et al.*, 2011); o mecanismo inflamatório induzido no acidente (SANTOS *et al.*, 2017); e a interferência da idade e do sexo na toxicidade desencadeada no acidente por de *P. rex* (SANTOS *et al.*, 2019).

Portanto, as arraias secretam as mais diversas substâncias que compõem a cutícula ou o estrato córneo, que revestem o tegumento (MEYER; SEEGER, 2012). Sua produção é ativada de acordo com a perturbação do ambiente (ELLIOTT, 2011a, b), e,

em determinadas regiões do corpo, como o ferrão, podem secretar moléculas com maior toxicidade. Portanto, estudar a estrutura do tegumento, os componentes produzidos por suas células e os fatores que impulsionam essa produção podem ajudar na compreensão do seu papel fisiológico, para o animal, e do quadro clínico desencadeado no acidente.

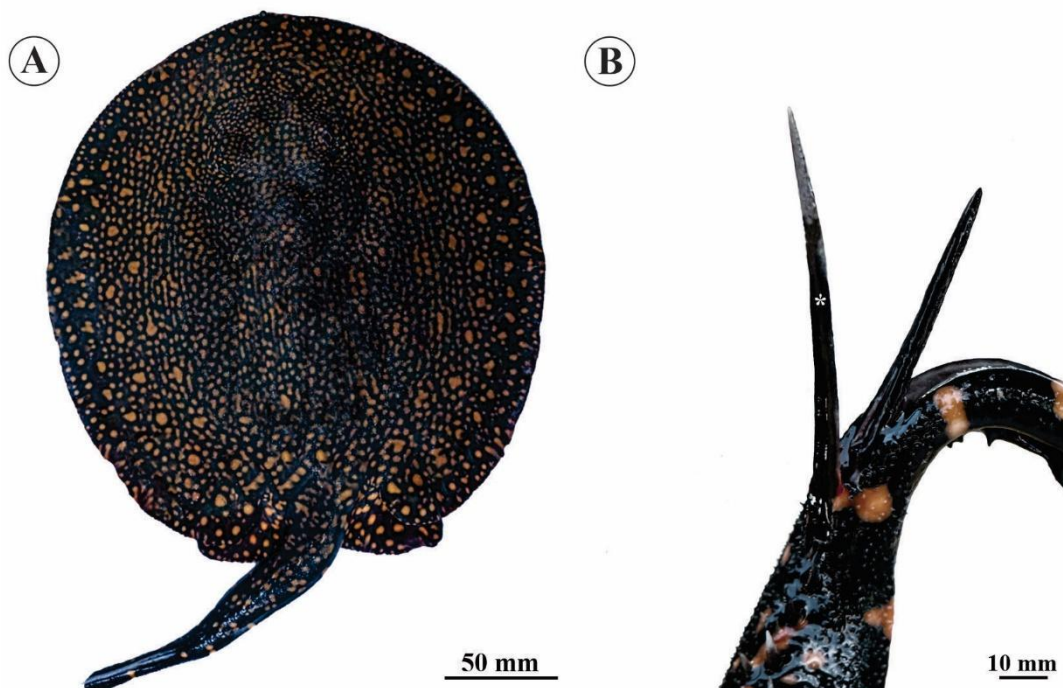
5. Histologia e morfologia do tegumento e ferrão das arraias de água doce *P. rex*

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Estrutura geral

A arraia *P. rex* possui o corpo grande e achatado dorso-ventralmente, apresenta dentículos dérmicos por todo o dorso, pele escura, com manchas intensas de amarelo a laranja que se estendem até a cauda (Figura 7A). Possui uma cauda fina e longa com uma fileira dupla de espinhos, na porção mediana, apresenta de um a dois ferrões (Figura 7B). A superfície do corpo é constituída por uma camada contínua de tecido epitelial, denominada tegumento, que é revestindo externamente por uma substância de aspecto viscoso.

Figura 7 – Exemplar adulto da arraia *P. rex*. A – Vista dorsal da arraia. B – Cauda da arraia apresentando dois ferrões fixados na porção mediana da cauda, na região dorsal, onde o ferrão mais externo (*) é maior do que o mais interno.

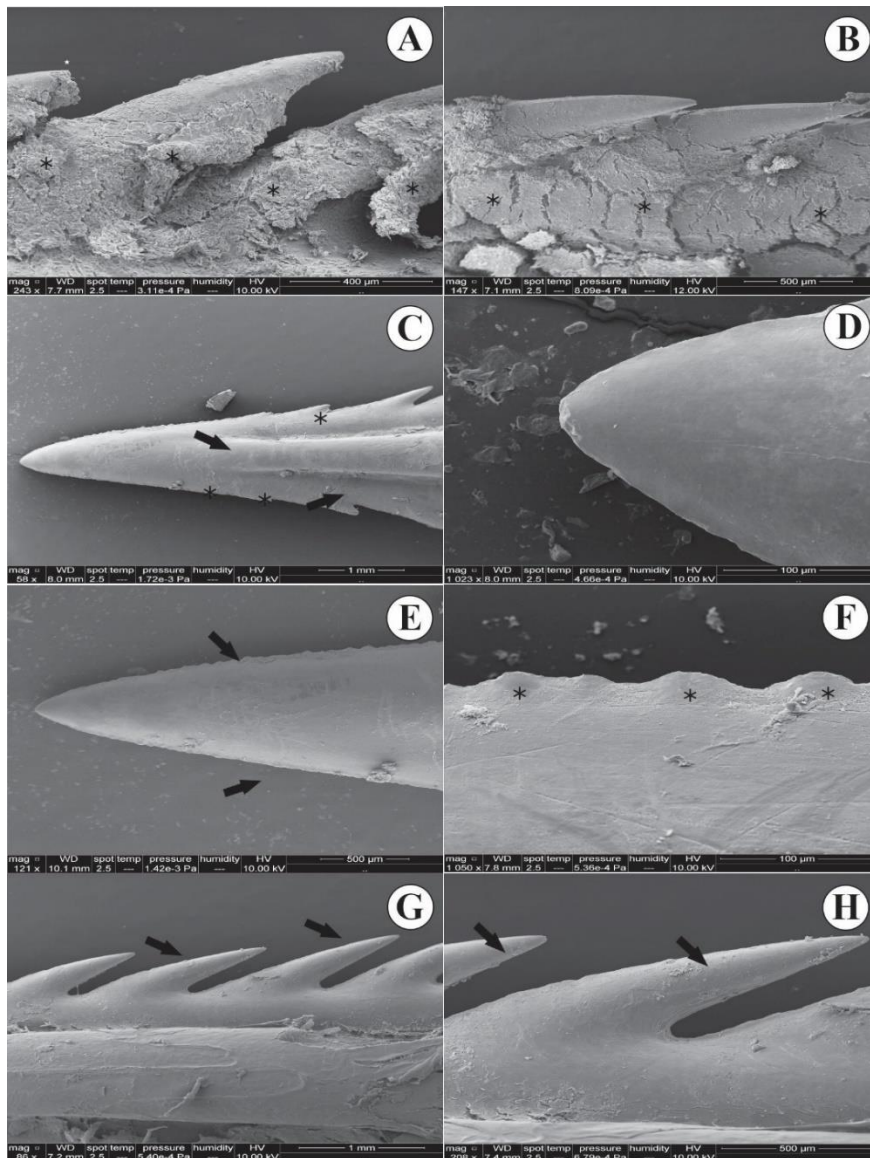


Fonte: o autor

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do ferrão

No MEV, foi possível observar o revestimento celular ao longo de todo o ferrão (Figura 8A e B). Essas células pavimentosas se soltam facilmente da região mineralizada, localizada logo abaixo do tecido (Figura 8A e B).

Figura 8 – MEV do ferrão da arraia *P. rex*. A e B – Células formando o tegumento do animal (*). Em algumas regiões em que o epitélio se destacou, é possível observar a região mineralizada (RM). C – Estrutura mineralizada próxima ao ápice do ferrão, evidenciando os sulcos ventro-laterais (setas). D – Detalhe da parte mineralizada do ferrão, evidenciando seu ápice pontiagudo. E – Lateral – formação de pequenas projeções (setas) nas laterais do ferrão. F – Detalhe de projeções laterais do ferrão, denominadas serrilhas (*). G – Cristas laterais em desenvolvimento (setas). H – Cristas laterais totalmente desenvolvidas (setas).



Fonte: o autor.

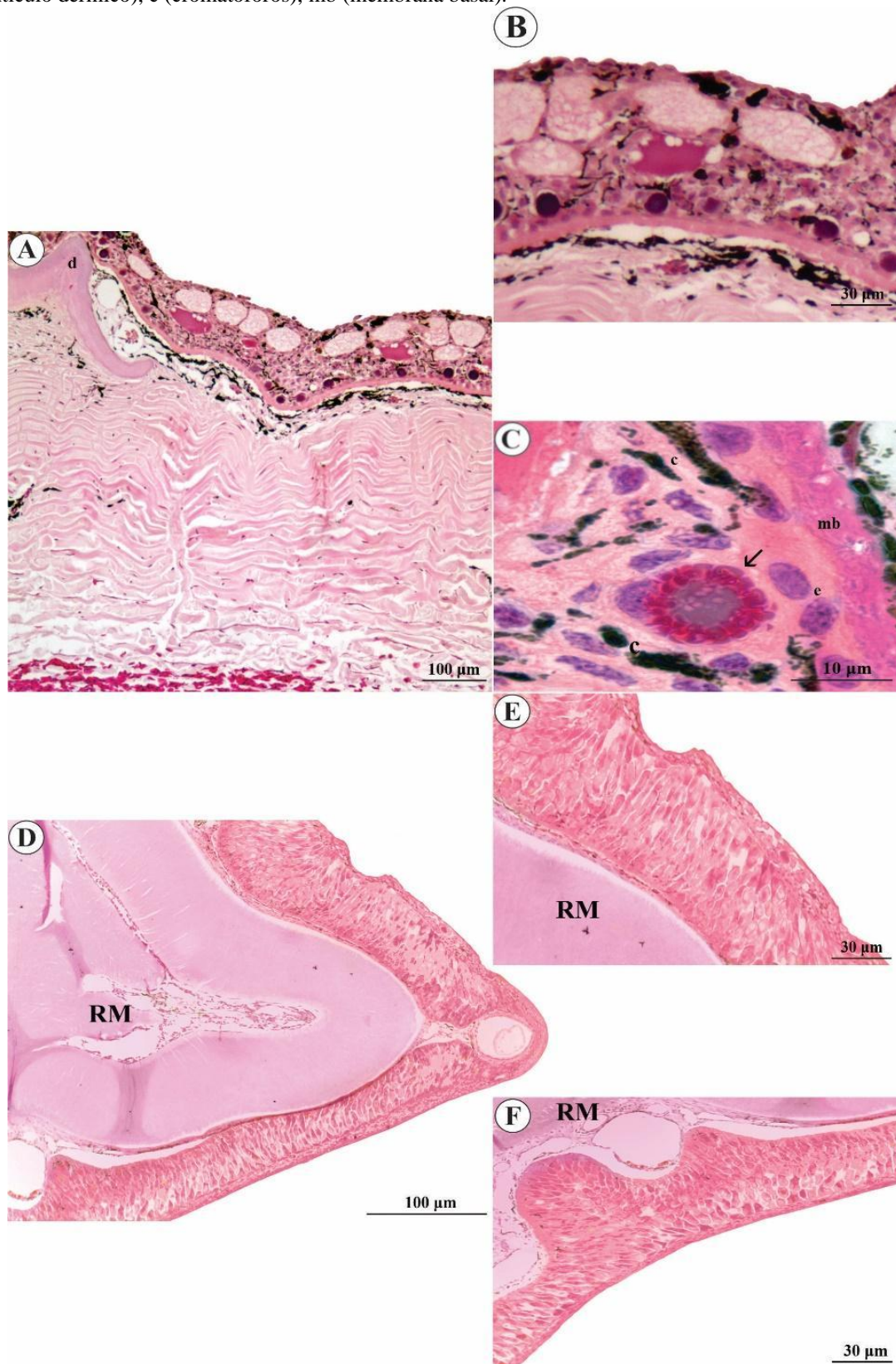
A região mineralizada do ferrão tem a forma de uma seta pontiaguda e, logo após o ápice, na porção ventral, sulcos centrais podem ser facilmente visualizados (Figura 8 C). Ao longo do ferrão, projeções laterais são observadas (Figura 8D - H). No ápice, são praticamente imperceptíveis (Figura 8D), mas vão se tornando mais salientes e maiores ao longo do ferrão, formando verdadeiras espículas, as cristas laterais (Figura 8F - H).

5.1.3 Análise histológica e histoquímica

Entre as diferentes regiões do dorso que foram analisadas neste estudo (Figura 1A), os tecidos não apresentaram diferenças morfológicas significativas, do mesmo modo, as diferentes partes do ferrão estudadas (Figura 1B e C) também não apresentaram alterações morfológicas relevantes. Portanto, neste estudo, não serão identificados os locais de coleta dos tecidos do dorso e dos ferrões da arraia. Alguns aspectos peculiares serão referidos, quando necessários.

Os epitélios do dorso e do ferrão são organizados em três camadas: basal, intermediária e superficial. O epitélio do tegumento do dorso de *P. rex* é constituído por tecido epitelial pavimentoso estratificado não queratinizado, com camadas de células epiteliais distintas. As células epiteliais da camada basal (camada germinativa) são cúbicas, com núcleo arredondado e citoplasma basófilo, e estão apoiadas sobre a membrana basal (Figura 9A - C). As mais superficiais (camada superficial) formam de duas a três camadas de células achatadas e justapostas (Figura 9A e B). Entre a superfície e a membrana basal, são observadas várias camadas de células epiteliais que estão mais afastadas umas das outras e formam a camada intermediária (Figura 9A e B). Entre essas células, é possível notar várias células mucosas, volumosas, que estão localizadas próximas à camada superficial (Figura 9A e B). Áreas eosinofílicas, de aspecto homogêneo e de tamanhos variáveis, foram notadas logo abaixo das células mucosas (Figura 9A e B). Alguns cromatóforos foram observados entre as células epiteliais, porém são vistos em maior quantidade no tecido conjuntivo, contíguo ao epitélio (Figura 9C). Células granulosas foram frequentemente notadas, geralmente alinhadas à membrana basal (Figura 9C). Seu núcleo possui cromatina frouxa e está situado na periferia da célula. O citoplasma possui grânulos eosinofílicos, localizados na região mais periférica, formando um verdadeiro cinturão. Na região mais central, desprovida de grânulos, a presença de estruturas com arranjo semelhante a um sistema de canalículos é notada (Figura 9C).

Figura 9 – Fotomicrografia da epiderme do dorso. A – Detalhe das células dispostas em camadas. B – Detalhe das células epiteliais. C – Ferrão. D, E, F – Detalhe da região dorso lateral do ferrão. Célula Epitelial Basal (e); e Célula Eosinofílica (seta). Legendas: RM (região mineralizada), TC (tecido conjuntivo), d (denticulo dérmico), c (cromatóforos), mb (membrana basal).



Fonte: o autor.

Apesar de todas as regiões do dorso da arraia que foram estudadas (Figura 1A) apresentarem a mesma estrutura morfológica, a sua aparência geral variou de acordo com a região observada (Figura 10A - E). Assim, nas regiões da base da cauda (Figura 10B) e na região central (Figura 10C), as células mucosas formaram várias camadas, provocando, inclusive, aumento da espessura do tegumento.

O ferrão consiste basicamente em três tipos de tecidos: tecido epitelial, tecido conjuntivo propriamente dito e tecido cartilaginoso (Figura 9D). No tecido epitelial, a camada superficial está formada por células pavimentosas não queratinizadas organizadas em camadas. A camada intermediária apresenta células epiteliais cilíndricas espaçadas. Na camada basal, as células epiteliais cúbicas são jovens e estão em contato direto com a membrana basal (Figura 9D). Entre as diferentes camadas de células epiteliais, foram observados cromatóforos, porém células mucosas e células eosinofílicas não foram encontradas.

O epitélio do dorso da *P. rex* apresentou os mesmos resultados para as reações histoquímicas para todas as regiões analisadas. As células de muco foram positivas para PAS, assim como a membrana basal (Figura 11A).

Figura 10 – Micrografias coradas em H&E demonstrando a morfologia celular ao longo do dorso da arraia *P. rex*. A – Mediana da cauda. B – Base da cauda. C – Região cefálica. D – Nadadeira lateral esquerda. E – Nadadeira lateral direita. Legendas: TC (tecido conjuntivo); d (dentículo dérmico).

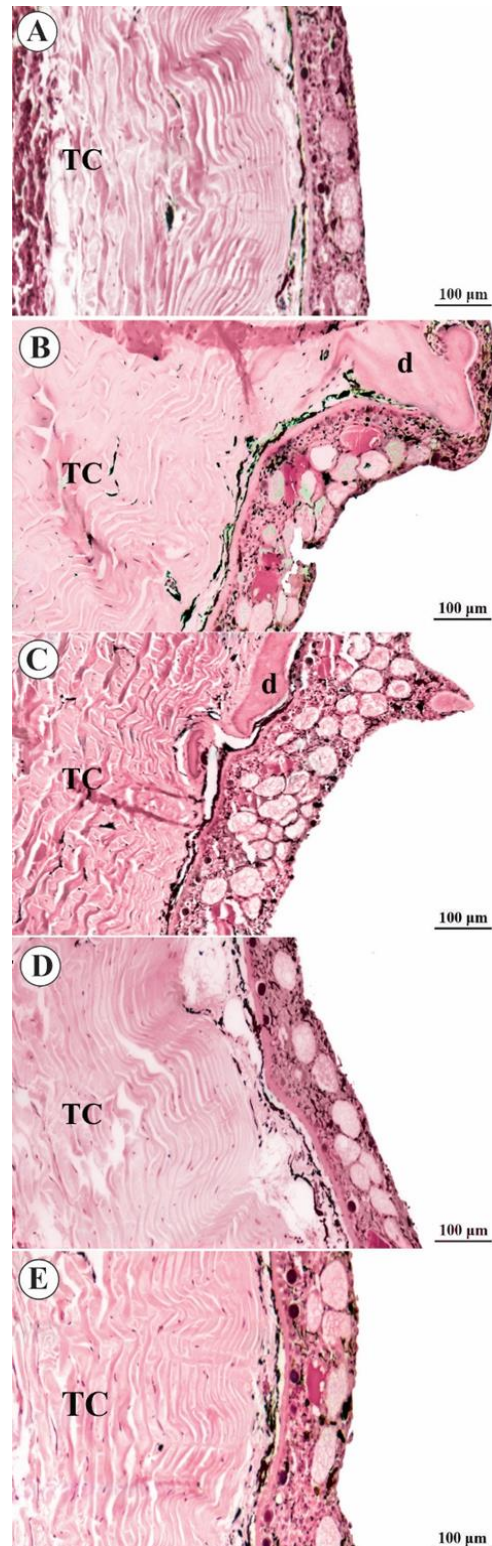
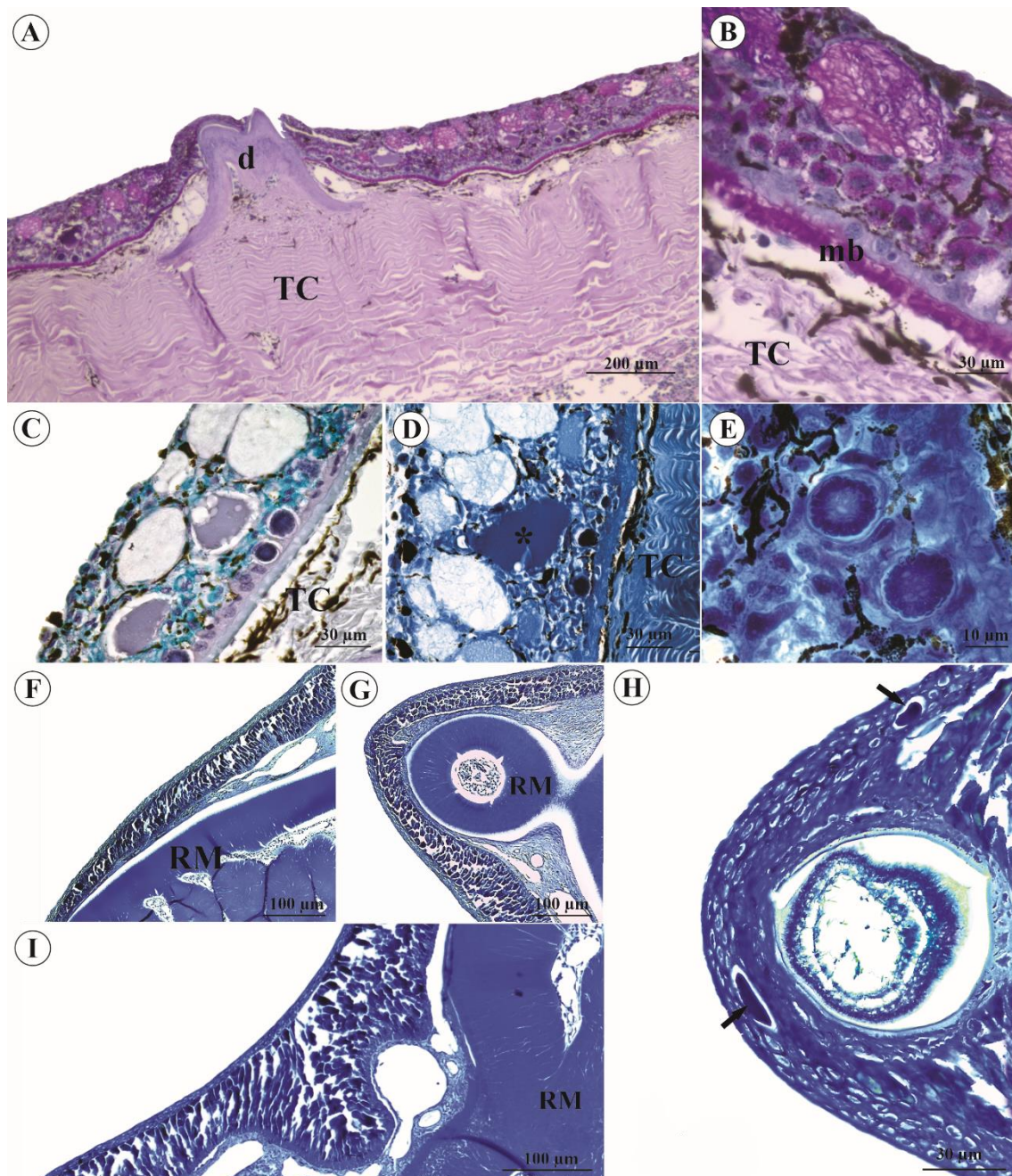


Figura 11 – Histoquímica do dorso (A, B, C, D, E) e ferrão da arraia *P. rex* (F, G, H). A – Micrografia demonstrando as células de muco positivas ao método histoquímico de PAS. B – Ampliação da imagem evidenciando que as células epiteliais também apresentaram citoplasma positivo ao PAS, bem como a membrana basal (mb). C – Células epiteliais positivas ao *Alcian Blue*. D – Células epiteliais positivas ao Azul de Bromofenol, detalhe (*) região arredondada fortemente positiva ao Azul de Bromofenol. E – Células eosinofílicas positivas ao Azul de Bromofenol. F, G e I – Regiões do ferrão com todas as células positivas ao Azul de Bromofenol. H – Setas demonstrando reservatórios proteicos presentes no ferrão. Legenda: RM (região mineralizada).



Fonte: o autor.

As células epiteliais da camada intermediária se apresentaram levemente positivas para o PAS (Figura 11B), assim como para o *Alcian Blue* (Figura 11C). A reação com o Azul de Bromofenol foi fortemente positiva naquelas regiões com aspecto homogêneo e de tamanhos variados, nas células epiteliais de todas as camadas e nos grânulos que formam as células granulosas (Figura 11D).

Para as reações histoquímicas realizadas no ferrão, somente o Azul de Bromofenol se mostrou presente por toda a extensão do tecido epitelial, sendo mais fortemente positivo nas células epiteliais que formavam a camada intermediária (Figura 11E - G).

No tecido do dorso e do ferrão, foram encontradas áreas fortemente coradas com Azul de Bromofenol, representando áreas de reserva de proteínas, onde não foi possível visualizar o núcleo. No dorso, esses reservatórios estão localizados próximos às células de muco na camada intermediária. No ferrão, estão localizados na camada superficial em contato com as células epiteliais superficiais (Figura 11 D e I).

5.2 DISCUSSÃO

A pele que recobre o dorso da *P. rex* é densamente coberta por escamas placóides, estrutura comum ao grupo dos elasmobrânquios (KEMP, 1977; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004). As arraias apresentam o corpo achatado dorsoventralmente, com olhos e espiráculos situados na região dorsal (HALSTEAD, 1988). Segundo Carvalho (2016), a arraia de água doce *Potamotrygon rex* apresenta caracteres únicos, como cor dorsal enegrecida a castanha-escura, com manchas intensas de amarelo a laranja, formando grupos concêntricos distintos no disco dorsal e na cauda, separado por um padrão reticulado delgado de cor de fundo escura. A espécie é endêmica do médio e alto rio Tocantins e compõe um grupo de arraias negras, que ocorrem em rios que drenam o escudo central brasileiro.

As arraias peçonhentas (do inglês *stingrays sting*, ferrão; *rays*, arraias) são pertencentes à classe dos Chondrichthyes, subclasse dos Elasmobranchii e da ordem dos Myliobatiformes, sendo a única ordem de arraias que apresentam ferrões na cauda (LOVEJOY, 1996; MCEACHRAN; ASCHLIMAN, 2004; NELSON, 2006). Popularmente conhecido como ferrão, espinho ou esporão, o órgão inoculador de peçonha das arraias é facilmente visível (CARAS, 1974). Está localizado na linha dorsal mediana da cauda, como descrito em outros estudos com arraias dulcícolas da família Potamotrygonidae (THORSON *et al.*, 1988; CHARVET-ALMEIDA *et al.*, 2002;

CARVALHO; LOVEJOY; ROSA, 2003). As arraias deste estudo apresentaram de um a dois ferrões sobrepostos (o maior ferrão acima do menor), sendo sua troca periódica. Segundo Halstead (1967), o ferrão é formado por duas camadas, uma interna, composta por vaso dentina; e outra externa de esmalte, apresentando uma estrutura morfológicamente semelhante aos dentículos dérmicos encontrados dispersos por todo o corpo do animal (HALSTEAD; BUNKER, 1953; HALSTEAD, 1967; HALSTEAD, 1970; HALSTEAD, 1988).

No microscópio eletrônico de varredura, observou-se que a parte mineralizada do ferrão, na porção apical, é pontiaguda, apresentando suaves projeções laterais, que se tornam mais evidentes em direção à base do ferrão. Provavelmente, essas projeções são resultado do acúmulo de substâncias presentes nos dentículos dérmicos, que vão se tornando mais proeminentes ao longo do ferrão, estruturando as cristas laterais. A morfologia do ferrão da presente espécie é semelhante ao descrito para a arraia marinha *Himantura imbricata*. Alguns autores associam a dureza do ferrão à dilaceração do tecido da vítima (HALSTEAD, 1967; RAVI *et al.*, 2008; JAWAD *et al.*, 2018).

Sobre toda a superfície do ferrão da *P. rex* encontra-se uma fina camada de epitélio. Halstead, em 1967, descreveu o epitélio de arraias marinhas e dulcícolas e mencionou que o ferrão era coberto por um tecido cinza e fino conectado com a bainha tegumentar na derme. Para o autor, a epiderme é arrebatada sob pressão e fica dentro da ferida da vítima, ocasionando uma traumatização adicional ao efeito mecânico da penetração do ferrão.

O tegumento que reveste o ferrão de *P. rex* é constituído por três camadas distintas de células epiteliais: camada basal, intermediária e superficial, o que sugere que essas camadas apresentam funções distintas. A camada basal tem função de reposição celular. A camada intermediária apresenta células epiteliais que provavelmente estão relacionadas com a produção de toxinas ou parte dela. Trata-se de células fortemente positivas para a reação de Azul de Bromofenol, indicando atividade de síntese de proteínas e presença de dissulfetos. Já a camada superficial está relacionada com a proteção da estrutura.

Não foram observados dutos secretores nas células de revestimento do ferrão da *P. rex*, semelhante ao encontrado em outros estudos. Halstead (1970) nomeou as células do tegumento do ferrão, com grandes quantidades de proteína, como células especializadas na produção de toxinas, pois participavam da constituição do conteúdo venenoso, e classificou-as como células holócrinas. Segundo o autor, o acúmulo de secreção no citoplasma rompe a membrana plasmática, extravasando o conteúdo

citoplasmático para o exterior da célula. Esse resultado foi contestado por Smith *et al.* (1974), que relataram não ter observado evidências de secreção holócrina para essas células. Smith *et al.* (1974, 1981), utilizando microscopia eletrônica de transmissão, encontraram nas células especializadas na produção de toxinas de *D. sabina* um tipo peculiar de microtúbulo, com diâmetro menor do que o normal, e sugeriram que estariam envolvidos com a secreção de polímeros proteicos contidos no veneno, por isso, era mantido isolado do restante do citoplasma. Em estudo posterior, Pedroso *et al.* (2007) sugeriram que os microtúbulos poderiam ser utilizados para identificação desse tipo celular. As células especializadas na produção de toxinas sintetizam proteínas especialmente para o uso interno. A presença do citoplasma eletrodense, cheio de polissomos, e a ausência de vacúolos secretores foram evidências encontradas por Pedroso *et al.* (2007).

A arraia de água doce *P. rex* também apresentou um epitélio dorsal constituído por tecido epitelial pavimentoso estratificado não queratinizado, com camadas de células epiteliais distintas: camada basal, camada intermediária e camada superficial. As células epiteliais da camada basal (camada germinativa) são cúbicas, com núcleo arredondado e citoplasma basófilo, e estão apoiadas na membrana basal. Quando comparadas com tubarões, o tegumento dorsal das arraias apresenta uma distribuição irregular de células com característica compacta e homogênea (MEYER; SEEGERS, 2012). Para Wirth (1999), as células basais das arraias apresentam o núcleo grande e lobado com células cúbicas mitoticamente ativas e ancoradas em uma membrana basal.

A camada superficial do tegumento da *P. rex* forma de duas a três camadas de células achatadas e justapostas. Para Meyer, Seegers e Stelzer (2007), as células da camada superficial do tegumento das arraias possuem um citoplasma com muitas vesículas de densidades diferentes e estreitamente acumuladas visíveis apenas em microscopia eletrônica de transmissão.

Neste estudo, foi verificado que a camada intermediária do tecido do dorso de *P. rex* é formada por células epiteliais justapostas, células mucosas (caliciformes), que são grandes e volumosas e ficam próximas à camada superficial, cromatóforos e células eosinofílicas. As células mucosas encontradas em *P. rex* são semelhantes às células caliciformes comuns à maioria dos grupos de animais e estão presentes na superfície corporal de quase todos os peixes (WHITEAR, 1986; ELLIOTT, 2011a). Geralmente apresentam o núcleo e organelas periféricas (ELLIOTT, 2000). Segundo Whitear (1986), os peixes apresentam dois tipos de células caliciformes, as mucosas e as serosas. As

secreções mucosas contêm glicoproteínas, que geralmente exibem uma coloração fracamente basofílica ou permanecem sem coloração em cortes histológicos, ao passo que as serosas contêm proteínas básicas e, conseqüentemente, coloração acidofílica (BLACKSTOCK; PICKERING, 1980; WHITEAR, 1986). Tanto em peixes ósseos quanto em cartilagenosos, as células caliciformes mucosas são mais comuns (WHITEAR, 1986). Estudos sugerem que elas se diferenciam das células epiteliais nas camadas inferiores da epiderme (ELLIOTT, 2000). Uma vez diferenciadas, não sofrem divisão mitótica adicional (ELLIOTT, 2011a). Essas células podem ter muitas funções como proteção e regulação contra micro-organismos, osmorregulação, além de auxiliar nas trocas gasosas (WHITEAR, 1986; ELLIOTT, 2000; 2011b).

De modo geral, tanto teleósteos quanto elasmobrânquios apresentam uma camada intermediária contendo diversos tipos de células especializadas na secreção de variadas substâncias (WHITEAR; MOATE, 1998; WIRTH, 1999; MEYER; SEEGER, 2012). Células como cromatóforos foram encontradas em contato com todas as camadas do tecido epitelial da *P. rex*. Algo que também foi descrito para elasmobrânquios (MEYER; SEEGER, 2012). A característica mais comum das células da camada superficial em tubarões e arraias é a atividade exocitótica, elas atuam transportando o conteúdo de vesículas mucosas dispostas abaixo das células apicais para a superfície epidérmica (MEYER; SEEGER, 2012).

Pode ser que as células eosinofílicas sejam análogas às células saciformes, que apresentam núcleo localizado na base e um citoplasma granular que se cora facilmente com corantes ácidos (ELLIOTT, 2011a). As células saciformes foram relatadas em peixes cartilagenosos, como arraias e quimeras, e em peixes ósseos, como os polipterídeos (ELLIOTT, 2000). As funções das secreções dessas células são desconhecidas, geralmente incluem diversos tipos de proteínas e várias enzimas, serotonina, colesterol e outros lipídeos descritos para peixes ósseos (ELLIOTT, 2011b). Em algumas espécies de peixes, as células saciformes podem funcionar análogas às glândulas granulares da pele dos anfíbios, produzindo secreções que são tóxicas ou repelentes aos predadores (ELLIOTT, 2011a). Em outros peixes, as células saciformes podem produzir peptídeos reguladores ou feromônios de alarme intraespecífico (ELLIOTT, 2011a).

As células epiteliais apresentaram em seu citoplasma a coexistência de mucopolissacarídeos ácidos e neutros, evidenciados pelos métodos histoquímicos de PAS e Azul de Alcian positivos. As análises nas células de muco revelaram a presença de glicoconjugados e mucopolissacarídeos neutros, positivos ao método histoquímico do

PAS. Foram encontrados grandes reservatórios de proteínas, em decorrência da sua reatividade ao Azul de Bromofenol, que estavam dispersos no ferrão e no dorso das arraias. Contudo, não foi identificada a presença de núcleo, o que sugere que sejam áreas de reserva proteica. No entanto, essas estruturas se mostraram análogas às células em forma de frasco encontradas no ferrão das arraias *P. falkeri* e *P. orbignyi* na pesquisa de Pedroso *et al.* (2007).

Alguns estudos com elasmobrânquios identificaram compostos bioativos, agentes antipatogênicos e toxinas no tegumento desses animais. Esses fatores específicos podem estar envolvidos com a regulação das células epidérmicas, como, por exemplo, na produção de substâncias que auxiliam na cicatrização de ferimentos na epiderme (AL-HASSAN *et al.*, 1991; RALPHS; BENJAMIN, 1992; IGER *et al.*, 1994; CHIVERS *et al.*, 2007; PÄKK, 2012).

Foi observado, neste estudo, aumento de células mucosas no tegumento do dorso, nas regiões da base da cauda e cefálica, tornando-as mais espessas do que em outras regiões. Provavelmente, maior quantidade de muco é produzido no centro do dorso do animal e se espalha pelo corpo, ajudando no processo de regulação e proteção. A produção de muco, da maioria dos elasmobrânquios, está relacionada a distúrbios ambientais. O simples fato de manipular uma arraia propicia aumento no número de células de muco. Em termos gerais, essas células apresentam respostas ambientais muito rápidas ao estímulo externo, e tudo pode variar de acordo com a qualidade da água, radiação solar, sexo, entre outros fatores (ELLIOTT, 2011b).

As secreções das mais variadas células presentes no tecido epitelial dos peixes formam uma camada chamada de cutícula na superfície da pele, onde estão misturadas e modificadas (ELLIOTT, 2011b). Os potamotrygonídeos são animais bentônicos e quase sempre vivem enterrados sob a areia (GARRONE-NETO; UIEDA, 2012), o que propicia o acúmulo de sedimentos orgânicos em decomposição. Portanto, a pele da arraia secreta substâncias que participam da regulação osmótica e iônica, bem como da proteção contra agentes patogênicos externos, auxiliando também na locomoção e na reprodução dos animais (SHEPHARD, 1994; ZHAO; FINDLY; DICKERSON, 2008).

O estudo histoquímico do presente trabalho evidenciou que todas as células da camada intermediária e superficial, presentes no tecido epitelial do dorso da *P. rex*, participam na produção da cutícula, confirmada pela coexistência de mucinas ácidas e neutras, bem como, de proteínas totais e dissulfetos nas células epidérmicas,

mucopolissacarídeos e glicoconjugados nas células de muco, além de grandes reservatórios de proteína dispersos pelo tegumento.

A cutícula produzida pelas células do tecido de revestimento das arraias apresenta grande diversidade molecular como aminoácidos, carboidratos, glicopeptídeos, glicolipídeos, entre outros (KLESIUS *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012). A descoberta da lectina pentraxina no muco epidérmico da arraia marinha *Okamejei kenojei* (TSUTSUI *et al.*, 2009) demonstra o papel da epiderme na defesa básica da pele contra doenças patogênicas ocasionadas pela invasão de bactérias. Além disso, novos peptídeos como Orpotrin e Porfflan foram descobertos no muco da arraia de água doce *Potamotrygon gr. orbignyi* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006, 2009), além de uma nova proteína antimicrobiana presente no muco da arraia *Potamotrygon cf. henlei* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012), espécie descrita como *P. rex* por Carvalho (2017). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação veiculados à produção, à secreção e à dispersão dessas substâncias, bem como sua função fisiológica para o animal. No entanto, sabe-se que tanto o muco presente no dorso quanto no ferrão dessa espécie apresenta atividade tóxica (SANTOS *et al.*, 2011) e que o soro produzido do muco de *Paratrygon aireba* pode neutralizar os principais sintomas do envenenamento por arraias (THOMAZI *et al.*, 2020).

A produção da cutícula faz parte da defesa desses animais contra agentes externos, visto seu *habitat* e comportamento bentônico. As células epidérmicas do dorso das arraias produzem moléculas que participam do processo de defesa e regulação no seu corpo, mas algumas podem ser iguais ou similares àquelas produzidas no ferrão.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o ambiente força os indivíduos a se diversificarem, a se adaptarem. As arraias são um exemplo de adaptação e tolerância a ambientes dulcícolas. Na história evolutiva das espécies, grandes catástrofes ambientais ocorreram, culminando em eventos de extinção em massa, em cada evento, espécies inteiras desapareceram e outras surgiram. O planeta passou por cinco eventos de extinção em massa, todos eles seguidos de catástrofes ambientais. Hoje vivemos o sexto evento de extinção em massa, o Holoceno. No Holoceno, o homem passou a ter um papel central na extinção de espécies, o que torna trabalhos como este de exígua importância, pois o entendimento da biologia, da fisiologia e dos mecanismos envolvidos na adaptação dos diversos organismos pode facilitar na tomada de decisões em relação à conservação e a medidas mitigatórias para regiões impactadas ou não.

O presente estudo também demonstrou que o tecido epitelial de revestimento do dorso da arraia *P. rex*. é mais heterogêneo quando comparado com o ferrão. O ferrão, inserido na porção mediana da cauda do animal é constituído por um tecido rígido, retroserrilhado, com potencial para romper tecidos mecanicamente. O revestimento do ferrão é organizado em camadas de células epiteliais, especializadas na produção de proteínas/toxinas, principalmente aquelas localizadas na camada intermediária. O dorso, por sua vez, é constituído por um conjunto mais diversificado de células, e sua espessura varia em relação à quantidade de células de muco. As células do tegumento do dorso das arraias participam na produção de diversas substâncias que compõem a cutícula, seja de origem proteica ou mucopolissacarídeos, o que pode contribuir para a regulação das atividades fisiológicas do animal, como também para o efeito tóxico desencadeado no acidente, o que precisa de mais estudo para sua compreensão.

REFERÊNCIAS

- ABATI, P. A. M.; TORREZ, P. P. Q.; FRANÇA, F. O. S.; TOZZI, F. L.; GUERREIRO, F. M. B.; SANTOS, S. A. T.; OLIVEIRA, S. M. S.; HADDAD JR., V. Injuries caused by freshwater stingrays in the Tapajós River Basin: a clinical and sociodemographic study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50(3): 374-378, 2017.
- ABELL, R.; THIEME, M. L.; REVENGA, C.; BRYER, M.; KOTTELAT, M.; BOGUTSKAYA, N.; COAD, B.; MANDRAK, N.; BALDERAS, S. C.; BUSSING, W.; STIASSNY, W. L. J.; SKELTON, P.; ALLEN, G. R.; UNMACK, P.; NASEKA, A.; SINDORF, R. N. G.; ROBERTSON, N. J.; ARMIJO, E.; HIGGINS, J. V.; HEIBEL, T. J.; WIKRAMANAYAKE, E.; OLSON, D.; LÓPEZ, H. L.; REIS, R. E.; LUNDBERG, J. G.; PÉREZ, M. H. S.; PETRY, P. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. **BioScience**, 58: 403-414, 2008.
- AGUIAR, A. A.; VALENTIN, J. L. Biologia e ecologia alimentar de elasmobrânquios (Chondrichthyes: Elasmobranchii): uma revisão dos métodos e do estado da arte no **Brasil. Oecol. Auist.**, 14(2): 464-489, 2010.
- AL-HASSAN, J. M.; THOMSON, M.; BRENT, S.; CRIDDLE, R. S. Protein composition of the threat induced epidermal secretion from the arabian gulf catfish, *Arius thalassinus* (ruppell). **Comp. Biochem. Physiol.**, 88B: 813-822, 1987.
- ALMEIDA, M. P.; BARTHEM, R. B.; VIANA, A. S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Diversidade de raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no estuário amazônico. **Arquivos de Ciências do Mar**, 41(2): 82-89, 2008.
- ARAÚJO, M. L. G. **Biologia reprodutiva e pesca de Potamotrygon sp. (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas**. 1998. 164 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 1998.
- BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; MALTA, M. B.; SOARES, S. L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J. L.; SANTORO, M. L.; HADDAD JR., V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**, 50(5): 676-87, 2007.
- BARTORELLI, A. O estágio moderno e a edificação do relevo. *In*: HASUI, Y.; CARNEIRO, C. D. R.; ALMEIDA, F. F. M. DE; BARTORELLI, A. (org.). **Contexto geológico e evolução da rede hidrográfica do Brasil**. São Paulo: Beca-BALL edições, 2012. p. 574-610. v. 1.
- BERTACO, V. A.; CARVALHO, F. R. New species of *Hasemania* (Characiformes: Characidae) from Central Brazil, with comments on the endemism of upper rio Tocantins basin, Goiás State. **Neotropical Ichthyology**, 8: 27-32, 2010.

- BAUER, H. Mikroskopisch-chemischer Natwer's von Glykogen und einigen anderen Polysacchariden. **Zeitschrift für mikroskopische-anatomische Forschung**, 33:143, 1933.
- BERTACO, V. A.; JEREP, F. C.; CARVALHO, F. R. A new characid fish, *Moenkhausia aurantia* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), from the upper rio Tocantins basin in Central Brazil. **Zootaxa**, 2934: 29-38, 2011.
- BIGELOW, H. B.; SCHROEDER, W. C. Fishes of the northwestern Atlantic. Part II. Sawfishes, guitarfishes, dkates, rays and chimaeroids. **Memoirs of the Sears Foundation for Marine Research**, 2, 1953.
- BLACKSTOCK, N.; PICKERING, A. D. Acidophilic granular cells in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* L. **Cell Tissue Res.**, 210: 359-369, 1980.
- BRENCHLEY, P. J.; MARSHALL, J. D.; CARDEN, G. A. F.; ROBERTSON, D. B. R.; LONG, D. G. F.; MEIDLA, T.; HINTS, L.; ANDERSON, T. F. Bathymetric and isotopic evidence for a short-lived Late Ordovician glaciation in a greenhouse period. **Geology**, 22: 295-98, 1994.
- BRITO-NEVES, B. B. América do Sul: quatro fusões, quatro fissões e o processo acrecionário andino. **Revista Brasileira de Geociências**, 29: 379-392, 1999.
- BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic, 1971. v. 2.
- CARAS, R. The Venomous Fish. *In*: PRENTICE-HALL, I. (ed.). **Venomous animals of the world**. USA: PrenticeHal, 1974. p. 103-116.
- CARVALHO, F. R.; BERTACO, V. A.; JEREP, F. C. *Hemigrammus tocantinsi*: a new species from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, 8: 247-254, 2010.
- CARVALHO, M. R. *Potamotrygon rex*, a new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the middle and upper rio Tocantins, Brazil, closely allied to *Potamotrygon henlei* (Castelnau, 1855). **Zootaxa**, 4150(5): 537-565, 2016.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxa**, 2776(1): 13-48, 2011.
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family Potamotrygonidae. *In*: REIS, R. E.; FERARIS JR., C. J.; KULLANDER, S. O. (ed.). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 22-29.

- CASTEX, M. N.; LOZA, F. Etiologia de la Enfermedad Paratrygonica: estudo anatomico, histologico y funcional del aparato agresor de la raya fluvial americana (gen.). **Rev. Assoc. Med. Argent.**, 78: 314-324, 1964.
- CASTRO, T. A.; AIRESI, R. S.; TURIBIO, T. O.; NEVES, A. C. D.; GEMELLI, T. F.; ARAUJO, R. O. Pacientes acidentados por raias registrados no SINAN de Porto Nacional - TO entre 2009 e 2013. **Coletânea Científica Presidente Antônio Carlos: utilizando o DATASUS como ferramenta de investigação**, 2(1): 173-180, 2016.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCÓN, G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. **Shark News**, 14: 47-51, 2002.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAM, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29: 1279-1303, 1991.
- CHIVERS, D. P.; WISENDEN, B. D.; HINDMAN, C. J.; MICHALAK, T. A.; KUSCH, R. C.; KAMINSKYJ, S. G. W.; JACK, K. L.; FERRARI, M. C. O.; POLLOCK, R. J.; HALBGEWACHS, C. F.; POLLOCK, M. S.; ALEMADI, S.; JAMES, C. T.; SAVALOJA, R. K.; GOATER, C. P.; CORWIN, A.; MIRZA, R. S.; KIESECKER, J. M.; BROWN, G. E.; ADRIAN, J. C.; KRONE, P. H.; BLAUSTEIN, A. R.; MATHIS, A. Epidermal “alarm substance” cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. **Proc. Biol. Sci.**, 274: 2611-2619, 2007.
- CHRISTIE, R. M. **Colour chemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001.
- CLARO-GARCÍA, A.; SHIBATTA, O. A. The fish fauna of streams from the upper rio Tocantins basin, Goiás State, Brazil. **Check List**, 9: 28-33, 2015.
- COMPAGNO, L. J. V. Interrelationships of living elasmobranchs. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 53(Supplement 1): 15-61. 1973.
- COMPAGNO, L. J. V. Shark exploitation and conservation. *In*: PRATT-JR, H. L.; GRUBER, S. H.; TANIUCHI, T. (ed.). **Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries**. Seattle, WA (USA): NOAA, National Marine Fisheries Service, 1990. p. 391-414.
- COMPAGNO, L. J. V. **Tubarões do mundo: um catálogo anotado e ilustrado das espécies de tubarões conhecidas até o momento**. Roma: Organização para a Alimentação e Agricultura, 2002. v. 2.
- COMPAGNO, L. J. V.; COOK, S. F. The exploration and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *In*: OETINGER, M. I.; ZORZI, G. D. (ed.). **The Biology of Freshwater Elasmobranch**. **Journal of Aquaculture & Aquatic Science**, 7: 62-90, 1995.
- CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, C.; PIMENTA, D. C.; LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. **Peptides**, New York, 27: 3039-3046, 2006.

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

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

DALY, J. W.; HIGHET, R. J.; MYERS, C. W. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). **Toxicon**, 22(6): 905-919, 1984.

DEGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. **Toxicon**, 55(6): 1188-94, 2010.

DEYNAT, P. Potamotrygon marinae n. sp., une nouvelle espèce de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). **Comptes Rendus Biologies**, 329: 483-493, 2006.

DOUADY, C. J.; DOSAY, M.; SHIVJI, M. S.; STANHOPE, M. J. Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derivaded sharks. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26: 215-221, 2003.

DUNCAN, W. Ecofisiologia das raia de água doce (Potamotrygonidae): mecanismos de interação organismo-ambiente. *In*: LASSO, C. A.; ROSA, R.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, R. C. (ed.). **Rayas de agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica**. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2016. p. 45-64.

ELLIOTT, D. G. Functional morphology of the integumentary system in fishes. *In*: FARRELL, A. P. (ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Academic Press, 2011a. p. 476-488. v.1.

ELLIOTT, D. G. Integumentary system. Microscopic functional anatomy. *In*: OSTRANDER, G. (ed.). **The Laboratory Fish**. Cambridge: Academic Press, 2000. p. 271-306.

ELLIOTT, D. G. The many functions of fish integument. *In*: FARRELL, A. P. (ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Academic Press, 2011b. p. 471-475. v.1.

FONTENELLE, J. P.; CARVALHO, M. R. Systematic revision of the Potamotrygon scobina Garman, 1913 species-complex (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), with the description of three new freshwater stingray species from

Brazil and comments on their distribution and biogeography. **Zootaxa**, 4310(1): 1-63, 2017.

FONTENELLE, J. P.; MARQUES, F. P. L.; KOLMANN, M. A.; LOVEJOY, N. R. Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. **Journal of Biogeography**, 1-14, 2021.

FRANÇA, R. de M. Proposta metodológica de identificação do alto, médio e baixo curso da Bacia Hidrográfica do Rio Cocó, Ceará, Brasil. **Revista de Estudos Geoeeducacionais**, 10(21): 1-11, 2019.

FERREIRA, M. L.; MOURA-da-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine Bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, 30: 1603-1608, 1992.

FROESE, R. & PAULY, D. (eds.) 2021. FishBase, World Wide Web electronic publication. Disponível em <http://www.fishbase.org/>, version (06/2021). Consulta em dezembro de 2021.

GARAVELLO, J. C.; GARAVELLO, J. P.; OLIVEIRA, A. K. Ichthyofauna, fish supply and fishermen activities on the mid-Tocantins River, Maranhão State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 70(3): 575-585, 2010.

GARRONE-NETO, D. **História natural, diversidade e distribuição de raias na região do alto rio Paraná, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, M. R. (ed.). **XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica**. Parte I: Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología uso y conservación. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), 2013.

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

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

GARRONE NETO, D.; UIEDA, V. S. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 10(1): 81-88, 2012.

GOMES, H. L. **Sp-CTx Tóxina hemolítica e cardiotoxica da peçonha do peixe –** escorpião *Scorpaena plumiere*. 2013. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências-Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. G. **The Smithsonian Atlas of the Amazon**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2003.

GUTIERREZ, J.; BENÍTEZ GUERRA, I.; BENÍTEZ GUERRA, G. Envenenamiento por rayas de agua dulce. **Rev. Fac. Med.**, Caracas, 27(2): 131-134, 2004.

HACKMANN, W. D. Sonar Research and Naval Warfare 1914-1954: a Case Study of a Twentieth-Century Establishment Science. **Historical Studies in the Physical and Biological Sciences**, 16(1): 83-110, 1986.

HADDAD JR., V.; GARRONE-NETO, D.; LASSO, C. A.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; BARRRIGA, R.; BARBARINO, A. Envenenamientos causados por rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) en Brasil, con notas sobre los países vecinos (Colombia, Venezuela y Ecuador): implicaciones en la salud pública. *In*: LASSO, C. A.; ROSA, R.; MORALES-BETANCOURT, M. A. (ed.). **Rayas de agua Dulce (Potamotrygonidae) de Sudamerica**. Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación. Seérie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia Bogotá: Inst Invest Recur Bio Alexander von Humboldt, 2014. p. 39-47.

HADDAD JR., V.; GARRONE NETO, D.; PAULA NETO, J. B.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, 43(3): 287-294, 2004.

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world**. Washington, DC: Government Printing Office, 1967. v. II.

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

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world: vertebrates**. Washington, DC: US Government Print, 1970. v. 3.

HALSTEAD, B. W.; BUNKER, N. C. Stingray attacks and their treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 2(1): 115-128, 1953.

HARPER, D. A. T.; HAMMARLUND, E. U.; RASMUSSEN, C. M. End Ordovician extinctions: A coincidence of causes. **Gondwana Research**, 25: 1294-1307, 2014.

HARPER, D. A. T.; RONG, J.; SHEEHAN, P. M. Ordovician diversity patterns in early rhynchonelliform (protorthide, orthide and strophomenide) brachiopods. **Acta Univ. Carol. Geol.**, 43: 325-327, 1999.

HARPER, D. A. T.; RONG, J; ZHAN, R. Late Ordovician development of deep-water brachiopod faunas. **Acta Univ. Carol. Geol.**, 43: 351-353, 1999.

- HAY, J. B.; HODGINS, M. B.; ROBERTS, R. J. Androgen metabolism in skin and skeletal muscle of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and accessory organs of the spur dogfish (*Squalus acanthias*). **General and Comparative Endocrinology**, 29: 402-413, 1976.
- HENRIKSON, R. C.; MATOLTSY, A. G. The fine structure of teleost epidermis. I. Introduction and filament-containing cells. **J. Ultrastruct. Res.**, 21: 194-212, 1968.
- HOLDEN, M.; MEADOWS, P. The structure of the spine of the spur dogfish (*Squalus Acanthias* L.) and its use for age determination. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 42(2): 179-197, 1962.
- HOORN, C. Mangrove Forests and Marine Incursions in Neogene Amazonia (Lower Apaporis River, Colombia). **Palaios**, 21: 197-209, 2006.
- HOORN, C.; BERNARDES-DE-OLIVEIRA, M. E. C.; DINO, R.; GARCIA, M. J.; ANTONIOLI, L.; CASADO, F. da C.; HOOGHIMSTRA, H. Neogene climate evolution in Amazonia and the Brazilian Northeast. *In*: CARVALHO, I. S.; GARCIA, M. J.; LANA, C. C.; STROHSCHOEN JR, O. (ed.). **Paleontologia: cenários de vida – paleoclimas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010a. p. 277-310.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; HOVIKOSKI, J.; GUERRERO, J. Amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). *In*: HOORN, C.; WESSELINGH, F. P. (ed.). **Amazonia, Landscape and Species Evolution: Look into the Past**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010b. p. 123-143.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, 33: 1414-1436, 2006.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**, 14: 69-76, 1985.
- IBGE. AMÉRICA DO SUL. **Atlas mundial**. São Paulo: Cia. Melhoramentos de São Paulo, 1999.
- IGER, Y.; ABRAHAM, M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Response of club cells in the skin of the carp *Cyprinus carpio* to exogenous stressors. **Cell Tissue Res.**, 277: 485-491, 1994.
- JAWAD, L. A. **Dangerous Fishes of the Eastern and Southern Arabian Peninsula**. New York: International Publishing, 2018.
- JONES, R. V. Asdic to sonar. **Nature**, 314(6007): 201-201, 1985.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur. Journal of Dermatology**, 12(4): 390-401, 2002.
- KARNOWSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, 27A: 137-138, 1965.

KEMP, N. E. Banding pattern and fibrillogenesis of ceratotrichia in shark fins. **Journal Morphol**, 154(2): 187-203, 1977.

KIERSZENBAUM, A. L.; MOSBY, T. **Histology and cell biology**: an introduction to pathology. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LANGANI, F.; BUCKUP, P. A.; MALABARBA, L. R.; PY-DANIEL, L. H. R.; LUCENA, C. A. S.; ROSA, R. S.; ZUANON, J. A. S.; LUCENA, Z. M. S.; DE BRITTO, M. R.; OYAKAWA, O. T.; GOMES-FILHO, G. Peixes de água doce. *In*: ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. P. (org.). **Estado da arte e perspectivas para a zootologia no Brasil**. Curitiba: UFPR, 2009. p. 211-230.

LAST, P. R.; WHITE, W. T.; CARVALHO, M. R.; SÉRET, B.; STEHMANN, M. F. W.; NAYLOR, G. J. P. **Rays of the world**. Melbourne: Csiro Publishing, 2016.

LAVINA, E. L. Alfred Wegener e a revolução copernicana da Geologia. **Revista Brasileira de Geociências**, 40: 286-299, 2010.

LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G.; SIRE, J. Y. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). **Int. J. Dev. Biol.**, 48: 217-231, 2004.

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

LONG, J. A. **The Rise of Fishes**: 500 million years of evolution. 2. ed. Baltimore: John Hopkins University Press. 2011.

LOVEJOY, N. R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of Neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 117: 207-257, 1996.

LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, 21(2): 5-13, 2006.

LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Marine incursion into South America. **Nature**, 396: 421-422, 1998.

- LUCIFORA, L. O.; GARCÍA, V. B.; WORM, B. Global diversity hotspots and conservation priorities for sharks. **Plos One, Switzerland**, 6(5): 1-4, 2011.
- LUCINDA, P. H. F.; AGOSTINHO, C. S.; OLIVEIRA, R. F. D. Fish, Lajeado reservoir, rio Tocantins drainage, state of Tocantins, Brazil. **Check List**, 3: 70-83, 2007.
- MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A. A.; MARQUES, E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LOPES FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: Potamotrygon cf. scobina and Potamotrygon gr. orbignyi. **Toxicon**, 47: 575-583, 2006.
- MANTESSO-NETO, V.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D. R.; BRITO NEVES, B. B. de. **Geologia do continente sul-americano: evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida**. [S.l: s.n.], 2004.
- MCEACHRAN, J. D.; ASCHLIMAN, N. Phylogeny of Batoidea. *In*: CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (ed.). **Biology of sharks and their relatives**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press. p. 79-113. 2004.
- MCKNIGHT, T. **Geographica: the complete illustrated atlas of the world**. New York: Barnes and Noble Books, 2004.
- MCMANUS, J. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. **Nature**, 158-202, 1946.
- MÉRONA, S. G. M.; ALMEIDA, R. G. Short term effects of Tucuruí Dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. **Environmental Biology of Fishes**, 60: 375-392, 2001.
- MESCHER, A. L.; HILL, M. **Junquiera's basic histology: text and atlas**. 13. ed. Bloomington, Indiana, USA: Mc Graw Hill Education, 2013.
- MEYER, W.; SEEGER, U. Basics of skin structure and function in elasmobranchs: a review. **Journal of Fish Biology**, 2012.
- MEYER, W.; SEEGER, U.; SCHNAPPER, A.; NEUHAUS, H.; HIMSTEDT, W.; TOEPFER-PETERSEN, E. Presence of free sugars on the epidermal surface of aquatic vertebrates and their possible involvement in antimicrobial defense. **Aquatic Biology**, 1: 167-175, 2007.
- MEYER, W.; SEEGER, U.; STELZER, R. Sulphur, thiols and disulphides in the fish epidermis, with remarks on keratinisation. **Journal of Fish Biology**, 71: 1135-1144, 2007.
- MONTEIRO, W. M.; OLIVEIRA, S. S.; SACHETT, J. D. A. G.; SILVA, I. M.; FERREIRA, L. C. L.; LACERDA, M. V. G. Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(3): 389-392, 2016.

NAYLOR, G. J. P.; CAIRA, J. N.; JENSEN, K.; ROSANA, K. A. M.; STRAUBE, N.; LAKNER, C. A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, 367: 1-262, 2012.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4. ed. New Jersey: John Wiley, 2006.

OCAMPO, R. R.; HALSTEAD, B. W.; MODGLIN, F. R. The microscopic anatomy of the caudal appendage of the spotted eagleray, *Aëtobatus narinari* (Euphrasen), with special reference to the venom apparatus. **The Anatomical Record**, 115(1): 87-99, 1953.

OLIVEIRA, A. T.; ARAÚJO, M. L. G.; PANTOJA-LIMA, J.; ARIDE, P. H. R.; TAVARES DIAS, M.; BRINN, R. P.; MARCON, J. L. *Cyrilia* sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* (cururu stingray) in different hydrological phases of the Rio Negro. **Brazilian Journal of Biology**, 77(2): 413-416, 2017.

OPARIN, A. I. **Origin of life**. Nova York: Dover Publications Inc, 1938.

ORESQUES, N. **Plate tectonics: an insider's history of the modern theory of the earth**. California, San Diego, USA: Westview Press, 2003.

PÄKK, P. **Alterations of epidermal cells functional activity in fish due to infection**. 2012. 108 f. Tese (Doutorado) – Estonian University of Life Sciences, Tartu, 2012.

PASSOS, A. P.; PIMENTA, M. A.; THOMAZI, G. O. C.; AIRES, R. S.; TURIBIO, T. O. Perfil epidemiológico dos pacientes vítimas de acidentes por raias atendidos no hospital público de Porto Nacional/TO, 2012 a 2015. **Coletânea Científica Presidente Antônio Carlos: Informação Científica Baseada em Evidências**, 1(1): 105-114, 2016.

PAULY, D. Fish population dynamics in tropical waters: a manual for use with programmable calculators. **ICLARM Stud. Rev.**, (8): 325, 1984.

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

PESSATTI, M. L.; FONTANA, J. D.; FURTADO, M. F. D.; GUIMARÃES, M. F.; ZANETTE, L. R. S.; COSTA, W. T.; BARON, M. Screening of Bothrops snake venoms for L amino acid oxidase activity. **App. Biochem. Biotech.**, 51/52: 197-210, 1995.

PFEIFFER, W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. **Copeia**, 4: 653-665, 1977.

- PIOLA, J. C.; PRADA, D. B.; EVANGELISTA, M.; LLOVERAS, S.; ORDUNA, T. Epidemiología de los Accidentes por Rayas. Sertox. Rosario. 1990-1999. **Jorn. Interdisc. de Toxicol. y I Jorn. Rioplat. de Toxicol.**, Rosario, Argentina, 2001.
- PORTA, A. **Ricerche anatomiche sull'apparecchio velenifero di alcuni pesci.** Fischer, 1905.
- POUGH, F.; HARVEY, A. **Vida dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu, 1993.
- POUGH, H.; JANIS, C. M. & HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, 744p.
- PRATT, H. L.; CASEY, J. G. Shark reproductive strategies as a limiting factor in directed fisheries, with a review of Holden's method of estimating growth parameters. **NOAA Tech. Rep. NMFS**, 90: 97-109, 1990.
- RAKERS, S.; GEBERT, M.; UPPALAPATI, S.; MEYER, W.; MADERSON, P.; SELL, A.; KRUSE, C.; PAUS, R. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. **Experimental Dermatology**, 19: 313-324, 2010.
- RALPHS, J.; BENJAMIN, M. Chondroitin and keratan sulphate in the epidermal club cells of teleosts. **J. Fish Biol.**, 40: 473-475, 1992.
- RAVI, V.; MURUGESAN, P.; KUMAR, T. T. A.; KUMARESAN, S. S. Spine structure of scaly stingray, *Himantura imbricata* (Bloch & Schneider, 1801). **J Mar Biol Assoc India**, 5(2): 228-231, 2008.
- REBOITA, M. S.; KRUSCHE, N.; AMBRIZZI, T.; ROCHA, R. P. Entendendo o tempo e o clima na América do Sul. **Terræ Didática**, 8(1): 34-50, 2012.
- RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotrop. Ichthyol.**, 4: 225-246, 2006.
- RIBEIRO, A. C.; LIMA, F. C. T. de; MENEZES, N. A. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. *In*: CARVALHO, C.; ALMEIDA, E. (org.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos.** São Paulo: Roca, 2011. p. 261-276.
- RINCON FILHO, G. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: potamotrygonidae) no rio Paraná-Tocantins.** 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.
- ROSA, R. S. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). 1985. 523 f. PhD thesis (Doctor of Philosophy in Marine Science) – The College of William and Mary, Williamsburg, 1985.

- ROSA, R. S. Paratrygon aiereba (Müller & Henle, 1841): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 7: 425-437, 1990.
- ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R. D. Família Potamotrygonidae. *In*: BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. (ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 17-18.
- ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R.; WANDERLEY, C. A. Potamotrygon boesemani (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. **Neotropical Ichthyology**, 6: 1-8, 2008.
- ROSA, R. S.; CASTELLO, H. P.; THORSON, T. B. Plesiotrygon iwamae, a New Genus and Species of Neotropical Freshwater Stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Copeia**, 2: 447-458, 1987.
- ROSA, R. S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C. C. D. Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays. *In*: CARRIER, J. F.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. (ed.). **Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation**. United States: CRC Press, 2010. p. 241-286.
- ROSA, R. S.; LASSO, C. A. Biogeografía de las rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de América del Sur. *En*: Lasso, C. A., R. S. Rosa, P. Sánchez-Duarte, M. A. Morales-Betancourt, E. Agudelo Córdoba (Eds.). **Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Sudamérica. Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guyana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación**. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. Pp. 39-47. 2013.
- ROSS, J. L. S. O relevo brasileiro no contexto da América do Sul. **R. Bras. Geogr.**, Rio de Janeiro, 61(1): 21-58, jan./jun. 2016.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; WILKINS, L. W. **Histology: a text and atlas**. 7. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2016.
- SACEK, V. Drainage reversal of the Amazon River due to the coupling of surface and lithospheric processes. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, 401: 301-312, 2014.
- SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G. Peixes da Bacia Amazônica. *In*: LOWEMCCONNEL, R. H. (ed.). **Estudos ecológicos de peixes**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 34-373.
- SANTOS, G. M.; JURAS, A. A.; MÉRONA, B.; JÉGU, M. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí**. Brasília: Eletronorte, 2004.
- SANTOS, J. C. dos; GRUND, L. Z.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; SOARES, A. B.; QUESNIAUX, V. F.; RYFFEL, B.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Stingray venom activates IL-33 producing cardiomyocytes, but not mast cell, to promote acute neutrophil-mediated injury. **Scientific Reports**, 7: 1-15, 2017.

- SANTOS, J. M. **Avaliação do grau de toxicidade da peçonha em relação ao tamanho e ao sexo da arraia de água doce *Potamotrygon cf. henlei* caracterizado pelo conhecimento popular e científico**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2012.
- SANTOS, J. M.; CARDOSO DOS SANTOS, J.; MARQUES, E. E.; ARAÚJO, G. C. DE; SEIBERT, C. S.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Stingray (*Potamotrygon rex*) maturity is associated with inflammatory capacity of the venom. **Toxicon**, 163: 74-83, 2019.
- SANTOS, J. M.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C. S.; MARQUES, E. E.; ISMAEL JR., P.; SOARES, A. B.; LIMA, C.; FERREIRA, M. L. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. **International Immunopharmacology (Print)**, 11: 1368-1377, 2011.
- SANTOS, J. M.; RIBEIRO NETO, D. G.; MARQUES, E. E.; SEIBERT, C. S. Adaptações fisiológicas de arraias *Potamotrygon Rex* (*Potamotrygonidae*) frente às variações sazonais no ambiente. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 11: 409-423, 2020.
- SANTOS, J. M.; SEIBERT, C. S.; ARAÚJO, G. C.; BERTOLIN, A. O.; MARQUES, E. E. Habitat de arraias em rios e o perigo de acidentes valorado pelo acidentado na Bacia Tocantins Araguaia. **Scientia Amazonia**, 3(2): 24-38, 2014.
- SANYO TECHNO MARINE. **Draft final report for the fishery resources study of the Amazon and Tocantins River mouth areas in the Federative Republic of Brazil**. Tokyo, 1998.
- SÁ-OLIVEIRA, J. C.; COSTA, E. A.; PENA, F. P. S. Acidentes por raias (*Potamotrygonidae*) em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental - APA do rio Curiaú, Macapá - AP. **Biota Amazônia**, 1(2): 74-78, 2011.
- SAPORITO, R. A.; DONNELLY, M. A.; NORTON, R. A.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 104: 8885-8890, 2007.
- SCHENONI, L. **The Brazilian Rise and the Elusive South American Balance**. Rochester, NY: Social Science Research Network, 2015.
- SCLATER, J. G.; ANDERSON, R. N.; BELL, M. L. Elevation of ridges and evolution of the central eastern Pacific. **J. Geophys. Res.**, 76(32): 7888-7915, 1971.
- SEEGERS, U.; MEYER, W. Grundlegendes zur Struktur und Funktion der Haut der Fische aus vergleichender Sicht. **Kleintierpraxis**, 54: 73-87, 2009.
- SHEEHAN, P. M. The Late Ordovician mass extinction. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, 29(1): 331-364, 2001.

- SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Rev Fish Biol Fisheries**, 4: 401-429, 1994.
- SHORE, J. **Colorants and auxiliaries**: organic chemistry and application properties. 2. ed. Manchester: Society of Dyers and Colourists, 2002. v. 1.
- SILVA, J. P. C. B.; LOBODA, T. S. Potamotrygon marquesi, a new species of neotropical freshwater stingray (Potamotrygonidae) from the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Fish Biology**, 95(2), 2019.
- SMITH, D. S.; CAYER, M. L.; RUSSELL, F. E. Membrane-limited microtubular aggregates in the venom secreting cells of a stingray. **Toxicon**, 12(3): 331-335, 1974.
- SMITH, D. S.; CAYER, M. L.; RUSSELL, F. E. Tannic acid staining of “microtubules” in venom-secreting cells of a stingray. **Toxicon**, 19(6): 737-742, 1981.
- STANLEY, S. M. **Earth system history**. New York: W. H. Freeman, 1999.
- THOMASI, G. O. C.; COSTA, A.; RODRIGUES, J. P.; PREZOTTO NETO, J. P.; TURIBIO, T. de O.; ROCHA, A. M.; SEIBERT, C. S.; ANDRADE JR., H. F. de. Paratrygon aiereba irradiated anti-mucus serum reduce edematogenic activity induced in experimental model. **Toxicon**, 178: 13-19, 2020.
- THOMPSON, G. R.; TURK, J. **Modern Physical Geology**. United Kingdom: Saunders College Publishing, 1991.
- THOMPSON, S. W. **Selected histochemical and histopathological methods**. Springfield, IL: Charse C. Thomas, 1966.
- THORSON, T. B.; COWAN, C. M.; WATSON, D. E. Potamotrygon spp.: elasmobranchs with low urea content. **Science**, 158: 375-377, 1967.
- THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Periodic shedding and replacement of venomous caudal spines, with special reference to South American freshwater stingrays, Potamotrygon spp. **Environmental Biology of Fishes**, 23(4): 299-314, 1988.
- THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Reproduction and development of the South America freshwater stingrays, Potamotrygon circularis and Potamotrygon motoro. **Environmental Biology of Fishes**, 9(1): 3-24, 1983.
- TSUTSUI, S.; YAMAGUCHI, M.; HIRASAWA, A.; NAKAMURA, O.; WATANABE, T. Common skate (Raja kenoi) secretes pentraxin into the cutaneous secretion: the first skin mucus lectin in cartilaginous fish. **Journal of Biochemistry**, 146: 295-306, 2009.
- VALENTIM, F. C. S. **Citotaxonomia de arraias de água doce (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) da Bacia Amazônica Central**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2011.

VELEZ-ZUAZO, X.; AGNARSSON, I. Shark tales: a molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha; Chondrichthyes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 58: 207-2017, 2011.

WAKO, A.; DERRICKSON, S. R.; SAMUELSON, A.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Melyrid beetles (Choresine): a putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 101: 15857-15860, 2004.

WEGENER, A. Die Entstehung der Kontinente. **International Journal of Earth Sciences**, 3(4), 1912.

WILSON, J. Evidence from Islands on the Spreading of Ocean Floors. **Nature**, 197: 536-538, 1963.

WINCHELL, C. J.; MARTIN, A. P.; MALLATT, J. Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 31: 214-224, 2004.

WHITEAR, M. The skin of fishes including cyclostomes: Epidermis, dermis. *In*: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G. (ed.). **Biology of the Integument: Vertebrates**. New York: Springer, 1986. p. 8-64. v. 2.

WHITEAR, M.; MOATE, R. Cellular diversity in the epidermis of *Raja clavata* (Chondrichthyes). **Journal of Zoology**, 246(3): 275-285, 1998.

WIRTH, U. Vergleichende Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Hautschichten bei Fischen unter besonderer Berücksichtigung von Hautsekreten. **Doctor of Natural Sciences Thesis**, University of Hannover, 1999.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G.; FASULO, S.; AINIS, L. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. **Advances in Marine Biology**, 40: 255-348. 2001.

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

ANEXO I – AUTORIZAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Araguaína, 01 de Novembro de 2019.

O projeto intitulado “ESTUDO DA INTERAÇÃO ORGANISMO-AMBIENTE das ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO E TOXICIDADE DA PEÇONHA” processo nº 23.101.006.451/2019-36 sob a responsabilidade CARLA SIMONE SEIBERT, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Atenciosamente,

Sandro Estevan Moron

Coordenador da CEUA/UFT