BIANCA DE SOUSA RANGEL

**Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento
materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas
histotróficas**

**Lipids and stable isotopes as indicators of maternal investment
and neonatal nutritional strategies in histotrophic stingrays**

São Paulo

2018

BIANCA DE SOUSA RANGEL

Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas histotróficas

Lipids and stable isotopes as indicators of maternal investment and neonatal nutritional strategies in histotrophic stingrays

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Coorientadora: Dra. Aline Dal'Olio Gomes

São Paulo

2018

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar a estratégia nutricional neonatal das raia *Rhinoptera bonasus* e *Rhinoptera brasiliensis*, analisando suas interações tróficas e dependência do recurso materno durante as fases iniciais da vida. Lipídios, ácidos graxos (FA) e isótopos estáveis (SI) foram analisados em diferentes tecidos, como ferramentas para avaliar as alterações durante o crescimento em raia jovens-de-ano (YOY), divididas em dois grupos, YOY I (≤ 50 cm largura de disco, LD) e YOY II (50-70 cm LD). O registro de YOY em três anos consecutivos (2015, 2016 e 2017) e a permanência dos filhotes durante o ano, confirmam que a região de Bertioga é uma área de berçário para as espécies *R. bonasus* e possivelmente para *R. brasiliensis*. Nossos resultados do perfil de FA teciduais suportam a hipótese de que a estratégia histotrófica lipídica, juntamente com maiores períodos de gestação e o grande tamanho ao nascimento da raia *R. bonasus* confere um maior investimento energético aos filhotes. Filhotes de *R. bonasus* nascem enriquecidos em DHA (ácido docosahexaenoico), ARA (ácido araquidônico) e $\delta^{15}\text{N}$ e demonstram perda gradual do sinal isotópico e de FA materno, assim como uma diminuição do fator de condição, colesterol e β -hidroxibutirato (β -HB) com o crescimento, provavelmente como resultado do uso dos estoques energéticos provisionados pela mãe durante a gestação e redução das taxas de crescimento. O perfil de FA essenciais (EFA) teciduais e plasmático encontrado sugere que os filhotes não apresentaram deficiência destes FA, como é observado em tubarões placentários, indicando grande demanda de EFA durante o início do crescimento. Além disso, YOY II parecem ter melhores habilidades de forrageio, demonstrado pelo aumento de EFA e diminuição de FA saturados (SFA) plasmático, assim como diminuição nas concentrações de β -HB. Comparando-se as duas espécies, foram encontradas diferenças na composição de FA do fígado e músculo, principalmente na somatória de SFA, FA monoinsaturados (MUFA) e FA polinsaturados (PUFA), sugerindo que as espécies apresentam diferentes dietas ou diferentes períodos de nascimento. Estes resultados corroboram com as diferenças encontradas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ entre as duas espécies, revelando que as duas espécies partilham recursos alimentares, uma estratégia que é geralmente adotada pelas espécies que utilizam a mesma área como berçário. Deste modo, a combinação de biomarcadores permitiu analisar os aspectos nutricionais e interações tróficas de YOY em uma área de berçário, demonstrando que estas raia investem significativamente nos jovens e, consequentemente, em melhores condições nutricionais no nascimento. Foi possível assim, compreender como o

maior investimento materno afeta tais aspectos durante o início da história de vida das raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis*.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the neonatal nutritional strategy adopted by species *Rhinoptera bonasus* and *R. brasiliensis*, related to its trophic interactions and maternal resource dependency during the early stages of life. Lipids, fatty acids (FA) and stable isotope (SI) were assessed in different tissues, as tools to evaluate biomarkers changes during growth in young-of-the-year (YOY) rays, divided into two stages, YOY I (≤ 50 cm disc width, DW) and YOY II (50 - 70 cm DW). The registration of YOY in three consecutive years (2015, 2016 and 2017) and the permanence of the YOY during the year, confirms that the region of Bertioga is a nursery area for *R. bonasus* and possibly to *R. brasiliensis*. Our FA profile results support the hypothesis that the lipid histotrophic strategy, along with greater periods of pregnancy and the large size at birth of *R. bonasus* confers a greater energy investment to the pups. *R. bonasus* pups born enriched in DHA (docosahexaenoic acid), ARA (arachidonic acid) and $\delta^{15}\text{N}$, and showed gradual loss of isotopic signal and FA, as well as a decrease in condition factor, cholesterol and β -hydroxybutyrate (β -HB) with the growth, probably as a result of the use of energy stocks provided by the mother during pregnancy and reduction of growth rates. The plasma and tissues essential FA (EFA) profile found suggests that the pups did not show EFA deficiency, as is observed in placental sharks, indicating high demand for EFA during early growth. In addition, data indicate larger animals have improved foraging skills, demonstrated by increased plasma levels of EFA and a decrease of saturated FA (SFA) and plasma β -HB in YOY II rays. Comparing the two species, differences were found in the FA composition of liver and muscle, especially in the SFA, monounsaturated FA (MUFA) and polyunsaturated FA (PUFA), suggesting that the species have different diets or different periods of birth. These results corroborate with differences in the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values between the two species, revealing that the two species partition food resources, a strategy that is usually adopted by the species that use the same area as nursery. Thus, the combination of biomarkers has allowed analyzing the nutritional aspects and trophic interactions of YOY in a nursery area, demonstrating that these rays investing significantly in young and, consequently, in better conditions nutritional facts at birth. It was possible understand how the greater maternal investment affects such aspects during the early life history of *R. bonasus* and *R. brasiliensis*.

1. Introdução

Os elasmobrânquios (tubarões e raias) juntamente com as quimeras, formam a classe monofilética dos Chondrichthyes, que compõe uma das mais antigas e diversificadas radiações existentes de vertebrados (Dulvy *et al.*, 2017). Muitas espécies apresentam uma complexa história de vida, com crescimento lento, maturidade tardia, expectativas de vida relativamente longa, baixa fecundidade e frequência reprodutiva, além de exibirem os mais longos períodos de gestação e alguns dos mais altos níveis de investimento materno entre os vertebrados (Cortés, 2004). Tais aspectos biológicos atrelados à sobrepesca, poluição, a degradação do habitat e alterações climáticas (Chin *et al.*, 2010), torna-os mais sensíveis à mortalidade elevada, com estimados 24% das 1041 espécies sob algum grau de risco de extinção (Frisk *et al.*, 2001; Dulvy *et al.*, 2014).

Ecologicamente, os elasmobrânquios participam da transferência de energia através de interações ecológicas diretas, como predação, e indiretas como competição e modificação do comportamento de níveis tróficos inferiores (Heithaus *et al.*, 2008). A maioria das espécies, sendo elas predadores ou mesopredadores, desempenha destacado papel funcional na dinâmica dos ecossistemas marinhos, estuarinos e dulcícolas (Ferretti *et al.*, 2010; Heithaus *et al.*, 2012). Nesse sentido, reduções populacionais, podem levar a efeitos de cascata trófica e consequente modificação da comunidade (Ferretti *et al.*, 2010). Além disso, os elasmobrânquios contam com uma história evolutiva de mais de 400 milhões de anos, e são particularmente interessantes do ponto de vista fisiológico, principalmente devido à sua estratégia osmorregulatória por meio da retenção de ureia e organização do metabolismo energético incomum dentre os vertebrados, caracterizada por uma grande dependência de corpos cetônicos e aminoácidos como combustíveis energéticos (Speers-Roesch e Treberg, 2010), que será abordada melhor a seguir.

1.1. Lipídios e aspectos do metabolismo energético em elasmobrânquios

Os vertebrados apresentam diferentes estratégias para armazenamento e utilização dos estoques lipídicos, que podem variar com a história de vida de cada espécie (Sheridan, 1994; Speake e Thompson, 2000). Em mamíferos, os lipídios são estocados no tecido adiposo, principalmente nas cavidades torácica e abdominal. No entanto, os animais ectotérmicos apresentam maior variação nos padrões de armazenamento, como em teleósteos e anfíbios,

por exemplo, que dividem o estoque de gordura entre o fígado, músculo e gordura mesentérica (Birsoy *et al.*, 2013), e elasmobrânquios que utilizam o fígado como local principal de estoque de lipídios (Ballantyne, 2016).

Estes estoques energéticos são geralmente avaliados através de índices de condição corpórea (CF), que estimam quantitativamente os depósitos de gordura e indiretamente um índice de ‘saúde’ ou estado energético do animal (Stevenson e Woods, 2006). Estes índices normalmente são calculados a partir de medidas morfológicas (por exemplo, comprimento e massa do animal) e medidas bioquímicas plasmáticas ou teciduais (por exemplo, conteúdo de proteínas e lipídios) (Stevenson e Woods, 2006; Sardenne *et al.*, 2016). Em tubarões, a relação entre a massa corpórea e o comprimento total ou comprimento pré-caudal, são mais utilizadas, e tem sido positivamente relacionada com a concentração de metabólitos energéticos (Hussey *et al.*, 2009; Gallagher *et al.*, 2014). No entanto, poucos estudos têm explorado o CF em raias (utilizando a largura de disco e a massa corpórea) (Oddone *et al.*, 2007).

Os lipídios constituem um grupo diverso de compostos ricos em carbono, e são a forma mais concentrada de energia nos animais, funcionando como moléculas de armazenamento de energia e como componentes estruturais das células, principalmente devido às suas características bioquímicas de serem combustíveis quimicamente reduzidos, de maior rendimento energético ($\sim 38 \text{ kJ g}^{-1}$) quando comparados aos carboidratos e proteínas ($\sim 18 \text{ kJ g}^{-1}$), e armazenados sem a necessidade de água (Nelson e Cox, 2014). Estas características permitem que os lipídios sejam bons indicadores para estudar as alterações na qualidade do alimento e fluxo de energia através das teias alimentares (Pethybridge *et al.*, 2018).

Elasmobrânquios de forma geral apresentam uma organização metabólica incomum dentre os vertebrados, caracterizada pela limitada ou ausente oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e cardíaco e uma grande dependência de corpos cetônicos, principalmente o β -hidroxibutirato (β -HB), e aminoácidos como combustíveis oxidativos nestes tecidos (Speers-Roesch *et al.*, 2006). A ausência de albumina nestes animais, impede o transporte rápido de ácidos graxos não-esterificados, e consequentemente, altos níveis plasmáticos de corpos cetônicos são encontrados (Speers-Roesch *et al.*, 2006; Ballantyne, 2016). Além de serem considerados como a principal fonte de energia metabólica, os lipídios estão estreitamente ligados às condições ambientais, como quantidade e qualidade de presas, ciclos biológicos da reprodução e migração (Speers-Roesch e Treberg, 2010; Pethybridge *et al.*, 2014; Valls *et al.*, 2016; Gallagher *et al.*, 2017).

Dentre as classes de lipídios neutros, os triacilgliceróis (TAG), compostos formados por três cadeias de ácidos graxos (FA, do inglês *fatty acids*), ligados a uma molécula de glicerol, são a principal fonte de energia metabólica e o componente principal de estoques energéticos. Estudos tem revelado a positiva correlação entre as concentrações de TAG e a deposição de gordura em vertebrados (Williams *et al.*, 1999; Gallagher *et al.*, 2014), e acúmulo deste substrato durante o preparo para eventos energeticamente desgastantes, tais como migração e reprodução (Jenni-Eiermann *et al.*, 2002; McWilliams *et al.*, 2004). Em tubarões, o TAG plasmático tem sido positivamente associado com a condição corpórea (Gallagher *et al.*, 2014) e parecem seguir padrões sazonais, com maiores valores encontrados em tubarões durante a primavera e verão (Gallagher *et al.*, 2017). Além disso, foi observado, neste mesmo estudo, que os tubarões com dieta generalista, tais como *Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*, apresentaram menores concentrações de TAG do que tubarões *Ginglymostoma cirratum* e *C. limbatus* que são mais especialistas.

O colesterol (CHOL, do inglês *cholesterol*), o principal esterol sintetizado pelos animais, é um álcool policíclico de cadeia longa, essencial na composição das membranas celulares, além de atuar como precursor na biossíntese de hormônios esteroides, sais biliares e vitamina D (Nelson e Cox, 2014). A concentração do CHOL em animais tem sido relacionada com a dieta, estado nutricional e crescimento, e também com fatores ambientais como salinidade e temperatura (Larsson e Fänge, 1977). Em tubarões, as concentrações de CHOL foram positivamente correlacionadas ao tamanho corporal, indicando que animais maiores aumentam o acesso a presas maiores, comparado a animais menores (Gallagher *et al.*, 2017). Além disso, maiores valores de CHOL durante o verão tem sido relacionado à maior disponibilidade de alimento durante esta estação (Valls *et al.*, 2016).

Cerca de 65% de todos os lipídios são constituídos por FA, que são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, que contem de 4 a 36 átomos de carbonos. Os FA são classificados de acordo com o número de carbonos na cadeia, o grau de insaturação e a posição da primeira insaturação (Nelson e Cox, 2014). Os FA podem apresentar a cadeia de carbonos saturada (ácidos graxos saturados, SFA), podem apresentar uma insaturação (ácidos graxos monoinsaturados, MUFA), duas ou mais insaturações (ácidos graxos polinsaturados, PUFA) ou ainda FA com cadeias entre 20 e 22 carbonos contendo mais de três insaturações (ácidos graxos altamente insaturados, HUFA) (Arts *et al.*, 2009; Nelson e Cox, 2014). Os FA são comumente apresentados usando-se a seguinte notação abreviada: A:Bn-X, onde A indica o número de átomos de carbono, B é o número de insaturações e X indica a posição da primeira dupla ligação em relação ao grupo metil terminal (Nelson e Cox, 2014).

O perfil de FA de um consumidor pode refletir, em grande parte, os FAs obtidos da dieta, desta forma permitindo o uso destas moléculas como biomarcador dietético, refletindo o *status* fisiológico do animal e, portanto, índices de saúde da população (Budge *et al.*, 2006; Arts *et al.*, 2009; Iverson, 2009). Embora capazes de sintetizar os SFA e MUFA de fontes não lipídicas, ou modificados através do encurtamento da cadeia (por exemplo, C20:1n-9 para C18:1n-9) ou alongados (por exemplo, C16:1n7 para C18:1n-7), os vertebrados são incapazes de sintetizar *de novo* os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) com 18 carbonos da série n3 (ômega 3) e n6 (ômega 6) (Hulbert e Abbott, 2011), precursores de PUFA de cadeia longa fisiologicamente importantes. Nos sistemas aquáticos marinho, os PUFA com 20-22 carbonos são sintetizados por produtores primários, tais como diatomáceas e dinoflagelados e macroalgas, os quais produzem altas quantias do ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n3), ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6n3), respectivamente (Parrish 2013). Estes FA essenciais (EFA) e outros, tais como o ácido araquidônico (ARA; C20:4n6), estão envolvidos diretamente na manutenção da estrutura e fluidez das membranas celulares, função neurológica, cardiovascular, acuidade visual, crescimento, reprodução e sistema imunológico (Dalsgaard *et al.*, 2003; Parrish, 2009; Colombo *et al.*, 2016).

Estudos com elasmobrânquios incluem análises comparativas entre o perfil de FA em diferentes tecidos e nas presas, detectando relações tróficas, diferenças interespecíficas nos padrões de uso de recursos geral (dieta e habitat) e graus de especialização alimentar (Pethybridge *et al.*, 2011a). No tubarão da Groenlândia (*Somniosus microcephalus*) o perfil de FAs do músculo e do plasma correspondia ao das presas, destacando-se os FAs C18:1n7 para gordura de foca e C22:1n11 para o peixe alabote (McMeans *et al.*, 2012). Em combinação com os isótopos estáveis (SI, do inglês *stable isotope*), o perfil de FA também tem sido utilizado para delinear as diferenças espaciais e temporais de dieta em tubarões simpátricos (Every *et al.*, 2017), mudanças ontogenéticas e dependência do recurso materno durante o início da vida em filhotes (Belicka *et al.*, 2012). No tubarão cabeça-chata (*Carcharhinus leucas*) foi observado que filhotes mudam gradualmente o perfil de FA e SI com o crescimento, e tornam-se independentes do recurso materno quanto atingem > 100 cm de comprimento total (Belicka *et al.*, 2012).

1.2. Isótopos estáveis e aplicação em estudos tróficos

Tradicionalmente, estudos de dieta de elasmobrânquios têm utilizado a análise do conteúdo estomacal por meio de dissecação letal, que fornece um dado quantitativo e instantâneo da dieta (Cortés, 1999; Bornatowski *et al.*, 2014). Devido às limitações deste método, como a necessidade de grande número de indivíduos e a rápida digestão do alimento, métodos alternativos através do rastreamento bioquímico por marcadores tróficos, principalmente por SI, têm sido bem estabelecidos para investigar a ecologia trófica dos consumidores (Budge *et al.*, 2006; Iverson, 2009; Hussey *et al.*, 2012).

A assinatura de SI em tecidos animais pode ser empregada como uma técnica minimamente invasiva, não-letal, que fornece informações sobre a dieta, interações tróficas, origem nutricional e local de forrageamento, permitindo diferenciar padrões populacionais e comportamentos migratórios (Shiffman *et al.*, 2012; Hussey *et al.*, 2017). A Análise de SI é baseada no princípio de que os isótopos de nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) e carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) são transferidos da fonte ao consumidor de forma previsível (Shiffman *et al.*, 2012). Valores de isótopos de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), por exemplo, demonstram enriquecimento gradual na média de $\sim 3,4\text{‰}$ por nível trófico, através do consumo de proteínas (presa > predador), indicando a posição e as relações tróficas do consumidor dentro da cadeia alimentar (Hussey *et al.*, 2012). Estudos com estes marcadores são particularmente interessantes na detecção da partilha de recursos entre espécies simpátricas e mudanças ontogenéticas (Kinney *et al.*, 2011).

Os isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), por sua vez, fornecem uma medida da localização de forrageio, uma vez que são influenciados diretamente pelos processos bioquímicos durante a fixação em plantas, permitindo a determinação da origem do carbono no consumidor e distinção dos produtores primários da base da cadeia alimentar (Hobson, 1999; Rubenstein e Hobson 2004). Por exemplo, valores mais enriquecidos são utilizados como marcadores de ambientes costeiros, enquanto os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ são encontrados em ambientes pelágicos (Shiffman *et al.*, 2012). Mudanças no uso do habitat em decorrência de variações ontogenéticas foram detectadas por alterações na assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ em tubarões-baleia *Rhincodon typus* (Borrell *et al.*, 2011) e em grandes tubarões brancos *Carcharodon carcharias* (Carlisle *et al.*, 2012). Hussey *et al.* (2017), utilizando isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e enxofre ($\delta^{34}\text{S}$) verificaram que o uso diferenciado de habitats para forrageamento em filhotes de uma mesma população de *Negaprion brevirostris* está relacionada com a taxa de crescimento dos indivíduos, revelando uma seleção direcional no sentido de favorecer o menor tamanho e uma taxa de crescimento mais lenta.

Além disso, analisando a composição isotópica em diferentes tecidos, é possível obter informações sobre as variações temporais na dieta e no local de forrageio, isso porque a taxa de *turnover* dos SI varia em função do *turnover* metabólico, ou seja, o equilíbrio entre o catabolismo e o anabolismo e as taxas de crescimento (Fry e Arnold, 1982). Por exemplo, a composição isotópica em tecidos metabolicamente mais ativos, tais como o fígado e sangue, tendem a ter maiores taxas de *turnover*, refletindo a dieta de dias a semanas, enquanto que tecidos como músculo e dérmico, apresentam taxas de *turnover* menores, refletindo a dieta de longos períodos (meses a anos) (MacNeil *et al.*, 2005; Kinney *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2011).

1.3. Fase neonatal em elasmobrânquios

Informações da história de vida mostram que alguns organismos apresentam investimento parental e energético de forma a aumentar o sucesso reprodutivo e sobrevivência da prole (Kölliker, 2012). Para muitos organismos, incluindo os elasmobrânquios (tubarões e raias), os machos não contribuem no cuidado parental, consequentemente o tamanho, crescimento e aptidão dos filhotes são determinados pela alocação de recursos maternos (Hamlett *et al.*, 2005; Hussey *et al.*, 2010).

Ao longo do processo evolutivo, estes animais desenvolveram uma série de estratégias de história de vida, que inclui uma grande variedade de especializações morfológicas e fisiológicas nos modos reprodutivos e investimento energético materno-fetal (Hamlett *et al.*, 2005). A estratégia reprodutiva é classificada quanto ao desenvolvimento (vivíparo ou ovíparo) e tipo de nutrição do embrião (lecitotrófica ou matrotrófica) (Figura 1). A viviparidade é uma característica plesiomórfica no grupo, sendo as formas mais ancestrais a lecitotrófica saco-vitelino e a oofágica, enquanto as formas mais derivadas são a placentotrófica e a histotrófica, na qual as relações materno-fetais são maiores (Hamlett *et al.*, 2005; Awruch, 2016).

Figura 1- Classificação dos modos reprodutivos em fêmeas de elasmobrânquios quanto ao desenvolvimento e nutrição do embrião. Modificado de Awruch (2016) e Adams *et al.* (2017).

Os elasmobrânquios não apresentam cuidado parental após o nascimento como visto em outros vertebrados, contudo, ao nascerem os filhotes contam com reservas energéticas de fontes de investimento materno pré-natal, que são estocadas na forma de saco vitelínico interno ou no fígado (Hussey *et al.*, 2010). Tais aspectos nutricionais têm sido investigados de forma mais ampla, considerando as diferentes estratégias e possíveis consequências em estudos ecológicos (Hussey *et al.*, 2010; 2017; Belicka *et al.*, 2012). Tubarões placentários mostram um declínio na massa total do fígado, no índice hepatossomático e no CF com o crescimento corporal (verificado muitas vezes através da cicatrização umbilical; Figura 2a), decorrentes do uso do estoque energético, provisionado pela mãe durante a fase pré-natal (Hussey *et al.*, 2009; 2010). Antes destes estudos, o declínio no CF de filhotes de tubarões-martelo *Sphyrna lewini* era considerado como um estado nutricional deficiente, devido à redução de presas ou pouca habilidade de forrageamento, e atribuído como causa da alta taxa de mortalidade dentro do berçário (Figura 2b; Duncan e Holanda, 2006). No entanto, esta parece ser a estratégia adotada pelos tubarões placentários (Hussey *et al.*, 2010).

Figura 2- Relações entre biometrias e índices de condição corporal. (a) entre os índices e massa do estômago com o estágio de cicatrização umbilical em filhotes de tubarões *Carcharhinus obscurus*, modificado de Hussey *et al.* (2010). (b) entre índice de condição corpórea ao longo do tempo em tubarões *Sphyrna lewini*, modificado de Duncan e Holanda (2006).

Filhotes de tubarões, assim como outros vertebrados, passam por mudanças significativas na utilização dos recursos energéticos durante seus primeiros meses de vida, desde a transição da dependência do recurso materno até a alimentação independente, seguida de algumas mudanças na dieta em decorrência de variações ontogenéticas (Hussey *et al.* 2010; Olin *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2015). Nas fases neonatais iniciais, os tecidos dos filhotes refletem o sinal materno, que pode variar com a estratégia reprodutiva. Em espécies vivíparas lecitotróficas os filhotes têm valores isotópicos semelhantes ao materno (Bourg *et al.*, 2014), já em espécies placentárias os SI podem ser mais enriquecidos (McMeans *et al.*, 2009; Vaudo *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2011) ou então como em espécies lecitotróficas, não mostrar enriquecimento (Olin *et al.*, 2018).

Desta forma, entender as estratégias nutricionais utilizadas pelos filhotes ao nascerem e quais as energéticas que necessitam durante essa fase inicial, é fundamental para compreender a escala temporal necessária para o desenvolvimento de habilidades de forrageamento (Belicka *et al.*, 2012; Matich *et al.*, 2015). Além disso, estas informações permitem avaliar o grau de investimento, que são aspectos importantes na dinâmica populacional da espécie, e a utilização de recursos em área de berçário (Hussey *et al.*, 2010). As raias Myliobatiformes representam um modelo interessante para tais estudos, principalmente por apresentarem distintas histórias de vida e alto grau de investimento materno (Hamlett *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2013). Apesar de tais características e de sua posição trófica em sistemas marinhos como importantes mesopredadores onívoros, as raias têm recebido pouca atenção em tais estudos (Tilley *et al.*, 2013).

1.4. Aspectos gerais das raias *Rhinoptera bonasus* e *R. brasiliensis*

As raias do gênero *Rhinoptera* (Myliobatiformes; Rhinopteridae) estão distribuídas em áreas costeiras nas regiões temperadas e tropicais, geralmente habitando em profundidades entre 1 e 22 m (McEachran e Carvalho, 2002). São raias bentopelágicas, passando grande parte do tempo na superfície, geralmente em grandes agregações (< 10.000 raias), mas alimentam-se no fundo (Blaylock 1993; Ajemian e Powers, 2016). No Brasil, são registradas duas espécies, a *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, popularmente conhecidas como raias ticonha (Gomes *et al.*, 2010).

Rhinoptera bonasus (Mitchill, 1815) apresenta distribuição desde a Nova Inglaterra (EUA) até o norte da Argentina, incluindo Golfo do México e Cuba (Bigelow e Schroeder 1953; McEachran e Carvalho, 2002; Palacios-Barreto *et al.*, 2017). Esta espécie é altamente migratória, com formação de agregações sexuais e particionamento ontogenético de habitat (Smith e Merriner, 1985; Schwartz, 1990; Ajemian e Powers, 2016). Na costa leste dos Estados Unidos, onde são mais estudadas, habitam estuários sazonalmente, com uma parcela das populações migrando para a Baía de Chesapeake durante o final da primavera e verão, para acasalamento e uso da área como berçário (Smith e Merriner 1987; Fisher 2010). São eurialinas, podendo ser encontradas em águas salobras com salinidades de 17 a 37 ‰ (Neer *et al.*, 2007). Atualmente está classificada como "Quase Ameaçada" na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (do inglês, *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) (Barker, 2015) e listada no apêndice II da lista de espécies ameaçadas da fauna selvagem no estado de São Paulo, como uma espécie que requer cuidado na gestão da pesca e conservação (ALESP, 2014).

Rhinoptera brasiliensis apresenta uma distribuição um pouco mais restrita, com indivíduos observados desde a Carolina do Norte (EUA), Golfo do México, Colômbia (Costa do Caribe), Venezuela, até o sul do Brasil (Grijalba-Bendeck *et al.*, 2007; Palacios-Barreto *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2017). Alguns relatos sugerem que *R. brasiliensis* tem uma história de vida semelhante a de *R. bonasus* (Vooren *et al.*, 2005; McEachran e Carvalho, 2002; Domingues *et al.*, 2009) e está classificada como "Em Perigo" pela IUCN (Vooren e Lamónaca 2004) e "Criticamente em Perigo" pelo ICMBio (ICMBio, 2016).

A morfologia externa de ambas as espécies é muito similar e de difícil distinção visual, sendo a conformação dentária e a contagem dos dentes pavimentosos, o meio de identificação mais utilizado para diferenciar as formas existentes (Gomes *et al.*, 2010). O conhecimento atual sobre o gênero *Rhinoptera* em águas brasileiras está restrito a poucos

estudos realizados na região Sudeste/Sul do país, que tiveram como foco a sua ocorrência na pesca (Vooren *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2017).

As Rhinopteridae apresentam a viviparidade histotrófica lipídica, uma estratégia reprodutiva altamente especializada, caracterizada pela produção e secreção do histotrofo ("leite uterino") no lúmen uterino, substância rica em lipídios, proteínas e carboidratos, ingeridos e/ou absorvidos pelo embrião (Wourms, 1977; Hamlett *et al.*, 1996; 2005). Durante a gestação, o útero desenvolve projeções vilosas, os trofonemas, responsáveis pelo aumento da superfície de secreção do histotrofo e relacionadas a demandas nutricionais do embrião e trocas gasosas (Hamlett *et al.*, 1985; 1996; 2005).

A nutrição do embrião nesta estratégia ocorre de 2 formas: (1) dependente da reserva vitelínica e (2) do suprimento do histotrofo (fase de útero-lactação) (Wourms, 1981; Hamlett *et al.*, 2005). Filogeneticamente, dentre as Myliobatiformes (Figura 3), as espécies mais basais possuem o histotrofo consideravelmente mais diluído e com menor concentração de lipídios e proteínas do que o encontrado em espécies derivadas (Hamlett *et al.*, 2005). Tal estratégia confere um alto grau de investimento materno nas raias Rhinopteridae. O termo útero-lactação foi introduzido para referir-se as similaridades estruturais da lactação em mamíferos (Hamlett *et al.*, 1996), presumindo que a produção de histotrofo rico em lipídios tenha evoluído em resposta às pressões seletivas que favoreceram o aumento do investimento parental em sua prole (Oftedal, 2002).

Figura 3- Filogenia de Myliobatiformes. **(A)** relações filogenéticas baseadas em evidências genéticas e **(B)** morfológicas. Retirado de Adnet *et al.* (2012).

Durante o ciclo de vida, a *R. bonasus* usa diferentes áreas para berçário, reprodução e alimentação. As fêmeas, quando grávidas, acessam áreas de berçário para o parto, com o acasalamento ocorrendo na sequência (Figura 4). Após entrarem em fase reprodutiva, as fêmeas apresentam ciclos anuais contínuos e são mais suscetíveis à pressão da pesca durante a residência nos berçários, que são geralmente em áreas estuarinas ou costeiras (Omori e

Fisher, 2017; Rangel *et al.*, 2018). Estudos sobre a migração de *R. bonasus* no hemisfério norte, revelam que as fêmeas migraram no início do outono da Baía de Chesapeake (área de berçário e reprodução) para o sul da Flórida (área de alimentação), diferentes dos machos, que migraram para o norte e para o sul da Nova Inglaterra, EUA (Omori e Fisher, 2017). Observações durante o desenvolvimento embrionário sugerem que ocorre o processo denominado diapausa embrionária para esta espécie (Figura 4), uma vez que, quando as fêmeas migram, elas estão na primeira fase da gestação, na qual são observados embriões com média de 21.4 cm largura de disco (LD), e quando retornam, 7 meses depois, os embriões estão com média de 28.3 cm LD (Fisher, 2010). No entanto, não se sabe sobre a rota migratória ou aspectos reprodutivos destas raias na costa do Brasil.

Figura 4- Diagrama do ciclo reprodutivo proposto para *R. bonasus*, para ilustrar a estratégia reprodutiva de raias da ordem Myliobatiformes. Informações retiradas de: Fisher (2010); Goodman *et al.* (2010); Fisher *et al.* (2013); Ajemian e Powers (2016). Retirado de Rangel *et al.* (2018).

Devido principalmente ao longo período de gestação (11-12 meses) e baixo potencial reprodutivo (1 embrião/fêmea/ano), *R. bonasus* é classificada como a espécie com a menor taxa de fertilidade (< 14) entre os elasmobrânquios (Neer e Thompson, 2005; Fisher *et al.*, 2013; Poulakis, 2013; Grubbs *et al.*, 2016). Tais características indicam que o investimento materno na nutrição dos embriões destas raias é ainda maior do que o observado em espécies de tubarões placentários (Wourms, 1981). As vantagens evolutivas da produção de um número reduzido de filhotes, mas de maior tamanho, incluem maiores chances de sobrevivência, obtenção de presas e menor susceptibilidade aos predadores no nascimento. Além disso, permite o desenvolvimento mais complexo de estruturas neurais e cognição (Elliot e Crespi 2008). No entanto, requer da fêmea a obtenção de grande quantidade de energia do ambiente, para nutrir os embriões (Wourms, 1981; Castro *et al.*, 2016).

Considerando-se a importância do conhecimento da dinâmica nutricional neonatal nos elasmobrânquios, o presente estudo investigou o metabolismo energético neonatal e as interações tróficas de *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, utilizando lipídios, FA e SI. Foram testadas as seguintes hipóteses: **(1)** *Rhinoptera bonasus* utiliza a região de Bertioga como área de berçário durante as fases iniciais da vida; **(2)** o grande tamanho ao nascimento (1/3 da mãe), maiores períodos de gestação (11-12 meses) e transferência de nutrientes ricos em lipídios e proteínas através do histotrofo, confere a *R. bonasus* um alto grau de investimento energético aos filhotes; **(3)** jovens do ano I (YOY I, do inglês *young-of-the-year*) serão mais enriquecidos em EFA e $\delta^{15}\text{N}$ que YOY II (mais velhos), refletindo o sinal materno; **(4)** em YOY II, os FA e SI vão refletir a composição da dieta, mudando progressivamente com o aumento do tamanho corporal; **(5)** TAG em YOY I será menor que em YOY II, enquanto que CHOL será maior em YOY II; sendo que os EFA e TAG serão positivamente correlacionados com a condição corpórea (Fulton).

Conclusões e Considerações Finais

Demonstramos que a raia *R. bonasus* e possivelmente a *R. brasiliensis* utilizam a região de Bertioga, local de estudo do presente trabalho, como área de berçário, com período de nascimento ocorrendo entre o final da primavera e verão. O acompanhamento em conjunto com os pescadores mostrou-se muito eficiente no monitoramento das capturas, sendo possível a identificação do gênero e frequência de captura durante o ano. Além disso, a soltura imediata realizada pelos pescadores mostrou-se um manejo adequado, assegurando a sobrevivência dos animais na pós-captura da pesca de arrasto. Demonstramos ainda as limitações em avaliar o período neonatal e área de berçário para *Rhinoptera* spp. com critérios propostos para elasmobrânquios de outras estratégias reprodutivas, que utilizam a marca do cordão umbilical para a classificação dos filhotes. A classificação dos filhotes de *R. bonasus* através do tamanho corpóreo, baseada no estudo de idade e crescimento de Fisher *et al.* (2013), mostrou-se adequada para a investigação dos aspectos nutricionais e monitoramento das capturas na área de berçário. YOY II de dezembro e alguns encontrados em fevereiro (> 60.0 cm LD) provavelmente eram animais que estavam próximos a 1 ano de idade, com maior tamanho corporal.

Nossos resultados suportam a hipótese de que a estratégia histotrófica lipídica, juntamente com maiores períodos de gestação e o grande tamanho ao nascimento da raia *R. bonasus* confere um maior investimento energético aos filhotes. Esta estratégia parece conferir melhores condições nutricionais e habilidades de forrageio aos filhotes ao nascerem. Além disso, o perfil de EFA encontrado sugere que os filhotes não passem por deficiência destes FA, como é observado em tubarões placentários (Wai *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012), indicando grande demanda de EFA durante o início do crescimento. Filhotes nascem enriquecidos em DHA, ARA e $\delta^{15}\text{N}$, como reflexo da transferência materna intrauterina, e assim como encontrado para o tubarão *C. leucas* (Belicka *et al.*, 2012), *R. bonasus* demonstra perda gradual do sinal isotópico e de FA materno. YOY apresentam uma diminuição do CF, CHOL e β -HB com o crescimento, provavelmente como resultado do uso dos estoques energéticos provisionados pela mãe durante a gestação e redução das taxas de crescimento. YOY II parecem ter melhores habilidades de forrageio, demonstrado pelo aumento de EFA e diminuição de SFA e BFA plasmático, assim como diminuição nas concentrações de β -HB.

Os SI revelaram que as duas espécies particionam recursos alimentares, uma estratégia que é geralmente adotada pelas espécies que utilizam a mesma área como berçário.

Diferenças entre FA muscular e hepático entre *R. bonasus* e *R. brasiliensis* podem indicar que filhotes acessam diferentes recursos na área de berçário, ou que *R. brasiliensis* tenha nascido há mais tempo, e seu perfil de FA hepático reflita a incorporação da dieta. Além disso, diferenças na composição de FA sugerem que diferentes FA são transferidos da mãe para os filhotes durante a fase pré-natal, possivelmente porque a dieta das mães seja diferente ou que as duas espécies apresentem um metabolismo diferenciado. Um estudo comparativo entre YOY de *R. brasiliensis* em diferentes estágios é necessário para testar tais hipóteses, assim como realizado para *R. bonasus* no presente estudo.

Estas conclusões demonstram que a assinatura de FA e SI podem fornecer informações confiáveis e que podem ser usadas para discriminar populações, classes de idade e mudanças na dieta. Os SI trazem informações interessantes sobre o enriquecimento presente nos filhotes, que foram fortemente correlacionados com a razão DHA/EPA, e permite a análise do uso de recursos alimentares em uma escala bidimensional. No entanto, verificamos que a análise de FA foi mais conclusiva para comparação entre YOY I e YOY II e das mudanças graduais em decorrência de variações ontogenéticas. Além disso, o DHA, C18:1n7 e as razões n3/n6, DHA/EPA e C18:1n9/C18:1n7 foram significativamente correlacionados com o CF em *R. bonasus*. Como os FA são essenciais em processos fisiológicos ligados ao crescimento, reprodução e sobrevivência, eles fornecem excelentes ferramentas para examinar simultaneamente a dinâmica nutricional neonatal, transferência de energia, interações tróficas e condição nutricional ou de saúde (Pethybridge *et al.*, 2015). Os lipídios e FA apresentam taxas de *turnover* mais rápidas do que as proteínas e, consequentemente o $\delta^{15}\text{N}$, sendo assim considerados melhores marcadores para investigar mudanças temporais, mostrando-se ferramentas interessantes no estudo da dinâmica nutricional e interações tróficas (Pethybridge *et al.*, 2015; 2018).

A combinação de biomarcadores permitiu analisar os aspectos nutricionais e interações tróficas de YOY em uma área de berçário, avaliados por meio de amostragem não-letal, permitindo compreender como o maior investimento materno afeta tais aspectos durante o início da história de vida das raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis*. Essas ferramentas fisiológicas podem ser utilizadas para a geração de modelos mecanicistas confiáveis, para que, posteriormente a essa descrição inicial, seja detectada a vulnerabilidade desses animais com complexa história de vida.

7. Referências Bibliográficas

- Adams, K. R., Fetterplace, L. C., Davis, A. R., Taylor, M. D., Knott, N. A. 2018. Sharks, rays and abortion: The prevalence of capture-induced parturition in elasmobranchs. *Biological Conservation*, 217, 11-27.
- Adnet, S., Cappetta, H., Guinot, G., Notarbartolo Di Sciara, G. 2012. Evolutionary history of the devil rays (Chondrichthyes: Myliobatiformes) from fossil and morphological inference. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166, 132–159.
- Ajemian, M. J., Powers, S. P. 2016. Seasonality and ontogenetic habitat partitioning of cownose rays in the northern Gulf of Mexico. *Estuaries and Coasts*, 39(4), 1234-1248.
- Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo (ALESP). Decreto Nº 60.133, de 7 de Fevereiro de 2014: As espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção, as quase ameaçadas e as deficientes de dados para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. 2014. Available from: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2014/decreto-60133-07.02.2014.html>
- Arts, M. T., Brett, M. T., Kainz, M. 2009. Lipids in aquatic ecosystems. Springer Science & Business Media. 394 p.
- Awruch, C. A. 2016. Reproduction strategies. In: *Fish Physiology*. Vol. 34. Academic Press. pp. 255-310.
- Ballantyne, J.S. 1997. Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 118: 703–742.
- Ballantyne, J.S. 2016. Jaws II: metabolism of elasmobranchs. In: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (eds) *Physiology of elasmobranch fishes: internal processes*, 1st edn. Academic Press, United States, pp 395–456.
- Barker, A. S. 2006. The IUCN Red List of Threatened Species. *Rhinoptera bonasus*. e.T60128A12310195 [Internet] 2006 [cited 2017 Mar 10]. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T60128A12310195.en>.
- Beckmann, CL, Mitchell JG, Seuront L, Stone DAJ, Huveneers C. 2014a. From eggs to hatchling: preferential retention of fatty acids biomarkers in young-of-the-year Port Jackson sharks *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal Fish Biology*. 85: 944-952.
- Beckmann, C. L., Mitchell, J. G., Stone, D. A., Huveneers, C. 2013. A controlled feeding experiment investigating the effects of a dietary switch on muscle and liver fatty acid

- profiles in Port Jackson sharks *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, 448: 10-18.
- Beckmann, C. L., Mitchell, J. G., Stone, D. A., Huveneers, C. 2014. Inter-Tissue Differences in Fatty Acid Incorporation as a Result of Dietary Oil Manipulation in Port Jackson Sharks (*Heterodontus portusjacksoni*). *Lipids*, 49: 577-590.
- Belicka, L.L., Matich, P., Jaffé, R., Heithaus, M.R. 2012. Fatty acids and stable isotopes as indicators of early-life feeding and potential maternal resource dependency in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Marine Ecology Progress Series*, 455: 245–256.
- Blaylock, R. A. 1993. Distribution and abundance of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, 16:255–63.
- Bigelow, H. B., Schroeder, W. C. Sawfishes, Guitarfishes, Skates and Rays. Volume 1 de Memoir. New Haven: Sears Foundation for Marine Research, 1953.
- Birsoy, K., Festuccia, W. T., Laplante, M. 2013. A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126:1541-1552.
- Bornatowski, H., Wosnick, N., do Carmo, W. P. D, Corrêa, M. F. M, Abilhoa, V. 2014. Feeding comparisons of four batoids (Elasmobranchii) in coastal waters of southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94:1491-99.
- Borrell, A., Gómez-Campos, E., Aguilar, A. 2015. Influence of Reproduction on Stable-Isotope Ratios: Nitrogen and Carbon Isotope Discrimination between Mothers, Fetuses, and Milk in the Fin Whale, a Capital Breeder. *Physiology Biochemistry Zoology*, 89:41–50.
- Bourg, B. Le, Kiszka, J., Bustamante, P. 2014. Mother–embryo isotope ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) fractionation and mercury (Hg) transfer in aplacental deep-sea sharks. *Journal of Fish Biology*, 84:1574-1581.
- Budge, S. M., Iverson, S. J., Koopman, H. N. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science*, 22(4): 759-801.
- Carlisle, A.B., Kim, S.L., Semmens, B.X., Madigan, D.J., Jorgensen, S.J., Perle C.R., Anderson S.D., Chapple T.K., Kanive P.E., Block, B.A. 2012. Using Stable Isotope Analysis to Understand the Migration and Trophic Ecology of Northeastern Pacific White Sharks (*Carcharodon carcharias*). *PLoS ONE*, 7: e30492.

- Castro, J. I. 1993. The shark nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environmental Biology of Fishes*, 38: 37-48.
- Castro, J. I., Sato, K., Bodine, A. B. 2016. A novel mode of embryonic nutrition in the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*. *Marine Biology Research*, 12(2): 200-205.
- Chin A., Kyne P. M., Walker T.I., McAuley R. B. 2010. A new integrated risk assessment for climate change: Analyzing the vulnerability of sharks and rays on Australia's Great Barrier Reef. *Global Change Biology*, 16:1936–1953.
- Cohen, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NJ, Erlbaum.
- Colombo, S. M., Wacker, A., Parrish, C. C., Kainz, M. J., Arts, M. T. 2016. A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*, 25: 163-174.
- Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES Journal of Marine Science*, 56: 707-717.
- Cortés, E. 2004. Life history patterns, demography, and population dynamics. In: Carrier J. C., Musick, J. A., Heithaus M. R., editors. *Biology of Sharks and Their Relatives*. Boca Raton: CRC Press, p. 449–69.
- Dalsgaard, J., John, M. S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46: 225-340.
- Domingues, R. R., Gonzalez, M. M. B, Amorim, A. F. 2009. Scientific Note First reported occurrence of pregnant and neonato, *Rhinoptera brasiliensis* (Chondrichthyes, Rhinopteridae) caught off Guarujá city, São Paulo state, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4): 605-608.
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavahagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N.K., Fordham, S.V., Francis, M.P., Pollock, C.M., Simpfendorfer, C.A., Burgess, G.H., Carpenter, K.E., Compagno, L.J.V., Ebert, D.A., Gibson, C., Heupel, M.R., Livingstone, S.R., Sanciangco, J.C., Stevens, J.D., Valenti, S. e White, W.T. 2014. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife*.
- Duncan, K. M., Holland, K. N. 2006. Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 211-221.

- El-Sabaawi, R., Dower, J. F., Kainz, M., Mazumder, A. 2009. Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology*, 156: 225-237.
- Elliot, M. G., Crespi, B. J. 2008. Placental invasiveness and brain–body allometry in eutherian mammals. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 1763-1778.
- Every, S. L., Pethybridge, H. R., Crook, D. A., Kyne, P. M., Fulton CJ. Tropical shark trophic niches. 2016. Comparison of fin and muscle tissues for analysis of signature fatty acids in tropical euryhaline sharks. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 479: 46–53
- Every, S. L., Pethybridge, H. R., Fulton, C. J., Kyne, P. M., Crook, D. A. 2017. Niche metrics suggest euryhaline and coastal elasmobranchs provide trophic connections among marine and freshwater biomes in northern Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 565: 181-196.
- Ferretti, F., Worm, B., Britten, G.L., Heithaus, M.R., Lotze, H.K. 2010. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters*, 13(8): pp.1055-1071.
- Fisher, R.A. 2010. Life history, trophic ecology, & prey handling by cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, from Chesapeake Bay. NOAA final report (NA07NMF4570324) Grant No. 713031. VIMS Marine Resource Report No. 2010–20, VSG-10-25.
- Fisher, R. A., Call, G. C., Grubbs, R. D. 2013. Age, growth, and reproductive biology of cownose rays in Chesapeake Bay. *Marine and Coastal Fisheries*, 5(1): 224-235.
- Fisher, R.A., Call, G.C., McDowell, J.R. 2014. Reproductive variations in cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) from Chesapeake Bay. *Environmental Biology of Fishes*, 97:1031–1038.
- Folch, J., Less, M., Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226:497-503.
- Frings, C.S., Fendly, T.W., Dunn, R.T., Quenn, C.A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*, 18: 673-674.
- Frisk, M. G. 2010. Life history strategies of batoids. *Sharks and their Relatives. II. Biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 283-318.
- Fry, B., Arnold, C. 1982. Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia*, 54: 200–204.

- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:241–253.
- Gallagher, A. J., Skubel, R. A., Pethybridge, H. R., Hammerschlag, N. 2017. Energy metabolism in mobile, wild-sampled sharks inferred by plasma lipids. *Conservation Physiology*, 5: 1-10.
- Gallagher, A. J., Wagner, D. N., Irschick, D. J., Hammerschlag, N. 2014. Body condition predicts energy stores in apex predatory sharks. *Conservation Physiology*, 2: cou022.
- Gomes, U.L., Signori, C., Gadig, O.B.F., Santos, H.R.S. 2010. Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Technical Books.
- Goodman, M. A., Conn, P. B., Fitzpatrick, E. 2010. Seasonal occurrence of cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in North Carolina's estuarine and coastal waters. *Estuaries and Coasts*, 34: 640–651.
- Grijalba-Bendeck M, Polo-Silva C, Acero AP. Una aproximación a la abundancia de los batoideos capturados artesanalmente en santa marta (Colombia). *Boletim Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras*, 2007: 36:251-68.
- Grubbs, R. D., Carlson, J. K., Romine, J. G., Curtis, T. H., McElroy, W. D., McCandless, C. T., Cotton C. F., Musick, J. A. 2016. Critical assessment and ramifications of a purported marine trophic cascade. *Scientific Reports*, 6, 20970.
- Hamlett, W.C., Kormanik, G.A., Storrie, M., Stevens, B., Walker, T.I. 2005. Chondrichthyan parity, lecithotrophy and matrotrophy. In: Hamlett W. C. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (pp. 395e434). Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
- Hamlett, W.C., Musick, J.A., Eulitt, A.M., Jarrell, R.L., Kelly, M.A. 1996. Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for Uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal Zoology*, 74: 1417-1430.
- Hamlett, W.C., Wourms, J P., Smith, J.W. 1985. Stingray placental analogues: structure of trophonemata in *Rhinoptera bonasus*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17: 541-550.
- Heithaus, M. R. 2007. Nursery areas as essential shark habitats: a theoretical perspective. *American Fisheries Society Symposium Series*, 50: 3-13.
- Heithaus, M. R., Frid, A., Wirsing, A. J., Worm, B. 2008. Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4): 202-210.

- Heithaus, M. R., Wirsing, A. J., Dill, L. M. 2012. The ecological importance of intact top-predator populations: a synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Marine and Freshwater Research*, 63(11), 1039-1050.
- Heupel, M.R., Carlson, J.K. e Simpfendorfer, C.A., 2007. Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Marine Ecology Progress Series*, 337: 287-297.
- Hobson, K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecology*, 120:314–326.
- Hulbert, A. J., Abbott, S. K. 2012. Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. *Australian Journal of Zoology*, 59: 369-379.
- Hussey, N. E., Cocks, D. T., Dudley, S. F., McCarthy, I. D., Wintner, S. P. 2009. The condition conundrum: application of multiple condition indices to the dusky shark *Carcharhinus obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 380: 199-212.
- Hussey, N. E., DiBattista, J. D., Moore, J. W., Ward, E. J., Fisk, A. T., Kessel, S., Guttridge, T. L., Feldheim, K. A., Franks, B. R., Gruber, S. H., Weideli, O. C. Chapman, D. D. 2017. Risky business for a juvenile marine predator? Testing the influence of foraging strategies on size and growth rate under natural conditions. *Proceedings of the Royal Society B*. 284: 20170166.
- Hussey, N.E., MacNeil, M.A., Olin, J.A., McMeans, B.C., Kinney, M.J., Chapman, D.D., Fisk, A.T. 2012. Stable isotopes and elasmobranchs: tissue types, methods, applications, and assumptions. *Journal of Fish Biology*, 80:1449–1484.
- Hussey, N.E., Wintner, S.P., Dudley, S.F.J., Cliff, G., Cocks, D.T., MacNeil, M.A. 2010. Maternal investment and size-specific reproductive output in carcharhinid sharks. *Journal Animal Ecology*, 79: 184–193.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Avaliação do risco de extinção dos elasmobrânquios e quimeras no Brasil: 2010-2012. Itajaí: CEPESUL, 2016.
- Iverson, S.J. 2009. Tracing Aquatic Food Webs Using Fatty Acids: From Qualitative Indicators to Quantitative Determination. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*, ed. Arts, MT, Brett MT, Kainz MJ. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pp. 281-308.
- Iverson, S.J., Oftedal, O.T., Bowen, W.D., Boness, D.J., Sampugna, J. 1995. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *Journal Comparative Physiology*, 165: 1-12.

- Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Piersma, T. 2002. Plasma metabolites reflect seasonally changing metabolic processes in a long-distance migrant shorebird (*Calidris canutus*). *Zoology*, 105(3): 239-246.
- Käkelä, R., Furness, R. W., Kahle, S., Becker, P. H., Käkelä, A. 2009. Fatty acid signatures in seabird plasma are a complex function of diet composition: a captive feeding trial with herring gulls. *Functional Ecology*, 23: 141-149.
- Kinney, M. J., Hussey, N. E., Fisk, A. T., Tobin, A. J., Simpfendorfer, C. A. 2011. Communal or competitive? Stable isotope analysis provides evidence of resource partitioning within a communal shark nursery. *Marine Ecology Progress Series*, 439: 263-276.
- Kölliker, M. (2012). *The evolution of parental care*. OUP Oxford.
- Larsson, Å., Fänge, R. 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 57(3): 191-196.
- Lessa, R., Rodrigues, J., Barreto, R., Nunes, R., Camargo, G., Santana, F. M. 2016. Pesca Incidental de Rajiformes nos arrastos de praia em Caiçara do Norte, RN. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 8:34-41.
- Li, Y., Hussey, N. E., Zhang, Y. 2016. Quantifying ontogenetic stable isotope variation between dermis and muscle tissue of two pelagic sharks. *Aquatic Biology*, 25: 53-60.
- Luer, C. A., Walsh, C.J., Bodine, A.B., Rodgers, R.S., Wyffels, J. 1994. Preliminary biochemical analysis of histotroph secretions from the cownose ray *Rhinoptera bonasus* and the atlantic stingray *Dasyatis sabina*, with observations on the uterine villi from *R. bonasus*. Abstract American Elasmobranch Society 10th Annual Meeting, 2.-8. June 1994, University of Southern California, Los Angeles.
- Matich, P., Heithaus, M. R., Layman, C. A. 2011. Contrasting patterns of individual specialization and trophic coupling in two marine apex predators. *Journal of Animal Ecology*, 80(1): 294-305.
- Matich P., Kiszka J.J., Heithaus, M.R., Mourier J., Planes, S. 2015. Short-term shifts of stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) values in juvenile sharks within nursery areas suggest rapid shifts in energy pathways *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 465:83–91.
- Matich, P., Kiszka, J. J., Mourier, J., Planes, S., Heithaus, M. R. 2017. Species co-occurrence affects the trophic interactions of two juvenile reef shark species in tropical lagoon nurseries in Moorea (French Polynesia). *Marine environmental research*, 127: 84-91.
- McEachran, J. D., Carvalho M. R. 2002. Batoid fishes. In *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic*, Vol. 1. (Carpenter, K. E., ed). Rome: FAO.

- McMeans, B.C., Olin, J.A., Benz, G.W. 2009. Stable-isotope comparisons between embryos and mothers of a placental shark species. *Journal of Fish Biology*, 75: 2464–2474.
- McMeans, B. C., Arts, M. T., Fisk, A. T. 2012. Similarity between predator and prey fatty acid profiles is tissue dependent in Greenland sharks (*Somniosus microcephalus*): Implications for diet reconstruction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 429:55-63.
- MacNeil, M. A., Skomal, G. B., Fisk, A. T. 2005. Stable isotopes from multiple tissues reveal diet switching in sharks. *Marine Ecology Progress Series*, 302:199-206.
- McWilliams, S. R., Guglielmo, C., Pierce, B., Klaassen, M. 2004. Flying, fasting, and feeding in birds during migration: a nutritional and physiological ecology perspective. *Journal of Avian Biology*, 35(5): 377-393.
- Musick J.A., J.K. Ellis. 2005. Reproductive Evolution of Chondrichthyes. pp. 45-79. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras*. William C. Hamlett. ed. Science Publishers, Inc. Plymouth, U.
- Neer, J.A., Rose, K.A., Cortés, E. 2007. Simulating the effects of temperature on individual and population growth of *Rhinoptera bonasus*: a coupled bioenergetics and matrix modeling approach. *Marine Ecology Progress Series*, 329: 211-223.
- Neer, J. A., Thompson, B. A. 2005. Life history of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in the northern Gulf of Mexico, with comments on geographic variability in life history traits. *Environmental Biology of Fishes*, 73: 321–31.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- Oddone, M. C., Amorim, A. F. D., Mancini, P. L., Norbis, W. 2007. Size composition, monthly condition factor and morphometrics for fishery-dependent samples of *Rioraja agassizi* (Chondrichthyes: Rajidae), off Santos, Southeast Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 5: 415-424.
- Oftedal, O.T. 2002. The Mammary Gland and Its Origin During Synapsid Evolution. *J Mam. Gland Biol. Neopl.* 7: 225-252.
- Olin, J. A., Hussey, N. E., Fritts, M., Heupel, M. R., Simpfendorfer, C. A., Poulakis, G. R., Fisk, A. T. 2011. Maternal meddling in neonatal sharks: implications for interpreting stable isotopes in young animals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 1008-1016.

- Olin, J. A., Shipley, O. N., McMeans, B. C. 2018. Stable isotope fractionation between maternal and embryo tissues in the Bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*). *Environmental Biology of Fishes*, 1-11.
- Omori, K. L., Fisher, R. A. 2017. Summer and fall movement of cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, along the east coast of United States observed with pop-up satellite tags. *Environmental Biology of Fishes*, 100: 1435-1449.
- Palacios-Barreto, P., Cruz, V. P., Foresti, F., Rangel, B. D. S., Uribe-Alcocer, M., Diaz-Jaimes, P. 2017. Molecular evidence supporting the expansion of the geographical distribution of the Brazilian cownose ray *Rhinoptera brasiliensis* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) in the western Atlantic. *Zootaxa*, 4341: 593-600.
- Parrish, C. C. 2013. Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography*, 2013: 1-16.
- Parrish, C.C. 2009. Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*, ed. Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp. 309-326.
- Parrish, C. C., Pethybridge, H., Young, J. W., Nichols, P. D. 2015. Spatial variation in fatty acid trophic markers in albacore tuna from the Southwestern Pacific Ocean—a potential ‘tropicalization’ signal. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 113: 199-207.
- Pethybridge, H. R., Choy, C. A., Polovina, J. J., Fulton, E. A. 2018. Improving marine ecosystem models with biochemical tracers. *Annual review of marine science*, 10(1).
- Pethybridge, H., Daley, R. K., Nichols, P. D. 2011a. Diet of demersal sharks and chimaeras inferred by fatty acid profiles and stomach content analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409(1-2): 290-299.
- Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., Nichols, P.D. 2011b. Lipid (energy) reserves, utilization and provisioning during oocyte maturation and early embryonic development of deepwater chondrichthyans. *Marine Biology* 158 (12): 2741–2754.
- Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., Nichols, P. 2010. Lipid composition and partitioning of deepwater chondrichthyans: inferences of feeding ecology and distribution. *Marine Biology*, 157: 1367-1384.
- Pethybridge, H.R., Parrish, C.C., Morrongiello, J., Young, J.W., Farley, J.H., Gunasekera, R.M., Nichols, P.D. 2015. Spatial patterns and temperature predictions of tuna fatty acids: tracing essential nutrients and changes in primary producers. *PloS one*, 10: e0131598.

- Pethybridge, H.R., Parrish, C.C., Bruce, B.D., Young, J.W., Nichols, P.D. 2014. Lipid, Fatty Acid and Energy Density Profiles of White Sharks: Insights into the Feeding Ecology and Ecophysiology of a Complex Top Predator. *PLoS ONE* 9(5): e97877.
- Poulakis, G.R. 2013. Reproductive biology of the Cownose Ray in the Charlotte Harbor estuarine system, Florida. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*. 2013, 5:159–73.
- Poulakis, G. R., Urakawa, H., Stevens, P. W., DeAngelo, J. A., Timmers, A. A., Grubbs, R. D., Frisk, A. T., Olin, J. A. 2017. Sympatric elasmobranchs and fecal samples provide insight into the trophic ecology of the smalltooth sawfish. *Endangered Species Research*, 32: 491-506.
- Rangel, B. S., Cruz, V. P., Rodrigues, A., Araujo, M. L. G., Oliveira, C., Foresti, F., Moreira, R. G. 2017. Sympatric and syntopic occurrence of cownose rays: Neonatal strategies for survival? *Journal of Applied Ichthyology*, 33: 542-545.
- Rangel, B.S., Rodrigues, A., Moreira, R.G. 2018. Use of a nursery area by cownose rays (*Rhinoptera*) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 16: e170089. DOI: 10.1590/1982-0224-20170089.
- Rubenstein, D. R., Hobson, K. A. 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5): 256-263.
- Sardenne, F., Chassot, E., Fouché, E., Ménard, F., Lucas, V., Bodin, N. 2016. Are condition factors powerful proxies of energy content in wild tropical tunas? *Ecological Indicators*, 71: 467-476.
- Sheridan, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 107: 495-508.
- Shiffman, D., Gallagher, A. G., Boyle, M. D., Hammerschlag-Peyer, C. M., Hammerschlag, N. 2012. Stable isotope analysis as a tool for elasmobranch conservation research: a primer for non-specialists. *Marine and Freshwater Research*, 63:635–643.
- Smith, J. W., Merriner, J. V. 1985. Food habits and feeding behavior of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, 8(3): 305-310.
- Speake, B.K., Thompson, M.B. 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comparative and Biochemistry Physiology A*. 127(4):453–467.
- Speers-Roesch, B., Treberg, J.R. 2010. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative and Biochemistry Physiology A*, 155:417–434.

- Speers-Roesch, B., Ip, Y. K., Ballantyne, J. S. 2006. Metabolic organization of freshwater, euryhaline, and marine elasmobranchs: implications for the evolution of energy metabolism in sharks and rays. *Journal of experimental biology*, 209(13): 2495-2508.
- Springer, S. 1967. Social organization of shark populations. In: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F., Rall, D.P. (ed) *Sharks, skates and rays*. John Hopkins Press, Baltimore, MD. p 149–74.
- Stevenson, R.D., Woods Jr, W.A. 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 1169-1190.
- Tilley, A., López-Angarita, J., Turner, J.R. 2013. Diet reconstruction and resource partitioning of a Caribbean marine mesopredator using stable isotope Bayesian modelling. *PloS one*, 8(11): e79560.
- Valls, E., Navarro, J., Barría, C., Coll, M., Fernández-Borràs, J., Rotllant, G. 2016. Seasonal, ontogenetic and sexual changes in lipid metabolism of the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) in deep-sea free-living conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 483: 59-63.
- Vaudo, J.J., Matich, P., Heithaus, M.R. 2010. Mother–offspring isotope fractionation in two species of placental sharks. *Journal of Fish Biology*, 77:1724–1727.
- Vooren, C.M., Lamónaca, A.F. 2004. The IUCN Red List of Threatened Species. *Rhinoptera brasiliensis*. e.T44595A10912274 [Internet] [cited 2017 Mar 10] The IUCN Red List of Threatened Species 2004. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T44595A10912274.en>.
- Vooren, C.M., Klippel, S., Galina, A.B. 2005. Os elasmobrânquios das águas costeiras da Plataforma Sul. In: Vooren, C. M., Klippel, S., editors. *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre: Igaré, pp. 113-20.
- Williams, M.J., Sutherland, W.H., McCormick, M.P., de Jong, S.A., Walker, R.J., Wilkins, G.T. 1999. Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology*, 33: 1050-1055.
- Wourms, J.P. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoology*, 17: 379-410.
- Wourms, J.P. 1981. Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishes. *American Zoology*, 21 :473-515.
- Yokota, L., Lessa, R.P. 2006. A nursery area for sharks and rays in northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75: 349–360.