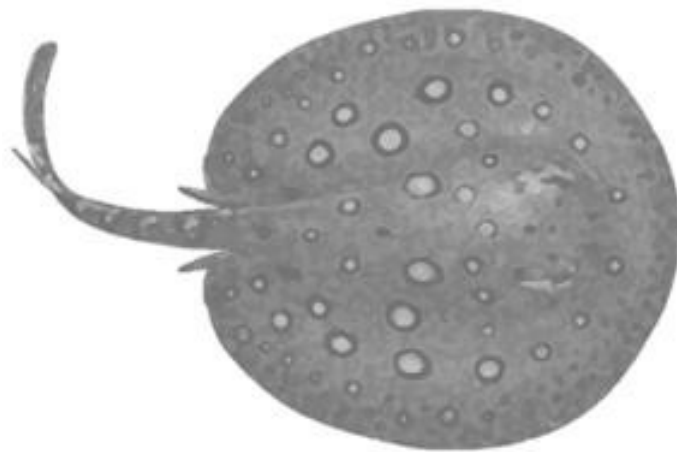


ARIADYNE SANTOS SOARES

Fisiologia do parto induzido por captura em  
*Potamotrygon amandae* (Elasmobranchii:  
Myliobatiformes: Potamotrygonidae)

"Physiology of capture-induced parturition in *Potamotrygon amandae* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)"



Ilha Solteira

2023

**EXEMPLAR CORRIGIDO**  
**ARIADYNE SANTOS SOARES**

Fisiologia do parto induzido por captura em *Potamotrygon amandae* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)

Physiology of capture-induced parturition in *Potamotrygon amandae* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Crístiele da Silva Ribeiro

Ilha Solteira

2023

## Ficha Catalográfica

---

Soares, Ariadyne Santos

Fisiologia do parto induzido por captura em *Potamotrygon amandae* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) / Ariadyne Santos Soares; Orientadora Profa. Dra. Crístiele da Silva Ribeiro -- São Paulo, 2023.

54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia).

1. Arraias dulciaquícolas. 2. Potamotrygoninae. 3. Fisiologia do Estresse. 4. Corpos Cetônicos. 5. Corticosterona. 6. Fisiologia da Conservação. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

*Crístiele S. Ribeiro*

### Comissão Julgadora

Profa Dra Crístiele da Silva Ribeiro (Orientadora)

Profa Dra Gabriela Brambila de Souza

Dra Bianca de Sousa Rangel

## Ata de defesa

---

**Prezado Prof. Antonio Carlos Marques**

Presidente da CPG do IB

Informo, no papel de presidente da comissão julgadora de defesa de dissertação de mestrado de ARIADYNE SANTOS SOARES, que o evento foi realizado por meio do Google Meet, no dia 19/12/2023. Segue abaixo a avaliação de cada um dos membros:

Profa. Crístiele da Silva Ribeiro – APROVADA

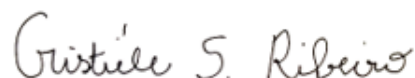
Dra. Bianca de Souza Rangel – APROVADA

Dra. Gabriela Brambila de Souza – APROVADA

Tendo em vista as avaliações acima, a aluna foi APROVADA

Solicito o registro do evento junto ao sistema Janus. Sem mais,

Profa. Dra. Crístiele da Silva Ribeiro (Presidente)



OBS: em caso de reprovação por algum dos membros, é necessário um breve parecer que será incluído na ata

**Dedico este trabalho:**

Aos meus pais Wagner e Socorro, por me incentivarem durante esta trajetória.

À minha avó Neide por sua enorme dedicação a mim.

Às minhas tias Magda e Elisangela por sempre estarem ao meu lado.

E aos animais eutanasiados, visto que sem eles este trabalho não seria possível.

...com muito carinho!

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Steve Jobs

## *Agradecimentos*

---

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*Agradeço primeiramente a Deus por me capacitar em mais essa etapa, como também pela força e proteção em todos os momentos.*

*À minha orientadora Crisiéle da Silva Ribeiro por trilhar junto comigo esta caminhada e confiar em mim quando nem eu mesma acreditava. Por todo ensinamento, paciência, conselhos, orientação, coletas de espécimes e ombro amigo! Serei sempre muito grata a tudo que compartilhamos durante esses anos, mas, principalmente pela forma doce, gentil e humana que você tem para ensinar e encantar a todos. A você muito respeito e admiração. Muito obrigada, Cris!*

*Ao doutorando Douglas Ribeiro por todo auxílio durante as coletas de espécimes e laboratório, pelos ensinamentos e dicas.*

*A minha banca do Comitê de Acompanhamento Prof. Dr. Vicente Vieira Faria e Dra. Gabriela Brambila de Souza por toda troca durante este percurso, sugestões e ensinamentos.*

*A minha banca do exame de qualificação Profs. Drs. Renata Guimarães Moreira Whitton, Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Alan Peres Ferraz de Melo por toda contribuição nesta etapa tão importante.*

*Aos professores do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelas disciplinas ministradas, com certeza foram muito importantes nessa trajetória e para minha formação!*

*A Bianca Rangel por toda contribuição ao longo desse trabalho. Não posso me esquecer que na minha primeira disciplina da pós você esteve em meu grupo do trabalho final e teve muita paciência e empatia comigo, uma vez que eu estava chegando nesse mundo do mestrado (e com muitos receios). Sem falar nos ensinamentos e dicas... Muito obrigada, Bianca!*

*Aos membros do Laboratório de Estudos em Fisiologia Animal (LEFISA) da UNESP de Ilha Solteira por todos os momentos compartilhados, ajuda e coleta de espécimes. Meu muito obrigada a todos!*

*À Guarda Municipal da cidade de Ilha solteira, especialmente ao Luiz e Fabiano, pelo auxílio e entusiasmo durante as coletas dos animais em campo.*

*Aos meus pais Wagner Soares e Maria Socorro dos Santos por todo apoio, amor e orgulho que sempre nutriram por mim. A minha avó Neide de Castro Soares por toda dedicação e amor e as minhas tias Magda Soares e Elisangela Soares por sonharem todos os meus sonhos comigo e estarem sempre prontas para me ajudar.*

*Aos amigos de longa data por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis.*

*Enfim, deixo aqui minha eterna e sincera gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui (ainda que não estejam mencionados).*

*Muito obrigada!*



## Sumário

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
Reprodução em Chondrichthyes	16
Ocorrência do parto induzido por captura	17
O eixo neuroendócrino do estresse	19
Espécie modelo	22
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
Tempo médio para parto induzido por captura	30
Biometria	31
Hematócrito	32
Lactato	33
Glicose	36
Corticosterona	38
Corpos cetônicos	40
Hipótese da inibição da relaxina	42
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>

## Lista de abreviações

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

CITES – Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN – International Union for Conservation of Nature

CD – Comprimento de disco

CT – Comprimento total

LD – Largura de disco

$\beta$ -HB -  $\beta$ -hidroxibutirato

## Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da rota de invasão de espécies na região do alto Rio Paraná.

Figura 2 – Fêmea adulta de *Potamotrygon amandae* Loboda & Carvalho, 2013.

Figura 3 – Localização geográfica da área de coleta. Alto rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP). Ponto 1: Ilha Solteira e Ponto 2: Ilha da Ferradura.

Figura 4 – Disposição das coletas e número de espécimes coletados por mês.

Figura 5 – Coleta de *Potamotrygon amandae* no Reservatório de Jupia- Alto Rio Paraná, Ilha Solteira-SP. Figura acima: barco utilizado nas coletas; figura abaixo à esquerda: lançamento de tarrafa; figura acima à direita: coleta de sangue da vasculatura caudal; figura abaixo à direita: fêmea de *P. amandae* e filhotes.

Figura 6 – Aferição de dados biométricos de *Potamotrygon amandae*, comprimento do disco (CD), largura do disco (LD) e comprimento total (CT).

Figura 7 – Pluviosidade e temperatura média na região de coleta.

Figura 8 – Filhotes de *Potamotrygon amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento, todos advindos de partos induzido por captura.

Figura 9 – Dados biométricos de fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP). A- Massa (g) e B- Largura de disco (cm). <sup>A,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas.

Figura 10 – Hematócrito (% de células vermelhas) de fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP).

Figura 11 – Concentração de lactato plasmático (mg/dL) em fêmeas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP). <sup>a,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas; <sup>\*\*</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre momentos de coleta.

Figura 12 – Concentração de glicose plasmática (mg/dL) em fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP).

Figura 13 – Concentração de corticosterona (pg/ml) em fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP).

Figura 14 – Exemplos de *Potamotrygon amandae* mostrando cicatrizes de cópula em toda a extensão do disco.

Figura 15 – Concentração de corpos cetônicos (mM) em fêmeas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupiá, Ilha Solteira/SP). <sup>a,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas; <sup>\*\*,\*</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$  e  $P < 0,05$ ) entre momentos de coleta.

## Resumo

As raias da Ordem Myliobatiformes são consideradas vivíparas, aplacentárias histotróficas. Nesta condição, são consideradas mais suscetíveis ao parto induzido por captura. Este fenômeno, embora seja uma consequência comum das interações pesqueiras com o grupo, ainda permanece pouco estudado. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a fisiologia do estresse na raia de água doce *Potamotrygon amandae* em eventos de parto induzido por captura. Fêmeas grávidas e não-grávidas foram coletadas no Rio Paraná (UHE Engenheiro Souza Dias) com o uso de tarrafas. Logo após a captura dos indivíduos realizou-se a coleta de sangue e os animais foram acondicionados em caixas plásticas. No caso de fêmeas grávidas, a segunda coleta de sangue foi realizada no momento do parto induzido e no caso de não-grávidas, no intervalo de 60 minutos. Os espécimes foram transportados vivos ao Laboratório de Estudos em Fisiologia Animal (LEFISA) da UNESP de Ilha Solteira para eutanásia e posterior aferição dos dados biométricos. Foram mensuradas e analisadas variáveis hematológicas (hematócrito); energéticas (glicose e corpos cetônicos), respiratória (lactato) e endócrina (corticosterona). O tempo médio para abortamento de filhotes foi de  $57,5 \pm 27,5$  minutos. A massa corpórea apresentou diferença significativa quando comparadas fêmeas grávidas e fêmeas não grávidas, com maiores valores para fêmeas grávidas. As células da linguagem vermelha do sangue não são responsivas ao estresse de captura, com amplitude média de 15 a 38% de hemácias. O lactato plasmático aumenta após evento de estresse de captura, com magnitude aumentada para fêmeas grávidas, podendo ser classificado como biomarcador do evento de estresse agudo da espécie. A corticosterona apresenta alta variação intraespecífica e não parece aumentar após a captura, além de não se diferenciar entre grávidas e não-grávidas. A glicose não apresenta responsividade à captura, o que mostra que este substrato não é preferencial durante o estresse agudo. Corpos cetônicos são a fonte energética preferencial para eventos de estresse agudo da espécie e sua utilização ocorre de forma mais lenta em fêmeas grávidas, com menor taxa de decaimento neste grupo, comparado com não-grávidas.

Palavras-chave: Abortamento. Arraias dulciaquícolas. Potamotrygoninae. Fisiologia do Estresse. Corpos Cetônicos. Corticosterona. Fisiologia da Conservação.

## **Abstract**

The stingrays of the order Myliobatiformes are considered viviparous, aplacental histotrophic. In this condition, they are considered more susceptible to capture-induced parturition. Although this phenomenon is a common consequence of fishing interactions with the group, it remains poorly studied. The aim of this study was to characterize the stress physiology in the freshwater stingray *Potamotrygon amandae* during induced parturition events by capture. Pregnant and non-pregnant females were collected from the Paraná River (UHE Engenheiro Souza Dias) using fish nets. Immediately after specimen capture, blood collection was performed, and the animals were placed in plastic boxes. In the case of pregnant females, the second blood collection was done at the time of induced parturition, and for non-pregnant females, it was done within a 60-minute interval. The specimens were transported alive to the Laboratório de Estudos em Fisiologia Animal (LEFISA) at UNESP for euthanasia and subsequent measurement of biometric data. Hematological (hematocrit), energetic (glucose and ketone bodies), respiratory (lactate), and endocrine (corticosterone) variables were measured and analyzed. The average time for fetal abortion was  $57.5 \pm 27.5$  minutes. Body mass showed a significant difference when comparing pregnant and non-pregnant females, with higher values for pregnant females. Red blood cells are not responsive to capture stress, with an average amplitude of 15 to 38% of erythrocytes. Plasma lactate increases after a capture stress event, with an increased magnitude for pregnant females, making it a biomarker of the acute stress event in the species. Corticosterone shows high intra-specific variation and does not seem to increase after capture, and it does not differ between pregnant and non-pregnant females. Glucose was not responsive to capture, indicating that this substrate is not preferred during acute stress. Ketone bodies are the preferred energy source for acute stress events in the species, and their utilization occurs more slowly in pregnant females, with a lower decay rate in this group compared to non-pregnant females.

Keywords: Abortion. Freshwater stingrays. Potamotrygoninae. Stress Physiology. Ketone Bodies. Corticosterone. Conservation Physiology.

## **Introdução e Justificativa**

As raias pertencem à classe dos Chondrichthyes, que é separada em duas subclasses: Subterbranchialia (Holocephali) que compreende as quimeras e Elasmobranchii, representada pelos tubarões e raias (RICHTER et al., 2000). São classificadas na Subdivisão Batoidea e na Ordem Myliobatiformes (LOVEJOY, 1996). Dentre as raias, há aquelas que são marinhas, estuarinas ou dulcícolas.

O grupo das raias exclusivamente dulcícolas compreende cerca de 42 espécies (FRICKE et al., 2023), que fazem parte da subfamília Potamotrygoninae e da família Potamotrygonidae, que está distribuída pela América do Sul e conta com quatro gêneros: *Potamotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Heliotrygon* (LAMEIRAS et al., 2019). Hoje a distribuição do grupo no Brasil inclui diferentes bacias nas cinco regiões do país (LOVEJOY et al. 2006; FONTENELLE, 2021).

A família Potamotrygonidae, é um grupo monofilético que compartilha especializações morfológicas e fisiológicas únicas, como a baixa concentração de ureia no sangue, redução da glândula retal (órgão envolvido na osmorregulação), captação ativa de eletrólitos pelos rins e brânquias, além de adaptações nas ampolas de Lorenzini. Estas características atribuem aos representantes da família controle ionorregulatório comparado aos peixes teleósteos de água doce, caráter estenoalino e hiperosmótico em relação ao ambiente (RASCHI; MACKANOS, 1989, TREBERG et al., 2006, DUNCAN, 2008, POUGH et al., 2008, SPEERS-ROESCH; TREBERG, 2010, LUCIFORA et al., 2015).

Até o final da década de 1970 e início da década de 1980, muitas espécies ainda não haviam colonizado a região do alto Rio Paraná (área de estudo deste trabalho), incluindo Potamotrigonídeos. A dispersão só foi possível devido à inundação do Salto de Sete Quedas, no Paraná, que até então funcionava como uma barreira geográfica natural entre as regiões do baixo e alto Rio Paraná, para a construção da Hidrelétrica de Itaipu (Figura 1). Atualmente as raias já se estabeleceram até a região de Ilha Solteira, onde desempenham papel de invasoras (LOVEJOY, 1996, CARVALHO et al., 2003, ARAÚJO et al., 2004, LASSO et al., 2014).

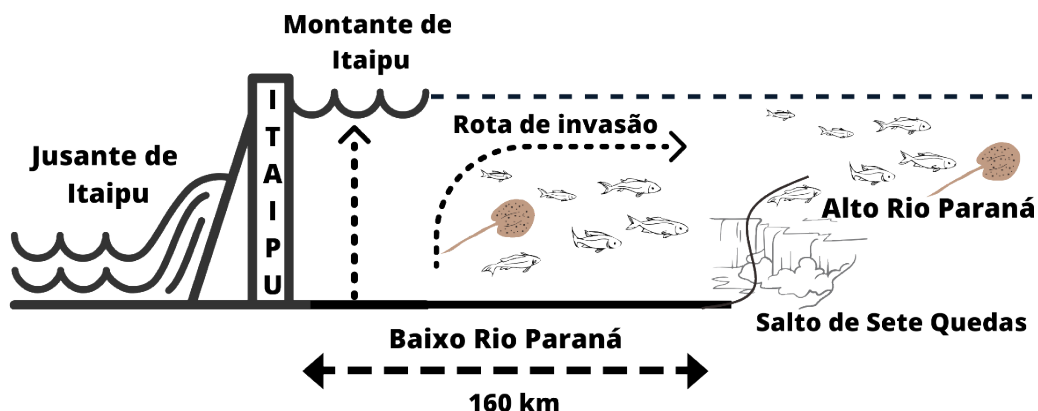


Figura 1 – Representação esquemática da rota de invasão de espécies na região do alto Rio Paraná. Fonte?

### *Reprodução em Chondrichthyes*

Parte do sucesso reprodutivo da Classe dos Chondrichthyes é atribuído a diversidade de modos reprodutivos e adaptações relacionadas a fisiologia reprodutiva (vale ressaltar que o grupo possui uma longa história de vida que remonta 400 milhões de anos). Todos os representantes apresentam como mecanismo de reprodução a fertilização interna, com machos que possuem cláspers pélvicos (pares de órgãos copulatórios) inserindo-os na cloaca da fêmea para a fertilização dos óvulos (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011).

Em relação aos modos reprodutivos do grupo encontra-se representantes ovíparos e vivíparos. As espécies ovíparas retêm seus ovos no interior da fêmea por um período de tempo variável até depositá-los em algum substrato para o desenvolvimento (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011). Viviparidade e relação materno-fetal longa e consistente surgem independentemente em várias linhagens em Chondrichthyes (DULVY et al., 2014), que retêm seus embriões no útero até o desenvolvimento completo. A viviparidade pode ser classificada como aplacentária ou placentária a depender da existência de uma placenta para conectar a fêmea e embrião (TOBERGTE; CURTIS, 2013).

Inúmeras espécies de raias são consideradas vivíparas, assim como muitas espécies de tubarões (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011). A família Potamotrygonidae é vivípara aplacentária, com todo o desenvolvimento dos fetos ocorrendo dentro do útero, inicialmente nutridos pelo conteúdo do saco vitelínico, com posterior nutrição advinda da



secreção de componentes advindos do trofonema, que nutrirão o embrião até o momento do parto (HAMLETT et al., 1993).

Estudos têm demonstrado que o ciclo reprodutivo destas espécies é intimamente relacionado com o ciclo hidrológico, uma vez que este desencadeia o início e influencia todos os estágios subsequentes; além disso potamotrigonídeos tem períodos reprodutivos bem definidos (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005). O período de reprodução é marcado por eventos consecutivos, podendo variar de acordo com a espécie observada. A maturação gonadal inicia o período reprodutivo, podendo levar de dois a quatro meses para ser completada; o período de acasalamento pode ocorrer durante a estação seca ou chuvosa; a fecundidade ovariana pode variar de um a onze oócitos; a fecundidade uterina de um a oito embriões e a gestação pode durar de três a quatro meses (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005).

A raia *Potamotrygon amandae* apresenta estágio de repouso ocorrendo entre os meses de fevereiro a maio, vitelogênese nos meses de maio a novembro e gravidez entre os meses de novembro a março (SPADA, 2021). A intrincada organização reprodutiva deste grupo de peixes resulta em maturação mais lenta e menor fecundidade.

### ***Impactos antrópicos e ocorrência de parto induzido por pesca***

O grupo dos Chondrichthyes é sensível e extremamente afetado por ações antrópicas, notadamente alterações climáticas, poluição dos mares e rios, destruição de biomas aquáticos e distúrbios nas águas podem afetar o ciclo de vida, assim como as taxas de natalidade e mortalidade, idade de maturidade sexual, tamanho, e outros índices populacionais (BECERRIL-GARCÍA et al., 2023).

Tubarões, raias e quimeras compartilham algumas características que os tornam sensíveis a pesca, como por exemplo, crescimento lento e maturação tardia (DULVY et al., 2014), altos níveis de investimento materno e longos períodos de gestação (ADAMS et al., 2018; CORTÉS, 2000; DULVY et al., 2014). Isso os torna consideravelmente mais vulneráveis à pressão de exploração do que os teleósteos (DAS; AFONSO, 2017). Embora a mortalidade por pesca direta seja preocupante, o parto induzido por captura tem grande efeito no sucesso reprodutivo destas espécies (ADAMS et al., 2018).

A pesca é a ação antropogênica que mais afeta o grupo, sendo responsável pelo declínio de 90% das populações com grande importância ecológica (WOSNICK et al., 2019). Apesar das raias de água doce não serem consideradas um recurso difundido da

pesca tradicional no Brasil (FERREIRA et al, 1998, GAMA, 2013), a crescente urbanização e aumento da população rural tem estimulado os pescadores comerciais a buscarem a pesca de raias como recurso alimentar, aumentando também o número destas espécies nas taxas de pesca, como indicado por GAMA (2013). O mesmo autor pontua o escalonamento da pesca ornamental de raias, tendo como foco principal a captura de jovens e neonatais, pois estes apresentam condições morfológicas mais perfeitas. Esse fato pode ser diretamente associado ao fenômeno de parto induzido por captura pois, como constatado por RANGEL et al. (2020), fêmeas maiores apresentavam uma tendência ao parto prematuro quando seus filhotes estavam em um estado avançado de desenvolvimento/crescimento (Figura 9), logo a busca por fêmeas gestantes maiores pode estar diretamente ligada à pesca ornamental.

O parto induzido por captura é descrito na literatura há bastaste tempo, porém ainda é um evento pouco estudado do ponto de vista fisiológico (ADAMS et al., 2018). Elasmobrânquios vivíparos são considerados particularmente sensíveis a este fenômeno, devido ao alto investimento materno que permite às fêmeas gestarem vários e grandes filhotes durante um longo período de gestação (HAMLETT et al., 2005; ADAMS et al., 2018), sendo as espécies incapazes de se reproduzir rápido o suficiente para compensar a pressão pesqueira e outros impactos antropológicos (GALLUCCI et al., 2006). Adams et al., (2018), em sua revisão bibliográfica acerca da prevalência do parto induzido por captura, constatou que a ordem que registrou mais eventos de parto induzido por captura foi a Myliobatiformes, seguida por Lamniformes e Squatiniformes.

Charvet-Almeida em 2001, em trabalho sobre ocorrência, biologia e uso de raias de água doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae*, constatou que todas as raias capturadas abortavam os embriões. O mesmo padrão de parto induzido por diferentes artes de pesca (espinhéis, arrasto e tarrafas) foi verificado por Duncan et al., (2015) nas espécies amazônicas *Paratrygon aiereba*, *P. iwamae*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi* e por Garrone- Neto em 2010, para *P. motoro* e *Potamotrygon falkneri* no alto Rio Paraná.

Um artigo recente publicado por nosso grupo de pesquisa aborda os efeitos das características biométricas no parto induzido por captura em *P. amandae*, que apresentou taxa de 100% de aborto durante as coletas, variando de estágios iniciais de gestação (presença de ovo) a estágios finais de gestação. Os embriões quase nunca sobreviveram, independentemente do estágio de desenvolvimento. Ademais, fêmeas maiores gestaram mais filhotes e por consequência, apresentaram a expulsão dos filhotes mais rapidamente

durante o final da gravidez. Tanto o aborto, como o parto induzido por captura são afetados por características reprodutivas importantes, tais como o tamanho da ninhada, tamanho materno e estágio de gestação (RANGEL et al., 2020).

O estresse parece ser o fator que induz o abortamento de filhotes nas raias de água doce uma vez que este evento ocorre logo após a captura e encalhe. Pouco se sabe sobre os efeitos fisiológicos e a mortalidade, imediata e pós-soltura, associada à captura e soltura em elasmobrânquios. A fisiologia do fenômeno de parto induzido por captura, além da reprodução dos grupos de tubarões e raias são fortemente influenciados pelo estresse, de modo que situações estressoras podem causar desordem no eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal e no hipotálamo-hipófise-gônadas, que são responsáveis pela regulação fisiológica da reprodução (AWRUCH, 2013).

### ***O eixo neuroendócrino do estresse***

O eixo neuroendócrino do estresse é conservado evolutivamente, tornando-o útil para ser utilizado como modelo para análise comparada da resposta ao estresse em vertebrados. O envolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal já é minuciosamente descrito em vários grupos, como nos mamíferos (GANESH, 2020). Em outros grupos animais, como nos peixes, este eixo é substituído pelo eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal (MOMMSEN et al., 1999), com as mesmas funções. O somatório das mudanças fisiológicas desencadeadas quando o organismo reage a desafios químicos, físicos e biológicos, adicionando-se à tentativa de compensação são comumente referidos como respostas ao estresse.

O estresse pode ser definido como uma condição em que a homeostase é ameaçada ou perturbada em decorrência da ação de estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos denominados estressores (SKOMAL; MANDELMAN, 2012). A ação destes estressores é dupla, produzem efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático e provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa, habilitando o animal a superar as ameaças. Além disso, o estresse é também classificado em estresse agudo ou crônico. O estresse agudo é resultante da rápida exposição a um estressor. Já o estresse crônico, advém da exposição contínua ao estressor (SKOMAL; BERNAL, 2010).

Durante uma resposta ao estresse são liberados dois grupos de hormônios: as catecolaminas e corticosteroides (ZANUZZO et al., 2019). As catecolaminas são aminas

ativas que possuem em sua estrutura o anel catecol, atuam como neurotransmissores e hormônios circulantes no controle do sistema nervoso central e autônomo (SILVA et al., 2007). Ademais, desempenham papel fundamental na mobilização de substratos energéticos para o sistema nervoso central e tecido muscular durante a reação de estresse, como também, na inibição de captação de glicose por tecidos cuja função não é essencial durante a exposição ao estressor (CHROUSOS, 1998).

Os corticosteroides são subdivididos em glicocorticoides e mineralocorticoides, sintetizados pelas porções externas da glândula adrenal, córtex adrenal, ou por seu homólogo no tecido inter-renal. Os glicocorticoides podem influenciar o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, e seu papel principal parece estar ligado à utilização periférica da glicose. Adicionalmente, os mineralocorticoides afetam o transporte de sódio e potássio nos néfrons renais, agindo na homeostase iônica (CHARMANDARI et al., 2005; NORRIS, 2007).

Quanto ao eixo completo temos que, quando há um agente estressor, o indivíduo fica em estado de alerta, caracterizado pela liberação de catecolaminas e o hormônio liberador de corticotropinas (CRH), sintetizados no hipotálamo. O CRH age na adenohipófise, é reconhecido por receptores e desencadeia a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Por fim, o ACTH chega a glândula inter-renal ou adrenais, através da corrente sanguínea, ocasionando produção e liberação dos corticosteroides e mineralocorticoides (ROBERTS, et al., 2014; FULLER et al., 2020).

Em mamíferos, hormônios esteroides distintos regulam o equilíbrio hidromineral e a resposta ao estresse (NORRIS, 2007). Em contraste, pensa-se que teleósteos e elasmobrânquios utilizam apenas um único esteroide para regular ambos os processos. No caso dos peixes cartilagosos, estas funções aparentemente são desempenhadas pela 1- $\alpha$ -hidroxycorticosterona (EVANS, 2008), enquanto no grupo dos peixes teleósteos, o corticosteroide usado para medição da resposta primária ao estresse é o cortisol. Algumas espécies de elasmobrânquios também demonstraram produzir corticosterona, porém sem um papel bem definido relacionado ao estresse (MANIRE et al., 2007)

A 1- $\alpha$ -hidroxycorticosterona foi isolada e caracterizada por Idler e Truscott em 1966. Não se tem ainda uma definição sobre sua ação fisiológica, mas associa-se à perda de ureia plasmática e retenção de sódio em algumas espécies de elasmobrânquios (ARMOUR et al., 1993), é produzida e secretada pela inter-renal. Sua liberação é estimulada por níveis elevados do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que integra o eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal. Após situações estressoras os níveis plasmáticos de

1- $\alpha$ -hidroxicorticosterona aumentam, juntamente com a glicólise e gliconeogênese, em tecidos que demandam energia na primeira hora de exposição ao estressor (RUIZ-JARABO, et al., 2019). Tanto o eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal quanto este hormônio são pouco estudados até o momento (SKOMAL; MANDELMAN, 2010).

A resposta ao estresse em elasmobrânquios é integrada e ocorre em uma cascata semelhante à dos outros vertebrados, embora os mecanismos compensatórios e respostas sejam variáveis (SKOMAL; MANDELMAN, 2012), e classifica-se a resposta ao estresse em três níveis: primário, secundário e terciário (MAZEAUD et al., 1997). A resposta primária do estresse é neuroendócrina e associada a rápidos aumentos nos níveis circulantes de catecolaminas (SKOMAL; MANDELMAN, 2012), que acarretam uma série de alterações na concentração sanguínea da glicose, lactato, osmolalidade e pH (FULLER et al., 2020). Adicionalmente, logo nos primeiros momentos, em resposta ao estresse agudo, as catecolaminas são secretadas e conferem mudanças nas funções cardiorrespiratórias (SKOMAL; MANDELMAN, 2012), com o intuito de manter os níveis adequados de substratos energéticos e fornecer oxigênio durante a exposição ao estresse e recuperação metabólica (RANDAL; PERRY, 1992).

A resposta secundária pode ocasionar um estresse crônico, que pode ter efeitos terciários e originar mudanças no comportamento, crescimento, reprodução e aumento da suscetibilidade a doenças, podendo acarretar graves consequências a nível populacional (SKOMAL, 2007). Alguns indicadores da resposta secundária são metabólitos como a glicose e o lactato (SKOMAL; MANDELMAN, 2012; GALLELGHER et al., 2014; OTWAY, 2015) e parâmetros hematológicos, como por exemplo, o hematócrito, que pode aumentar em resposta ao estresse (MANDELMAN; FARRINGTON, 2007). Os efeitos secundários do estresse dependem da duração e da natureza do(s) estressor(es) envolvidos e influenciados pelo contato íntimo entre o sangue, as células e/ou tecidos metabolicamente ativos (em todo o corpo), e o ambiente (através dos rastros branquiais e sistema respiratório).

O estresse de captura é o principal fator que induz o parto prematuro/aborto no grupo dos elasmobrânquios. Este distúrbio pode ser causado, por exemplo, por traumas físicos (arpões, lesões), asfixia, encalhe ou administração de anestésicos. Vale ressaltar que as respostas variam de acordo com a espécie observada (ADAMS et al., 2018). O aborto corresponde também a uma grande perda de investimento materno e ainda não se sabe ao certo a magnitude do efeito sobre as populações, tampouco as causas deste fenômeno, no entanto, atribui-se ao estresse de captura, devido a constatações de

alterações na química do sangue, desequilíbrio osmótico, aumento da concentração de combustíveis metabólicos e metabolismo anaeróbico em espécies congênicas (RANGEL et al., 2020).

### ***Espécie modelo***

*Potamotrygon amandae*, descrita por Loboda e Carvalho, (2013) (Figura 2), conhecida popularmente como raia-comum e raia-de-fogo, se encontra distribuída nos sistemas de água doce na América do Sul, incluindo rios da Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (LASSO et al., 2016, LOBODA; CARVALHO, 2013). A espécie apresenta coloração dorsal predominantemente cinzenta ou castanho escuro, a maioria dos espécimes apresentam ocelos bicolors com uma mancha central branca, cinza clara ou amarela claro, cercado por um anel preto, enquanto a coloração ventral é predominantemente cinzenta, cobrindo quase todo o disco ventral. Adicionalmente, apresenta denticulos dérmicos pequenos em forma de estrela, espalhada por toda a região dorsal do disco (LOBODA; CARVALHO, 2013, LASSO et al., 2016, RAMOS, 2017).

Pagliarini et al., (2020) classificou a espécie como sendo onívora com tendência a carnívora, com grande plasticidade alimentar no Rio Paraná, estado de São Paulo, com detrito e fragmento de peixe como itens principais da dieta destes animais. Além disso, é descrito um alto consumo de animais bentônicos, fato que se relaciona com as táticas de forrageamento, uma vez que com o movimento ondulatório do disco o animal agita o substrato, proporcionando a formação de nuvens de poeira que são atrativos para algumas espécies de ciclídeos, demonstrando que esta espécie possui alta capacidade de exploração de recursos no ambiente, como constatado por Lonardoni et al., (2006).



Figura 2 – Fêmea adulta de *Potamotrygon amandae* Loboda & Carvalho, 2013.

O Programa de Biologia do Instituto de Pesquisa de Recursos Biológicos Alexandre von Humboldt (IAvH) propôs em 2012 a inclusão de espécies de raias de água doce no status de “provavelmente em perigo” no apêndice III da CITES (Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestre), devido à escassez de estudos com o grupo, visando mitigar uma possível superexploração, regulamentação do comércio e tentativa de converter a pesca ornamental em atividade sustentável, visto que o principal impacto das raias dulciaquícolas deriva de sua relevância como peixes ornamentais, alimentos e também advindos de impacto na saúde pública (LASSO et al., 2016). A partir da data de inclusão na lista da CITES, em 2017, para a exportação de raias do gênero *Potamotrygon* será exigida a licença CITES outorgada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a não observância poderá acarretar multa e apreensão dos espécimes (SPADA, 2021). Ademais, a espécie é classificada na Lista Vermelha da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) como “Data Deficient”, ou seja, sem dados suficientes para classificação do estado de conservação.

*Potamotrygon amandae* foi escolhida devido a disponibilidade de captura, uma vez que já vem sendo estudada por colaboradores do nosso grupo de pesquisa com trabalhos acerca de aspectos parasitológicos, histomorfológicos, hormonais e biologia reprodutiva, não havendo até o momento nenhum trabalho investigando a fisiologia do parto induzido por captura nesta espécie, tampouco para o gênero *Potamotrygon*. Além disso, poucos estudos têm abordado o fenômeno de abortamento de filhotes em espécies dulciaquícolas, de modo que a maior parte das pesquisas se concentram em espécies marinhas, apesar de ser consequência comum das interações pesqueiras com o grupo.

## **Objetivos**

### ***Objetivo geral***

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a fisiologia do estresse na raia de água doce *Potamotrygon amandae* em eventos de abortamento/parto induzido por captura.

### ***Objetivos específicos***

- ✓ Analisar variáveis hematológica (hematócrito); energéticas (glicose e corpos cetônicos), respiratória (lactato) e endócrina (corticosterona) em fêmeas adultas de *P. amandae* em diferentes momentos do ciclo reprodutivo, testando se respostas primárias e secundárias de estresse atuam nos eventos de abortamento e/ou parto induzido por captura;
- ✓ Comparar variáveis hematológicas, energéticas e endócrinas entre fêmeas de *P. amandae* grávidas e não grávidas;
- ✓ Avaliar variáveis hematológicas, energéticas e endócrinas em fêmeas de *P. amandae* durante o evento de abortamento/parto, visando descrever os possíveis gatilhos para este evento drástico;
- ✓ Comparar variáveis hematológicas, energéticas e endócrinas entre fêmeas de *P. amandae* sob efeito da captura e após 60 minutos da captura.



## Material e Métodos

### *Área de trabalho e métodos de coleta*

As coletas de fêmeas de *Potamotrygon amandae* foram realizadas entre novembro de 2020 e setembro de 2022, à montante do Reservatório da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias (Reservatório de Jupuíá- 20°23'03.9"S 51°21'19.8"W), localizado no município de Ilha Solteira-SP (Figura 3). A figura 4 mostra a distribuição de coletas e número de espécimes.



Figura 3 – Localização geográfica da área de coleta. Alto rio Paraná (reservatório de Jupuíá, Ilha Solteira/SP). Ponto 1: Ilha Solteira e Ponto 2: Ilha da Ferradura.

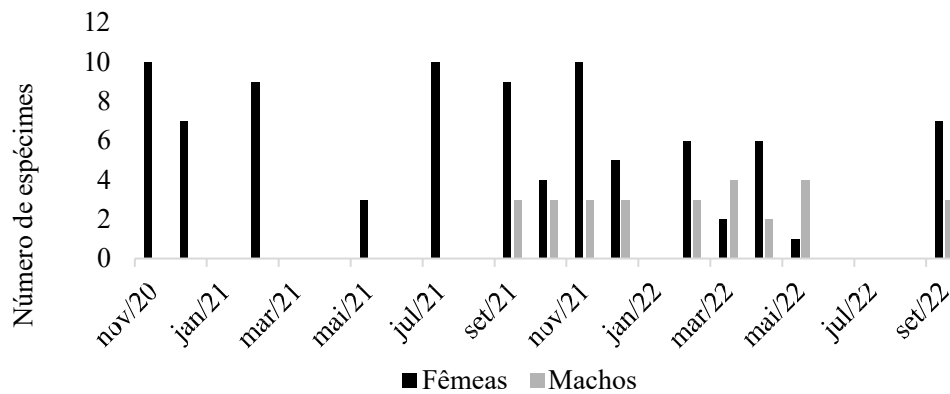


Figura 4 – Disposição das coletas e número de espécimes coletados por mês.

Os animais foram capturados utilizando-se tarrafas como arte de pesca. O esforço amostral em cada coleta foi de 5 horas (autorização SISBIO 72788-1, CEUA-FEIS 15/2016 e 03/2021 e cadastro SisGen A001CBE).



Figura 5 – Coleta de *Potamotrygon amandae* no Reservatório de Jupiá- Alto Rio Paraná, Ilha Solteira-SP. Figura acima: barco utilizado nas coletas; figura abaixo à esquerda: lançamento de tarrafa; figura acima à direita: coleta de sangue da vasculatura caudal; figura abaixo à direita: fêmea de *P. amandae* e filhotes.

Após a captura foi realizada a primeira coleta de sangue, com o uso de seringas heparinizadas. No caso de fêmeas grávidas a segunda coleta foi realizada no momento do abortamento e/ou parto de filhotes; já para as fêmeas não grávidas, a segunda coleta foi realizada no intervalo de uma hora após a captura (60 minutos pós captura).

Os indivíduos foram anestesiados com Eugenol  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  por via respiratória, individualizados em caixas de polietileno e transportados vivos para o Laboratório de Estudos em Fisiologia Animal (LEFISA) UNESP/Ilha Solteira, onde foram aferidos os dados biométricos (massa do animal, comprimento de disco (CD), comprimento total (CT), largura de disco (LD)). Após aferição dos dados biométricos, os exemplares foram eutanasiados por congelamento e necropsiados.

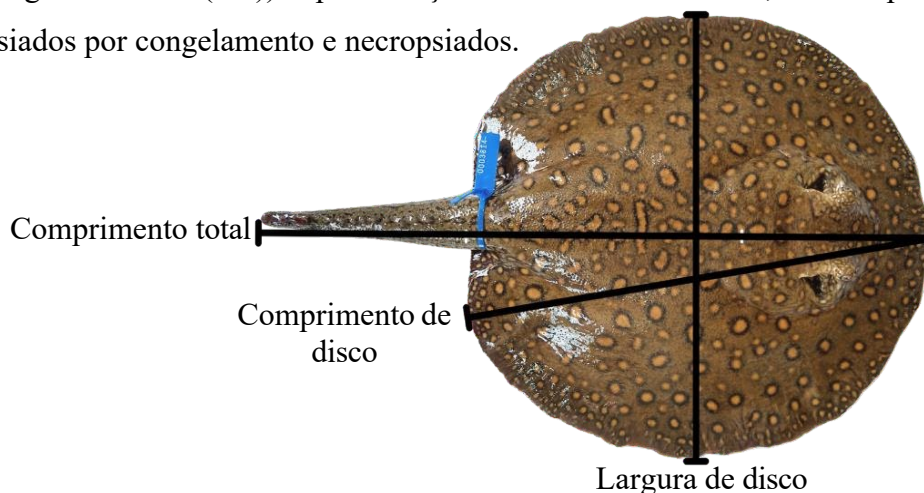


Figura 6 – Aferição de dados biométricos de *Potamotrygon amandae*, comprimento do disco (CD), largura do disco (LD) e comprimento total (CT).

### ***Pluviosidade e temperatura***

De forma geral, no local de coleta, o outono e o inverno correspondem a época de seca e a primavera e o verão a época chuvosa. Em 2021 a temperatura teve média anual de  $25,41^{\circ}\text{C} \pm 2,36$  e em 2022 de  $24,74^{\circ}\text{C} \pm 2,26$ . A média anual pluviométrica de 2021 foi de  $72,11 \text{ mm} \pm 83,26$  e de 2022 de  $98,61 \text{ mm} \pm 82,36$ . Os meses chuvosos foram outubro, novembro, dezembro, fevereiro e março de 2022; e os de seca julho e setembro de 2021 e abril, maio e setembro de 2022 (Figura 7). Os dados de temperatura e pluviosidade foram adquiridos na Rede Agrometeorológica do Noroeste Paulista (<http://clima.feis.unesp.br/>).

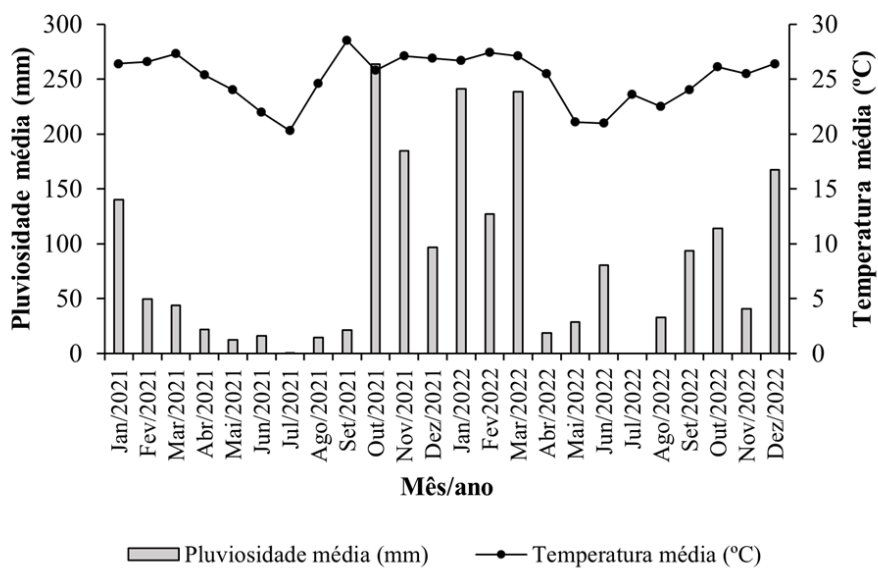


Figura 7 – Pluviosidade e temperatura média na região de coleta. Dados provenientes da Rede Agrometeorológica do Noroeste Paulista (Canal Clima – UNESP/Ilha Solteira).

### *Análises laboratoriais*

Com as amostras de sangue total, realizou-se a análise de hematócrito. O sangue foi transferido para tubos microcapilares e centrifugados a 12.000 rotações por minuto durante 5 minutos. Os resultados foram calculados em relação a porcentagem de células vermelhas presentes na amostra (Goldenfarb et al., 1971)

O sangue total foi centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) para a separação do plasma; este foi removido dos tubos com auxílio de pipeta Pasteur, acondicionado em criotubos de 2ml e congelados imediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras de plasma foram descongeladas para quantificação da glicose, lactato, corpos cetônicos e corticosterona.

Foram quantificados o hormônio corticosterona e o substrato energético beta hidroxibutirato ( $\beta$ -HB) utilizando-se kits da marca Cayman Chemicals; glicose e lactato foram quantificados utilizando kits da marca Labtest. As leituras de placas foram realizadas em leitora de microplacas ELISA (Spectra Max 250, Molecular Devices).

### *Análises estatísticas e nomenclatura*

Todos os valores serão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foi aplicado teste de Normalidade Shapiro-Wilk em todas as comparações. Após atestada a normalidade os dados, estes foram comparados utilizando-se o Teste t-pareado para mesmos espécimes:

momento da coleta x após 60 minutos ou momento do aborto, e o Teste t para comparações entre grupos diferentes: fêmeas grávidas x fêmeas não grávidas. Foi adotado o nível de significância 0,05. Para isso, utilizou-se o programa SigmaStat 3.1. Para estatística descritiva foi utilizado Microsoft Excel (2021).

Neste trabalho optamos por organizar os dados gráficos nomeando os eventos abortamento/ parto induzido por captura como aborto, por não ser objetivo deste desenvolver análises que levem em conta a prole, e sim as fêmeas adultas e eventos relacionados ao estresse pós captura. Apesar disso, é importante ressaltar que segundo Adams et al. (2018), o aborto considera a expulsão de embriões antes que estes pudessem sobreviver fora do útero, e o parto prematuro ocorre quando os filhotes expulsos podem sobreviver.

## Resultados e Discussão

### *Tempo médio para parto induzido por captura*

Nossos resultados demonstraram que o tempo médio para abortamento de filhotes e/ou parto induzido por captura foi de  $57,5 \pm 27,5$  minutos. O parto induzido por captura foi registrado em todas as fêmeas grávidas, independente do estágio de gestação (desde ovos até filhotes sem saco vitelínico- Figura 8), o que está de acordo com outros trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa (RANGEL et al., 2020 e SPADA, 2021).

Wosnick et al., (2019) em seu trabalho sobre os impactos da pesca na reprodução da raia viola (*Zapteryx brevirostris*), encontrou taxa de 100% de abortamento de filhotes, com fêmeas grávidas abortando seus embriões principalmente nas primeiras horas a até aproximadamente 10 horas após a captura. Adams e colaboradores em revisão de 2018 acerca da prevalência de partos induzidos por captura em 88 espécies de raias, tubarões e quimeras, mostrou que o processo acomete de 2 a 85% de fêmeas vivíparas grávidas.

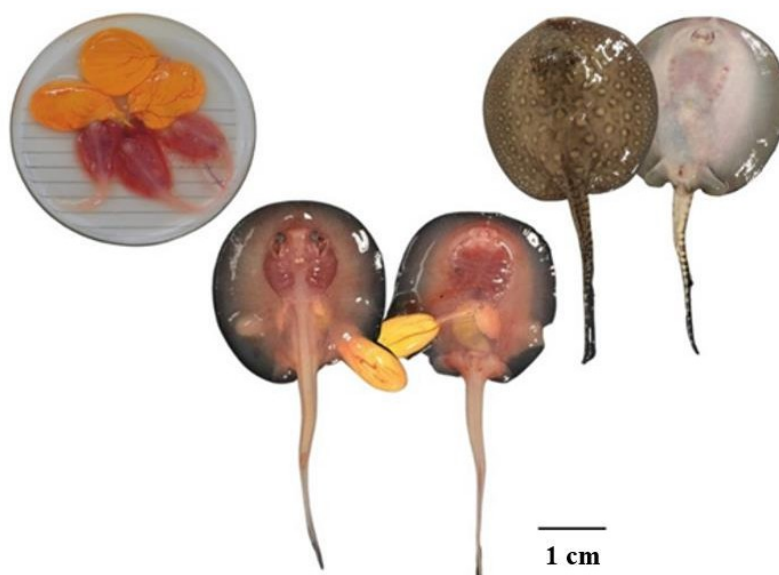


Figura 8 – Filhotes de *Potamotrygon amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento, todos advindos de partos induzido por captura.

## Biometria

Em relação aos dados biométricos de *P. amandae*, somente a massa apresentou diferença significativa quando comparadas fêmeas grávidas e fêmeas não grávidas. A largura de disco não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 9).

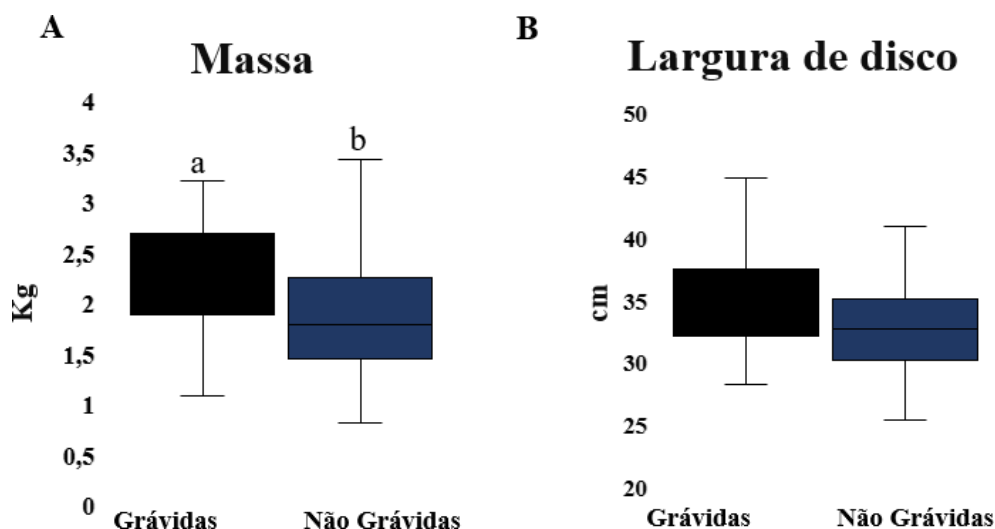


Figura 9 – Dados biométricos de fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupiá, Ilha Solteira/SP). A- Massa (g) e B- Largura de disco (cm). <sup>A,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas.

A espécie modelo deste trabalho é considerada vivípara, aplacentária e histotrófica; de modo que os embriões são mantidos no útero até seu completo desenvolvimento. Este fato ocasiona o aumento da massa corpórea da fêmea no período gestacional, como também uma série de modificações morfológicas na estrutura uterina, (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011). Ademais, espécimes no período reprodutivo de *P. amandae* são facilmente identificadas pela distensão abdominal (RANGEL et al., 2020), ocasionada pela alocação dos filhotes e investimento materno, fato que justifica a maior massa encontrada em fêmeas grávidas neste trabalho.

De acordo com Guida et al., (2017) em um estudo que analisou os efeitos do estresse em fêmeas grávidas e recém-nascidos da raia *Trygonorrhina dumerilii*, as fêmeas tendem a ser mais pesadas no momento do parto com posterior redução da massa corpórea no pós-parto.

### ***Hematócrito***

A análise de hematócrito de fêmeas grávidas no momento da coleta e no momento do aborto, e em fêmeas não grávidas na coleta e após uma hora, não apresentaram diferenças significativas quando comparados (Figura 10), com amplitude média de 15 a 38% de hemácias.

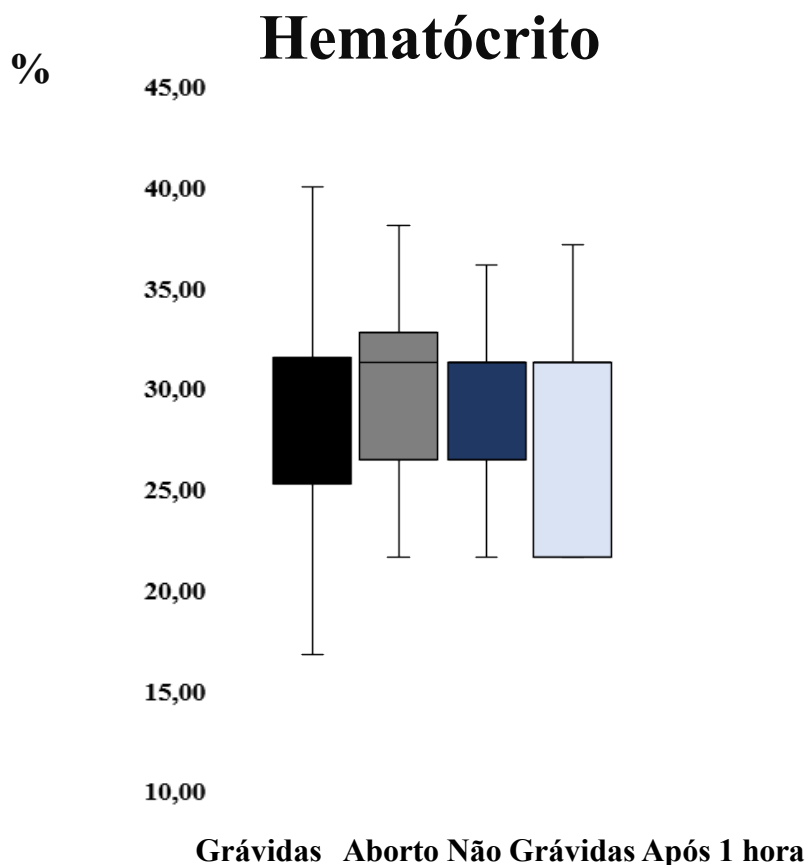


Figura 10 – Hematócrito (% de células vermelhas) de fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP).

Algumas variáveis sanguíneas como hematócrito e hemoglobina são consideradas indicadores auxiliares de resposta ao estresse (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Em algumas espécies de teleósteos, sob efeito estimulador das catecolaminas e cortisol, ocorre aumento na demanda de oxigênio nos tecidos (MORGAN; IWANA, 1996), exigindo, assim, rápida diferenciação e proliferação de eritrócitos. A falta de alterações significativas nas variáveis sanguíneas, aqui demonstrado pelos valores de hematócrito, pode indicar que as raias de água doce, bem como outras espécies de elasmobrânquios, respondem de maneira diferente à síndrome do estresse geral observada em teleósteos de água doce (BRINN et al., 2012, MORRISON et al., 2015).



Nossos resultados acerca deste parâmetro sanguíneo corroboram com a literatura existente. Elasmobrânquios geralmente não apresentam aumentos significativos de hematócrito após exercícios exaustivos ou eventos de estresse, mas sim pequenos acréscimos (de 10% ou menos) (SCHWIETERMAN et al., 2021; BRILL et al., 2008).

Um estudo realizado com tubarões *Rhizoprionodon terraenova* não exibiu alteração de hematócrito durante o evento de estresse de 60 minutos (HOFFMAYER; PARSONS, 2001). Cicia et al., (2012) também não encontraram diferenças para este parâmetro para a raia *Leucoraja erinacea* em todos os tratamentos do estudo: 0, 15 e 50 minutos de exposição aérea. Uma hipótese para esta resposta é que o tempo de alostase para esta variável seja maior que 60 minutos, período para que estas espécies mobilizem ou eliminem glóbulos vermelhos circulantes em um grau observável, ou que o estressor não foi relevante para desencadear a alostase (HOFFMAYER et al., 2012). Do mesmo modo, neste trabalho, o intervalo entre duas amostragens de sangue equivale a 60 minutos em média, o que pode nos sugerir que o tempo não tenha sido suficiente para mobilização de glóbulos vermelhos em *P. amandae*, como ocorre em algumas espécies de tubarões e raias.

### ***Lactato***

Do mesmo modo, também foram encontradas diferenças significativas quando comparadas fêmeas não grávidas após uma hora do momento da coleta e fêmeas grávidas no momento do aborto, com maiores valores de lactato amostrados no momento do aborto em todas as comparações (Figura 11). O ato de captura e manejo em algumas espécies de elasmobrânquios resulta em um conjunto de respostas fisiológicas, dentre estes o aumento dos níveis de lactato. Sabe-se que altos níveis deste componente podem ser indicativos de graves perturbações fisiológicas, que em casos extremos pode influenciar a capacidade de sobrevivência após um evento de estresse (MARSHALL et al., 2012). Neste trabalho o lactato plasmático mostrou-se responsivo ao estresse de captura, e foi significativamente diferente quando comparados os dois momentos de amostragens em fêmeas grávidas.

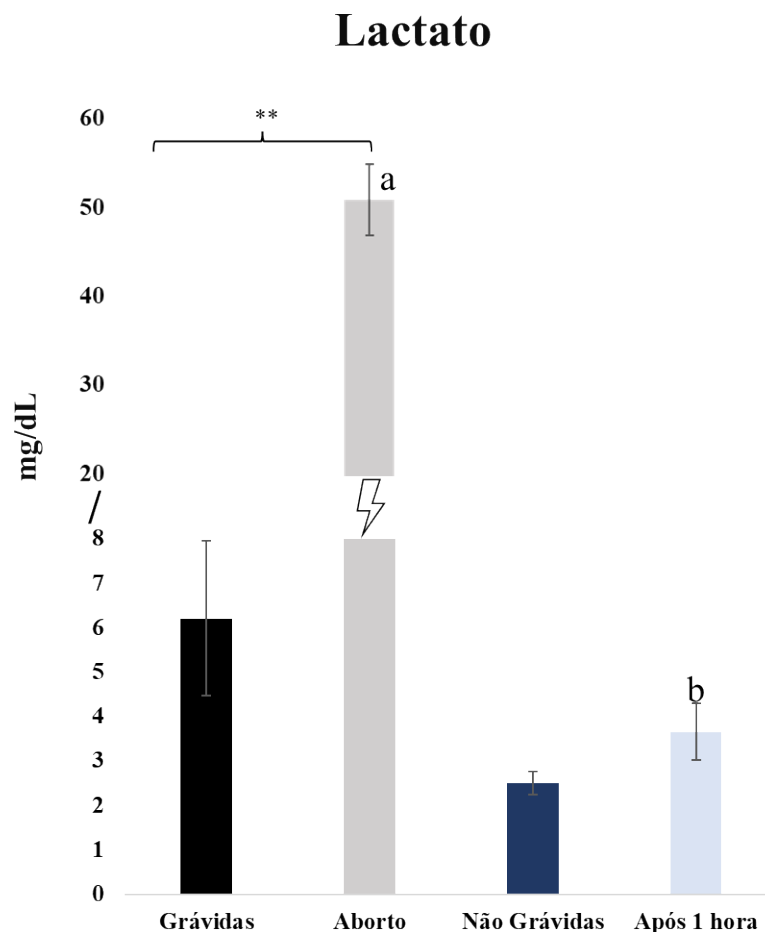


Figura 11 – Concentração de lactato plasmático (mg/dL) em fêmeas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupiá, Ilha Solteira/SP). <sup>a,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas; <sup>\*\*</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre momentos de coleta.

O sistema cardiorrespiratório de elasmobrânquios não é considerado totalmente eficaz em atender às demandas de oxigênio durante exercícios extenuantes (BRILL et al., 2008), conseqüentemente, uma fração considerável da demanda de energia é atendida anaerobicamente, resultando no aumento dos níveis de lactato sanguíneo e acidose metabólica (aumento de lactato e diminuição do pH e bicarbonato) (WOOD, 1991; BRILL et al., 2008; GALLAGHER et al., 2014 e WEBER et al., 2020). A elevação de lactato ao longo do tempo indica que o estressor agudo de captura resultou em uma mudança para respiração anaeróbica, resultando no acúmulo de lactato como subproduto (FULLER et al., 2020). A mudança para o metabolismo anaeróbico foi demonstrada por

Cicia et al., (2012), em estudo com a raia *L. erinacea*, através dos altos índices de lactato encontrados após desafio de anóxia.

Fuller et al., (2020) encontraram maiores concentrações de lactato em 45 e 60 minutos após a captura utilizando-se espinhéis. Isso foi descrito também em *R. terraenova* (HOFFMAYER; PARSONS, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Mandelman e Farrington (2007), em estudo sobre estado fisiológico e mortalidade após a captura, transporte e manutenção em cativeiro de *S. acanthias*, obtendo níveis moderados de lactato após a captura de arrasto, aumentando significativamente durante o transporte. Do mesmo modo, níveis elevados de lactato foram observados em *Mustelus antarcticus* três horas após a captura, retornando aos valores basais 24 horas após o evento de estresse (FRICK et al., 2012).

Rangel, et al., (2021), mostrou para *Rhinoptera bonasus* e *Aetobatus narinari* aumento significativo de valores de lactato em protocolo de manejo repetitivo, demonstrando aumento consistente na concentração de lactato ao longo do curso do estressor. De acordo com Weber et al., (2020) todos os tubarões capturados apresentaram acidose metabólica durante a luta na linha, porém a acidose observada foi agravada por um componente respiratório (aumento de pCO<sub>2</sub>) em animais retirados da água durante o manejo.

Wosnick et al., (2018) obteve resultados interessantes acerca deste parâmetro, as concentrações plasmáticas de lactato foram maiores em fêmeas que morreram após abortos consecutivos em comparação com fêmeas que sobreviveram aos abortos e fêmeas não grávidas. Em um estudo de captura e soltura de tubarões azuis (*Prionace glauca*), o lactato emergiu como um dos melhores indicadores de mortalidade, de acordo com Moyes et al., (2006). Gallagher et al. (2014), em cinco espécies de tubarões analisados entre o momento de captura e pós morte, mostrou valores aumentados de lactato, concomitantes ao aumento de pCO<sub>2</sub> e pH.

A magnitude de aumento de lactato em fêmeas grávidas após o aborto neste trabalho foi de 8 vezes em média do momento da coleta para o momento do parto, em contraste com um aumento de uma vez em fêmeas não grávidas, temos, portanto, que o lactato pode ser um resultado da intensa contração da musculatura lisa uterina e expulsão dos filhotes em fêmeas grávidas, já que é conhecido que a contração do músculo liso é caracterizado pela produção e liberação substanciais de ácido láctico, mesmo sob condições aeróbicas normais (BARRON; PARRILLO, 1995). O questionamento paira,

portanto, na ordem de acontecimentos, o lactato aumenta e a musculatura lisa uterina se contrai? Ou a musculatura lisa se contrai e os níveis deste subproduto aumentam?

### ***Glicose***

Em geral, um evento de estresse resulta em níveis crescentes de catecolaminas que por sua vez desencadeiam a glicogenólise, levando à hiperglicemia (WELLS et al., 1986). O início da mobilização da glicose parece acontecer antes do acúmulo de lactato no sangue (WELLS et al., 1986) e sugere que a mobilização de glicose pode ser indispensável para a sobrevivência. Este metabólito aumenta com eventos de estresse mais longos (SKOMAL e BERNAL, 2010; SKOMAL e MANDELMAN, 2012). Os níveis de glicose plasmática neste trabalho não se alteraram entre os grupos analisados, com amplitude média de 20 a 35 mg/dL (Figura 12). Apesar da ausência de diferença estatística, as médias no segundo momento de coleta mostraram-se maiores para os dois grupos amostrados.

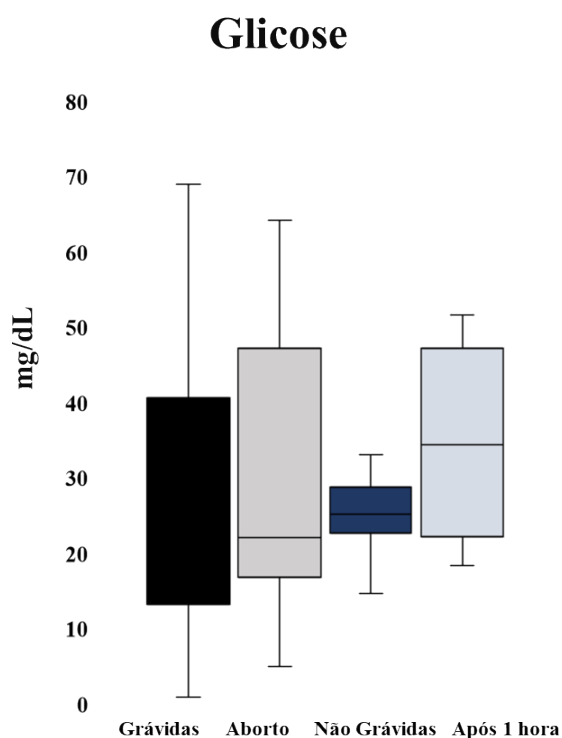


Figura 12 – Concentração de glicose plasmática (mg/dL) em fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupia, Ilha Solteira/SP).

Marshall et al., (2012) em seu trabalho sobre os indicadores de estresse em 11 espécies de tubarões capturados com espinhel, descreveu que *Alopias pelagicus* apresenta

maiores níveis de glicose quando comparado com as demais espécies, e *P. amandae* amostrada neste estudo (com média de 10,6 nmol/L comparado com média de 5,7 nmol/L nas outras espécies e 1,94 nmol/L para *P. amandae*). A espécie *A. pelagicus*, em geral, caracteriza-se por ser agressiva quando capturada, exibindo lutas intensas na linha e alto escopo metabólico para suportar essas atividades de natação (DICKSON et al., 1996; BERNAL et al., 2003; HEBERER et al., 2010). Os altos níveis de glicose nesta espécie podem ser reflexo da demanda geral de glicose proveniente do tempo de luta na linha, mas, alternativamente, também pode refletir um maior alcance metabólico (MARSHALL et al., 2012). Os níveis médios observados em *P. amandae* neste estudo foi 1,94 mmol/L, o que mostra grande passividade da espécie durante o estresse agudo de captura.

A variação interespecífica também deve ser levada em conta, Rangel et al., (2021) apresentou dados de concentração de glicose em quatro espécies de raias marinhas coletadas acidentalmente no litoral do sudeste brasileiro, e encontrou valores variando entre 40 e 60 mg/dL, valores maiores do que os encontrados para *P. amandae* em nossas observações, e bastante variadas entre as espécies coletadas por Rangel e colaboradores. Adicionalmente, assim como a grande variação intraespecífica encontrada para *P. amandae*, as espécies *R. bonasus* e *Rhinoptera brasiliensis* amostradas por Rangel mostraram grande variação individual para a concentração deste substrato.

Cicia et al., (2012) em estudo sobre as variações na resposta fisiológica ao estresse a exposição aérea na raia *L. erinacea*, encontrou resultados muito semelhantes aos obtidos neste estudo, uma vez que a exposição aérea nos dois primeiros tratamentos (0 e 15 minutos) não mostraram alterações, e somente com 50 minutos de exposição ao ar, os níveis de glicose se elevaram. Considerando nossos resultados, fêmeas grávidas na captura ( $32.8 \pm 21.1$  mg/dL) e fêmeas não grávidas na captura ( $32.3 \pm 16.8$  mg/dL), pode-se dizer que a resposta observada em *L. erinacea* foi detectada também em *P. amandae* no momento da captura. Do mesmo modo, fêmeas no momento do aborto ( $37.2 \pm 20.2$  mg/dL), que ocorre em média após uma hora de captura, correlacionam-se com os resultados obtidos por Cicia et al., (2012) no último tratamento de exposição ao ar, em 50 minutos, com aumento de valores.

### ***Corticosterona***

A corticosterona é um hormônio altamente conservado em vertebrados, este não pode ser armazenado intracelularmente; é sintetizada e circulada sob demanda, o que o torna um excelente alvo para estudos de estresse (BRINN et al., 2012). Um estudo com a arraia cururu (*Potamotrygon cf. hystrix*) demonstrou possível responsividade da corticosterona ao estresse ocasionado pelo transporte, uma vez que os níveis basais, obtidos no momento da captura dos animais, aumentaram progressivamente após 13 e 24 horas pós transporte (BRINN et al., 2012).

Neste trabalho os níveis plasmáticos de corticosterona não mostraram diferenças significativas entre os grupos comparados (Figura 13), com altíssima variação intragrupo, o que, possivelmente, inviabilizou a comparação estatística dos dados coletados.

Concentrações plasmáticas de corticosterona mostram variações específicas entre machos e fêmeas assim como variações sazonais associadas a reprodução em vários elasmobrânquios. Em tubarões martelo os níveis de corticosterona foram relacionados com o crescimento testicular e espermatogênese em machos; já em fêmeas correlacionam-se com a vitelogênese, migração, acasalamento e gestação (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011). Corroborando o observado, para a espécie de raia australiana *Trygonorrhina dumerilii*, submetida aos estresse de arraste e estresse aéreo, as concentrações e variações dos níveis de 17 B-estradiol, progesterona e testosterona não foram reativas ao estresse, porém se observou diminuição significativa da massa corpórea das fêmeas adultas, além da massa dos filhotes frutos de mães estressadas (GUIDA et al., 2017).

Manire et al., (2007), demonstrou em seu estudo com a arraia *Dasyatis sabina* que os níveis de corticosterona em fêmeas estavam relacionados com o final da gravidez, parto e pós-parto, diminuindo consideravelmente nos outros estágios do ciclo reprodutivo. No presente estudo, a concentração plasmática de corticosterona se manteve estável em fêmeas grávidas e fora do período gestacional. É sabido que a corticosterona desempenha um papel significativo na sazonalidade da reprodução em elasmobrânquios, muito provavelmente relacionado ao eixo de estresse, mas sua função pode diferir entre sexos e espécies (dado a diversidade de modos reprodutivos no grupo) (MARUSKA; GELSLEICHTER, 2011), o que pode ser a explicação para a falta de diferença entre os grupos amostrados neste trabalho.

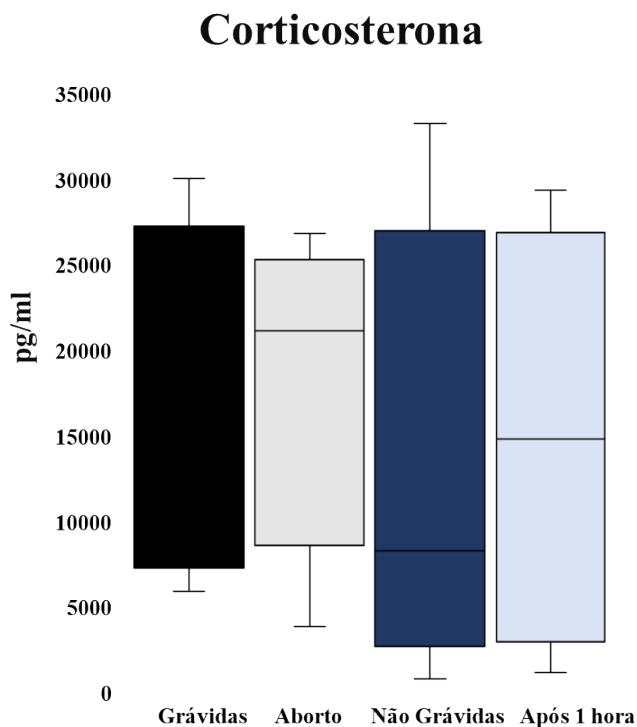


Figura 13 – Concentração de corticosterona (pg/ml) em fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupiá, Ilha Solteira/SP).

Adicionalmente aos resultados de estresse observados durante a após o evento de captura, observamos na maioria das fêmeas em período pós-cópula cicatrizes de embate na região do disco (Figura 14), provavelmente provenientes de mordidas durante a cópula, o que nos permite explicar que apesar das concentrações plasmáticas de corticosterona não diferirem entre os grupos amostrados, os animais em período de cópula já mostraram tal estresse, por isso a variação tão grande de resultados e desvios padrões.

Rangel et al., (2023) em seu trabalho sobre evidências de cicatrizes de acasalamento em fêmeas de *Galeocerdo cuvier* no Arquipélago de Fernando de Noronha, demonstrou que todas as fêmeas apresentaram cicatrizes de cópula; exceto uma que aparentemente estava grávida. Tais feridas e cicatrizes são provenientes da tentativa do macho de acasalar (RITTER; AMIN, 2019), o que conseqüentemente causa estresse nos indivíduos.



Figura 14 – Exemplos de *Potamotrygon amandae* mostrando cicatrizes de cópula em toda a extensão do disco.

### *Corpos cetônicos*

Corpos cetônicos são comumente utilizados como fonte alternativa de combustível aeróbio, sendo considerada uma característica do grupo dos elasmobrânquios (SPEERS- ROESCH e TREBERG, 2010). Os corpos cetônicos, incluindo acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB), são combustíveis de alta energia produzidos a partir de Acetil- CoA pelas mitocôndrias do fígado e depois exportado para os tecidos adjacentes para oxidação (BALLANTYNE, 1977; LAFFEL, 1999). Alguns estudos têm mostrado que elasmobrânquios tem níveis relativamente altos de enzimas envolvidas no metabolismo de corpos cetônicos, como a D- $\alpha$ -hidroxibutirato desidrogenase ( $\alpha$ -HBDH) (SPEERS- ROESCH e TREBERG, 2010).

Esta fonte energética mostrou padrão de maiores valores no momento da coleta para fêmeas grávidas e não-grávidas, em comparação com valores após o evento de aborto e após 60 minutos. Adicionalmente, as fêmeas grávidas mostraram maior concentração de corpos cetônicos na coleta após aborto em comparação com fêmeas não grávidas após 60 minutos. A explicação para estas diferenças pode estar ligada à importância deste substrato energético no período de estresse, com diminuição de 45,6% nas fêmeas grávidas e 80,45% em fêmeas não-grávidas, mostrando o uso desigual desta fonte energética dependendo do estágio de gestação.



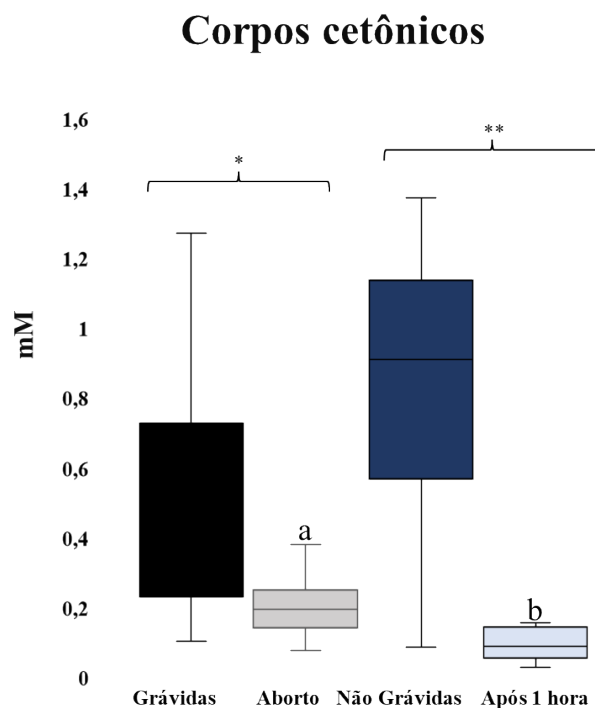


Figura 15 – Concentração de corpos cetônicos (mM) em fêmeas de *Potamotrygon amandae*, coletadas no Alto Rio Paraná (reservatório de Jupiá, Ilha Solteira/SP). <sup>a,b</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) entre as fêmeas grávidas e não grávidas; <sup>\*,\*\*</sup> mostra diferença estatística significativa ( $P < 0,001$  e  $P < 0,05$ ) entre momentos de coleta.

Richards et al., (2003) em seu trabalho sobre metabolismo do exercício e recuperação em *Squalus acanthias* demonstrou que o músculo branco de sua espécie modelo parece depender de corpos cetônicos durante a recuperação do exercício. Do mesmo modo, Walsh et al., (2006) também demonstrou a importância destes compostos em seu estudo acerca da organização metabólica e efeitos da alimentação nas atividades enzimáticas na glândula retal de *S. acanthias*.

O padrão de manutenção de valores de glicose plasmático e grande responsividade de corpos cetônicos em eventos estressantes de *P. amandae* descritos aqui são corroborados pelo trabalho de Speers-Roesch et al. (2006), que mostra que a capacidade de oxidação do corpos cetônicos foi detectada em todos os tecidos de todas as espécies de raias de água doce investigadas; e a capacidade glicolítica, indicada pela atividade da piruvato quinase, forneceu informações sobre a importância diminuída de carboidratos como combustível metabólico. A explicação para tais resultados estaria ligada à evolução, em que espécies dulciaquícolas apenas mantiveram características de seus ancestrais

marinhos, e que a colonização do ambiente de água doce não foi uma força seletiva suficientemente poderosa para causar a adoção de uma organização metabólica semelhante à dos teleósteos, em que as proteínas são substrato preferencial de quebra energética no grupo.

### **Fisiologia do parto induzido por captura em *Potamotrygon amandae***

#### ***Hipótese da inibição da relaxina***

Elasmobrânquios vivíparos apresentam liberação do hormônio relaxina, molécula com 45% de homologia com a relaxina de mamíferos, em resposta ao estradiol. Este hormônio é liberado durante a gravidez, em que regiões do trato reprodutivo devem se ampliar ou se adaptar significativamente para permitir a passagem dos ovos ou fetos (SCHWABE; BÜLLESBACH, 1990).

Em análises farmacológicas, os efeitos da relaxina na presença e ausência de esteroides e no aumento da área transversal cervical, mostraram que esta molécula é funcional e tem bioatividade aumentada na presença de estrógenos (CALLARD et al., 1989). Adicionalmente, doses aumentadas de relaxina (10, 100 e 1000 ng/mL) em *Squalus* resultaram em uma diminuição, relacionada à dose, na taxa de contração influenciando significativamente a amplitude ou duração das contrações (CALLARD et al., 1989). A relaxina também inibe as contrações uterinas no cação, o que protegeria os embriões encapsulados durante o início da gravidez e evitaria o parto precoce (SORBERA; CALLARD, 1995). Acrescenta-se, que em mamíferos é descrito que a ação da relaxina está ligada diretamente à ligação agonista desta aos receptores de catecolaminas e glicocorticoides cerebrais (DSCHIETZIG et al., 2009).

Sendo verdadeiro para *P. amandae*, o estresse de captura e liberação de catecolaminas, e não de corticosteroides, resultaria em parto por inibição da ligação da relaxina, levando à contração da musculatura lisa uterina e consequente aumento de lactato. Energeticamente os corpos cetônicos, e não a glicose, seriam utilizados como fonte energética preferencial para momentos de estresse em fêmeas em diferentes momentos de ciclo reprodutivo, sendo, porém, utilizados de forma mais lenta em fêmeas grávidas, com menor taxa de decaimento. Finalmente, os filhotes frutos deste evento de estresse não apresentam sobrevida, independente do estágio de desenvolvimento.

## Conclusões

Demonstramos para a espécie *Potamotrygon amandae*, que:

- A gravidez impacta positivamente na massa corpórea da espécie;
- Todas as fêmeas grávidas capturadas apresentaram abortamento/parto induzido por captura;
- O tempo médio para abortamento de filhotes e/ou parto induzido por captura foi de  $57,5 \pm 27,5$  minutos;
- Fêmeas apresentam cicatrizes de cópula em toda extensão do disco;
- Células da linhagem vermelha do sangue não são responsivas ao estresse de captura;
- Lactato plasmático, considerado marcador de respiração anaeróbica e/ou subproduto da contração de musculatura lisa, aumenta após evento de estresse de captura, com magnitude aumentada para fêmeas grávidas;
- O glicocorticoide corticosterona apresenta alta variação intraespecífica, e não parece aumentar após a captura, tampouco se diferencia entre fêmeas grávidas e não grávidas;
- O substrato glicose não apresenta responsividade à captura, o que mostra este substrato não é preferencial durante o estresse agudo;
- Corpos cetônicos são fonte energética preferencial para momentos de alostase durante estresse agudo da espécie;
- A utilização dos corpos cetônicos ocorre de forma mais lenta em fêmeas grávidas, com menor taxa de decaimento neste grupo, comparado com fêmeas não-grávidas.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, K. R.; FETTERPLACE, L. C.; DAVIS, A. R.; TAYLOR, M. D.; KNOTT, N. A. Sharks, rays and abortion: the prevalence of capture-induced parturition in elasmobranchs. *Biological Conservation*. 217, 11–27, 2018.

ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. *AC20 INF*. 8, 20, 1–6, 2004.

ARMOUR, K. J.; O'TOOLE, L. B.; HAZON, N. The effect of dietary protein restriction on the secretory dynamics of  $1\alpha$ -hydroxycorticosterone and urea in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*: a possible role for  $1\alpha$ -hydroxycorticosterone in sodium retention. *Journal of Endocrinology*. 138, 275–282, 1993.

AWRUCH, C. A. Reproductive endocrinology in chondrichthyans: the present and the future. *General and Comparative Endocrinology*. 192, 60–70, 2013.

BALLANTYNE, J. S. Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 118, 703–742, 1997.

BARRON, J. T.; PARRILLO, J. E. Production of lactic acid and energy metabolism in vascular smooth muscle: effect of dichloroacetate. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268, H713–H719, 1995.

BECERRIL-GARCÍA, E. E., et al. Research priorities for the conservation of chondrichthyans in Latin America. *Biological Conservation*. 269, 2022.

BERNAL, D., SMITH, D., LOPEZ, G., WEITZ, D., GRIMMINGER, T., DICKSON, K., GRAHAM, J.B. Comparative studies of high performance swimming in sharks II. Metabolic biochemistry of locomotor and myocardial muscle in endothermic and ectothermic sharks. *Journal of Experimental Biology*. 206, 2845–2857. 2003

BRILL, R.; BUSHNELL, P.; SCHROFF, S.; SEICEFERT, R.; GALVIN, M. Effects of anaerobic exercise accompanying catch-and-release fishing on blood-oxygen affinity of

the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 354, 132–143, 2008.

BRINN, R. P.; MARCON, J. L.; McCOMB, D. M.; GOMES, L. C.; ABREU, J. S.; BALDISSEROTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. histrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 162, 139–145, 2012.

CALLARD, I. P., KLOSTERMAN, L. L., SORBERA, L. A., FILETI, L. A.; REESE, J. C. Endocrine regulation of reproduction in elasmobranchs: Archetype for terrestrial vertebrates. *Journal of Experimental Zoology*. 252, 12–22. 1989.

CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: REIS, R.; KULLANDER, S. O.; C.J., F. J. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. 22–28, 2003.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*. 67, 259–84, 2005.

CHARVET-ALMEIDA, P. Ocorrência, biologia e uso das arraias de água doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com Ênfase na Biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2001, 213 p.

CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Sciences*. 35, 165–171, 2005.

CHROUSOS, G. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851, 311–335, 1998.

CICIA, A. M.; SCHLENKER, L.S.; SULIKOWSKI, J. A.; MANDELMAN, J. W. Seasonal variations in the physiological stress response to discrete bouts of aerial exposure in the little skate, *Leucoraja erinacea*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 162, 130–138, 2012.

CORTÉS, E. Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Reviews in Fisheries Science*. 8, 299–344, 2000.

DAS, D.; AFONSO, P. Review of the Diversity, Ecology, and Conservation of Elasmobranchs in the Azores Region, Mid-North Atlantic. *Frontiers in Marine Science*. 4, 2017.

DICKSON, K.; GREGORIO, M. O.; GRUBER, S. J.; LOEFLER, K. L.; TRAN, M.; TERREL, C. Biochemical indices of aerobic and anaerobic capacity in muscle tissues of California elasmobranch fishes differing in typical activity level. *Marine Biology*, 117, 185–193, 1993.

DSCHIETZIG, T.; BARTSCH, C.; WESSLER, S.; BAUMANN, G.; STRANGL, K. Autoregulation of human relaxin-2 gene expression critically involves relaxin and glucocorticoid receptor binding to glucocorticoid response half-sites in the relaxin-2 promoter. *Regulatory peptides*. 155, 163–173, 2009.

DULVY, N.K, et al. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays *eLife*. 3, e00590, 2014.

DUNCAN, W. P.; SILVA, M.I.; FERNANDES, M. N. Gill dimensions in near-term embryos of Amazonian freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) and their relationship to the lifestyle and habitat of neonatal pups. *Neotropical Ichthyology*, 13, 123–136, 2015.

DUNCAN, W. L. P. Habitat, morfologia branquial e osmorregulação das arraias de água doce da bacia amazônica (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). Tese (Doutorado) – Curso de Ciências: Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, 2008, 198 p.

EVANS, A. N. Evidence supporting a dual glucocorticoid and mineralocorticoid role for the elasmobranch steroid 1- $\alpha$ -hydroxycorticosterone. Teses (Doutorado) Universidade do Texas, 2008.

FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J.A.S.; SANTOS, G.M. Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará. Brasília: IBAMA. 1998.

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.

FRICKE, R., ESCHMEYER, W.; VAN DER LAAN, R. Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references.

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. 2023.

FRICK, L. H.; WALKER, T. I.; REINA, R. D. Immediate and delayed effects of gill-net capture on acid–base balance and intramuscular lactate concentration of gummy sharks, *Mustelus antarcticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 162, 88–93, 2012.

FULLER, L.; STELL, E.; LEARY, C.; PARSONS, G. Circulating adrenocorticotrophic hormone levels, lactate levels, hematocrit and osmolality in relation to capture stress in Atlantic sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 243, 110655, 2020.

GALLAGHER, A. J.; SERAFY, J. E.; COOKE, S. J.; HAMMERSCHALAG, N. Physiological stress response, reflex impairment, and survival of five sympatric shark species following experimental capture and release. *Marine Ecology Progress Series*. 496, 207–218, 2014.

GALLUCCI, V.F.; TAYLOR, I.G.; ERZINI, K. Conservation and management of exploited shark populations based on reproductive value. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63, 931–942, 2006.

GAMA, C. S. Diversidade e ecologia das arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da reserva biológica do Parazinho, ap. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas: Zoologia. Universidade Federal da Paraíba, 2013, 227 p.

GANESH, C. B. The stress–Reproductive axis in fish: The involvement of functional neuroanatomical systems in the brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 101904, 2020.

GARRONE NETO, D. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de arraias (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do Alto Rio Paraná, Sudeste do Brasil. Pan- american Journal Of Aquatic Sciences. 1, 101–111, 2010.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology. 56, 35–39, 1971.

GUIDA, L.; AWRUCH, C.; WALKER, T.; REINA, R.D. Prenatal stress from trawl capture affects mothers and neonates: a case study using the southern fiddler ray (*Trygonorrhina dumerilii*). Scientific Reports. 7, 46300, 2017.

HAMLETT, W. C.; EULLIT, A.M.; JARRELL, R.L.; KELLY, M.A. Uterogestation and placentation in elasmobranchs. Journal of Experimental Zoology. 266, 347–367, 1993.

HEBERER, C., AALBERS, S.A., BERNAL, D., KOHIN, S., DiFIORE, B., SEPULVEDA, C. Insights into catch-and-release survivorship and stress-induced biochemistry of common thresher sharks (*Alopias vulpinus*) captured in the Southern California recreational fishery. Fisheries Research. 106, 495–500. 2010.

HOFFMAYER, E. R.; HENDON, J. M.; PARSONS, G. R. Seasonal modulation in the secondary stress response of a carcharhinid shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. Comparative Biochemistry and Physiology. 162, 81–87, 2012.

IDLER, D. R.; TRUSCOTT, B.  $1\alpha$ - Hydroxycorticosterone from cartilaginous fish: a new adrenal steroid in blood. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 23, 615– 619, 1966.

LAMEIRAS, J. L. V.; COSTA, O. T. F.; DOS-SANTOS, M. C. Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes – Potamotrygoninae): biology, general features and envenomation. Toxin Reviews, 39, 1– 16, 2019.

LASSO, C.A.; ROSA, R.S.; SÁNCHEZ-DUARTE, P.; MORALES-BETANCOURT, M.A.; AGUDELO- CÓRDOBA, E. (eds) (2013a) IX. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad, bioecología, uso y conservación.



Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, 2014, 370 p.

LASSO, C. A.; ROSA, R.; MORALES- BETNACOURT, M. A.; GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, M. R. X Rayas de água dulce (Potamotrygonidae) de suramérica. parte II Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), 2016.

LOBODA, T. S.; CARVALHO, M. R. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes:Potamotrygonidae). Neotropical Ichthyology. 11, 693– 737, 2013.

LONARDONI, A.; OLIVEIRA, E. F.; ABELHA, M.C.; GOULART, E. Hábitos alimentares e sobreposição trófica das arraias *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na planície alagável do alto rio Paraná; Brasil. Acta Scientiarum Biological Sciences. 28, 195– 202, 2006.

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, 5–13, 2006.

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.

LUCIFORA, L O.; CARVALHO M. R.; KYNE, M.; WHITE W. T. Freshwater sharks and rays. Current Biology. 25, 971–973, 2015.

MANDELMAN, J. W.; FARRINGTON, M. A. The physiological status and mortality associated with otter-trawl capture, transport, and captivity of an exploited elasmobranch, *Squalus acanthias*. ICES Journal of Marine Science. 64, 122–130, 2007.

MANIRE, C.A.; RASMUSSE, L.E.L., MARUSKA, K.P.; TRICAS, T.C. Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148, 926–935, 2007.

MARSHALL, H.; FIELD, L.; AFRADATA, A.; SEPULVEDA, C.; SKOMAL, G.; BERNAL, D. Hematological indicators of stress in longline-captured sharks. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 162, 121–129, 2012.

MARUSKA, K. P.; GELSLEICHTER, J. Hormones and Reproduction in Chondrichthyan Fishes. Elsevier, 1, 209–237, 2011.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*. 106, 201–212, 1997.

MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9, 211–268, 1999.

MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: SEMINAR SERIES-SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. Cambridge University Press, 1997. p. 247–268.

MOYES, C. D.; FRAGOSO, N.; MUSYL, M. K.; BRILL, R. W. Predicting postrelease survival in large pelagic fish. *Transactions of the American Fisheries Society*. 135, 1389–1397, 2006.

NORRIS, D. O. *Vertebrate Endocrinology*. 4ed. United States of America: Elsevier, 2007.

OTWAY, N. M. Serum biochemical reference intervals for free-living Sand Tiger sharks (*Carcharias taurus*) from east Australian waters. *Veterinary Clinical Pathology*. 44, 262–274, 2015.

PAGLIARINI, C. D.; RIBEIRO, C. S.; SPADA, L.; DELARIVA, R. L.; CHAGAS, J.M.A.; ANJOS, L.A.; RAMOS, I. Trophic ecology and metabolism of two species of nonnative Potamotrygonidae). *Hydrobiologia*. 47, 2895–2908, 2020.

RAMOS, H.A.C. Commercial species of Freshwater Stingrays in Brazil. Brasília, 2017.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; JANIS, C. M. A vida dos vertebrados. 4a Edição ed. São Paulo: Atheneu, 2008, 750 p.

RANDALL, D.J.; PERRY, S.F. Catecholamines. *Fish Physiology*, 12, 255–300, 1992.

RANGEL, B. S.; MOREIRA, R. G.; RIDER, M. J.; SULIKOWSKI, J. A.; GALLAGHER, A. J.; HEITHAUS, M. R.; COOKE, S. J.; KAUFMAN, L.; HAMMERSCHLAG, N. Physiological state predicts space use of sharks at a tourism provisioning site. *Animal Behaviour*, 191, 149–163, 2022.

RANGEL, B.S.; RIBEIRO, D.C.; CHAGAS, J.M.A.; SPADA, L.; MOREIRA, R.G.; RIBEIRO, C.S. Effects of biological traits on capture-induced parturition in a freshwater stingray and perspectives for species management. *Journal of Fish Biology*. 97, 546–551.

RANGEL, B. S.; RODRIGUES, A.; MOREIRA, R. G. Capture and handling stress in incidentally captured rays from small-scale fishing: A physiological approach. *Oecologia Australis*. 25, 190–196, 2021.

RASCHI, W.; MACKANOS, L.A. The structure of the ampullae of Lorenzini in *Dasyatis garouaensis* and its implications on the evolution of freshwater electroreceptive systems. *The Journal of Experimental Zoology*. 2, 101–111, 1989.

RICHARDS, J. G.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; WOOD, C. M. Exercise and recovery metabolism in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Comparative Physiology*. 173, 463–474, 2003.

RICHTER, M.; VIANA, M. S. S.; MALABARBA, M. C. S. L. Agnatos e Peixes. In: CARVALHO, I.S. (Ed). *Paleontologia*. Rio de Janeiro: Interciência. cap 28, 497–524, 2000.

ROBERTS, B. W.; DIDIER, W.; JOHNSON, N.S.; LIBANTS, S.; SANG-SEON, Y.; CLOSE, D.A. Regulation of a putative corticosteroid, 17, 21-dihydroxypregn-4-ene, 3, 20-one, in sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *General and Comparative Endocrinology*. 196, 17–25, 2014.

RUIZ-JARABO, I.; BARRAGÁN-MÉNDEZ, C.; JEREZ-CEPA, I.; FERNÁNDEZ-CASTRO, M.; SOBRINO, I.; MANCERA, J.M.; AERTS, J. Plasma  $1\alpha$ -hydroxycorticosterone as biomarker for acute stress in catsharks (*Scyliorhinus canicula*). *Frontiers in Physiology*. 10, 1217, 2019.

SCHWABE, C.; BÜLLESBACH, E. E. Relaxin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 96, 15–21, 1990.

SCHWIETERMAN, G. D.; RUMMER, J. L.; BOUYOUCOS, P. G.; BURSHNELL, P. G.; BRILL, R. W. A lack of red blood cell swelling in five elasmobranch fishes following air exposure and exhaustive exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 258, 110978, 2021.

SILVA, T. B.; S. UIEDA. 2007. Preliminary data on the feeding habits of the freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. *Biota Neotropica*. 7, 221–226, 2007.

SKOMAL, G. B. Evaluating the physiological and physical consequences of capture on post-release survivorship in large pelagic fishes. *Fisheries Management and Ecology*. 14, 81–89, 2007.

SKOMAL, G. B.; MANDELMAN, J. W. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: a review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology* 162, 146–155, 2012.

SKOMAL, G.; BERNAL, D. Physiological responses to stress in sharks. In: Carrier, J., Musick, J., Heithaus, M. (Eds.), *Sharks and Their Relatives II: Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation*. CRC Press, Boca Raton, 459–490, 2010.

SORBERA, L. A.; CALLARD, I. P. Myometrium of the spiny dogfish *Squalus acanthias*: peptide and steroid regulation. *Am J Physiol.*, 269, R389e397, 1995.

SPADA, L. Aspectos metabólicos do ciclo reprodutivo de fêmeas de *Potamotrygon amandae* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), em área de ocorrência não-natural (Reservatório de Jupia, Ilha Solteira. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

SPADA, L.; RIBEIRO, D. C.; CHAGAS, J. M.A.; HOROIWA, A. Y.; SOARES, A. S.; RIBEIRO, C. S. Metabolismo lipídico da raia vivípara *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 durante a reprodução. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*. 11, 186–197, 2020.

SPEERS-ROESCH, B., I., Y. K., BALLANTYNE, J. S. Metabolic organization of freshwater, euryhaline, and marine elasmobranchs: implications for the evolution of energy metabolism in sharks and rays. *Journal of experimental biology*, 209, 2495–2508, 2006.

SPEERS-ROESCH, B.; TREBERG, J. R. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 155, 417– 434, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R., 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpres Complexo Gráfico. 144p.

TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. Uterine fluid and sérum protein composition and serum steroid hormone concentrations during gestation in the aplacental viviparous Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53, 1689–1699, 2013.

TREBERG, J. R.; SPEERS-ROESCH, B.; PIERMARINI, P. M.; IP, Y. K.; BALLANTYNE, J. S.; DRIEDZIC, W. R. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species. *Journal of Experimental Biology*. 209, 860–870, 2006.

WALSH, P. J.; KAJIMURA, M.; MOMMSEN, T. P; WOOD, C.M. Metabolic organization and effects of feeding on enzyme activities of the dogfish shark (*Squalus acanthias*) rectal gland. *Journal of experimental biology*. 209, 2929–2938, 2006.

WEBER, D. N.; JANECH, M. G.; BURNETT, L. E.; SANCHO, G.; FRAZIER, B. S. Insights into the origin and magnitude of capture and handling-related stress in a coastal elasmobranch *Carcharhinus limbatus*. *ICES Journal of Marine Science*. 78, 910–921, 2021.

WELLS, R.M.G., McINTYRE, R.H., MORGAN, A.K., DAVIE, P.S. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. *Comparative Biochemistry Physiology*. 84, 565–571. 1986.

WOOD, C. M. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *Journal of Experimental Biology*. 160, 285–308, 1991.

WOSNICK, N.; AWRUCH, K. R.; ADAMS, S. M. M.; GUTIERRE, H.; BORNATOWSKI, A. C. PRADO, C.; FREIRE C. A. Impacts of fisheries on elasmobranch reproduction: high rates of abortion and subsequent maternal mortality in the shortnose guitarfish. *Animal Conservation*. 22, 198–206, 2019.

ZANUZZO, F. S.; SABIONE, R.E.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBINATI, E.C. Modulation of stress and innate immune response by corticosteroids in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 231, 39–48, 2019.

