

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À HIPÓXIA GRADUAL EM NEONATOS  
E JUVENIS DA ARRAIA CURURU *Potamotrygon cf. hystrix*

**PAULA CAROLINE CAMARGO PASTÓRIO**

**Manaus, Amazonas  
Agosto, 2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À HIPÓXIA GRADUAL EM NEONATOS  
E JUVENIS DA ARRAIA CURURU *Potamotrygon cf. hystrix*

**PAULA CAROLINE CAMARGO PASTÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Biodiversidade Amazônica.

Orientador: Prof. Doutor Jaydione Luiz Marcon

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Thaís Billalba Carvalho

**Manaus, Amazonas  
Agosto, 2014**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P293r Pastorio, Paula Caroline Camargo  
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS À HIPÓXIA GRADUAL EM  
NEONATOS E JUVENIS DA ARRAIA CURURU *Potamotrygon cf.*  
*histrix* / Paula Caroline Camargo Pastorio. 2014  
63 f.: il. color; 30 cm.

Orientador: Jaydione Luiz Marcon  
Coorientadora: Thaís Billalba Carvalho  
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. Hipóxia gradual. 2. *Potamotrygon cf. histrix* (arraia cururu). 3.  
Frequência espiracular. 4. Hematologia. 5. Metabólitos. I. Marcon,  
Jaydione Luiz II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico esse trabalho à minha família e amigos que sempre me incentivaram. E em especial ao meu marido Dênis e às minhas filhas Maria Vittoria e Olívia.*

## **Agradecimentos**

*Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado em meu caminho as pessoas certas que me deram apoio nos momentos difíceis pelos quais passei durante esse mestrado, os quais me fizeram reforçar minha fé.*

*A meu esposo Dênis Cleberson Pastório, por ter me amparado e me repreendido quando necessário, mas sempre me apoiando, inclusive colocando a mão na massa quando preciso. A minha pequena filha Maria Vittoria Pastório por todas as alegrias que me faziam buscar forças nos momentos de desânimo.*

*A meu pai Paulo Roberto Camargo e minha irmã Joana Gabrielle Camargo, que mesmo de longe me apoiaram e incentivaram. Mas em especial minha super mãe Fabiane Stefani Camargo, que além de todo o apoio moral ainda veio de tão longe para me ajudar em momento muito importante para a finalização da dissertação e por todo amor que sempre me deu.*

*A querida amiga Maria Lúcia Souza Rodrigues que me ajudou muito cuidando com tanto carinho da minha princesinha, para que eu pudesse realizar os experimentos com tranquilidade, e pelas palavras de conforto e incentivo nos momentos difíceis.*

*As minhas amigas Cláudia Dantas Comandolli Wyrepkowski, Gabriela Ferreira Zanette e Liã Bárbara Arruda que sempre estiveram prontas a escutar minhas lamúrias e com suas experiências me ajudaram a passar pelas dificuldades, me apoiando e me incentivando.*

*Agradeço a técnica Rejane de Souza Aquino Sales, não só por todo o apoio técnico, mas também por ter sido uma grande amiga que encontrei nessa jornada sempre me ouvindo e me dando palavras de incentivo.*

*A Rebeca Nascimento Brandão, Damy Caroline de M. Souza, Lídia Aguiar da Silva, Thiago Santos e Gabriel Gonçalves que me ajudaram muito em várias etapas dos experimentos.*

*Ao professor doutor José Antônio Alves Gomes por ter disponibilizado espaço e materiais para a realização dos experimentos pilotos no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução do INPA.*

*Ao meu orientador doutor Jaydione Luiz Marcon pelo conhecimento transferido, por me ajudar a superar as dificuldades ao longo do mestrado, por colocar a mão na massa na parte experimental e por reconhecer meu esforço e compreender minhas limitações.*

*A minha co-orientadora doutora Thaís Billalba Carvalho, por ter sido sempre tão pronta a me ajudar, inclusive passando noites em claro para cuidar dos nossos experimentos.*

*Ao doutor Wallice Paxiúba Duncan por toda a ajuda com o protocolo de determinação de glicogênio hepático, disponibilizando seu tempo, material laboratorial e espaço físico.*

*A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela estrutura e pelo apoio logístico com o transporte das arraias. A todos os integrantes do Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica, em especial a doutora Maria Gracimar Pacheco de Araújo a qual sempre me atendeu e me ajudou prontamente, sanando minhas dúvidas e me ajudando a resolver problemas burocráticos.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem a qual não seria possível ter realizado esse trabalho.*

*E por fim quero agradecer a todos que direta e indiretamente me ajudaram a completar essa etapa da minha vida acadêmica. Muito obrigada a todos vocês.*

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar a resposta das propriedades do sangue e das reservas de glicogênio em tecidos de indivíduos neonatos e juvenis da arraia cururu (*Potamotrygon cf. hystrix*) frente à diminuição progressiva dos níveis de oxigênio dissolvido na água (hipóxia). Para isso, indivíduos neonatos e juvenis da espécie foram submetidos a três tratamentos distintos: grupo de animais mantidos em normóxia (NO), em concentrações de O<sub>2</sub> em torno de 80% de saturação (~6,0 mg/L) e dois grupos expostos à hipóxia gradual, nos quais os níveis de O<sub>2</sub> decaíram (até pelo menos 1 mg/L) pela respiração da própria arraia, sendo hipóxia com acesso à superfície (HC), onde as arraias tinham acesso livre a toda coluna d'água, e hipóxia sem acesso à superfície (HS). Nos aquários deste último grupo foram instaladas telas plásticas 5 cm abaixo da superfície, para impedir que os animais tivessem acesso à camada mais oxigenada da coluna d'água. Seis indivíduos foram utilizados em cada tratamento, tanto no experimento com neonatos quanto com juvenis. Foi avaliada a frequência espiracular (FE), que aumentou em resposta à hipóxia em ambos, neonatos (39 para 74 beats/min) e juvenis (50 para 78 beats/min); os parâmetros hematológicos, que mostraram respostas mais evidentes nos neonatos, com diminuição da contagem de eritrócitos e aumento do HCM no grupo HS e aumento do VCM em ambos os grupos HC e HS. Quanto aos metabólitos plasmáticos, houve aumento nos níveis de lactato no grupo HC dos juvenis, diminuição do colesterol total em neonatos e juvenis e, em ambos os tratamentos, além de aumento dos níveis de proteínas totais no grupo HS dos juvenis. Nos juvenis, foi observado aumento do glicogênio hepático e mobilização do glicogênio muscular (mais intenso no grupo HC) em resposta à hipóxia gradual. No entanto, esse padrão não foi observado nos neonatos, que mostraram diferenças no glicogênio hepático entre os grupos expostos à hipóxia, mas não em relação ao grupo mantido em normóxia e níveis similares deste açúcar no músculo nos três tratamentos. Neonatos e juvenis de *Potamotrygon cf. hystrix* compartilham características observadas em outros peixes tolerantes à hipóxia, como o aumento da frequência branquial/espiracular em resposta a níveis baixos de oxigênio; o fato de possuírem grandes reservas de glicogênio tecidual (hepático e muscular); a capacidade de ajuste de alguns parâmetros do metabolismo, como a hematologia, que no caso da arraia cururu ocorre nas primeiras fases de vida, e aumentos dos níveis circulantes de lactato, como resultado da ativação do metabolismo anaeróbico. Conclui-se então que essa espécie de arraia de água doce está inserida no grupo dos animais tolerantes à hipóxia.

Palavras-chave: Hipóxia, *Potamotrygon cf. hystrix*, frequência espiracular, hematologia, metabólitos.

## ABSTRACT

The purpose of this study was identify the response of blood properties and glycogen content in tissues of neonates and juveniles of cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) exposed to progressive decay of dissolved oxygen levels in water (hypoxia). Individuals of cururu stingrays were subjected to three groups: normoxia (NO) where animals were kept in O<sub>2</sub> levels up to 80% O<sub>2</sub> saturation (about 6.0 mg/L) and two groups exposed to progressive hypoxia, where O<sub>2</sub> levels declined (until at least 1 mg/L) by own respiration, hypoxia with access to the surface (HC), where the stingrays had free access to the entire water column, and hypoxia without access to the surface (HS), where a containment screen was installed 5 cm below the surface to prevent animals had access to more oxygenated layer of the water column. Six individuals were used in each treatment, in both experiments with neonates and juveniles. We evaluated the frequency of spiracular movements (FE), which increased in response to hypoxia in both neonates (39 to 74 beats/min) and juveniles (50 to 78 beats/min); hematological parameters, which showed more pronounced responses in neonates, as decreased erythrocyte count and increased in MCH in HS group and increased in MCV on both HC and HS groups. Regarding plasma metabolites, there was an increase in lactate levels in the HC group of juveniles, decreased total cholesterol in neonates and juveniles, and in both treatment groups, as well as increased levels of total protein in HS group of juveniles. In juveniles, increased liver glycogen and muscle glycogen mobilization (more intense in the HC group) were observed in response to progressive hypoxia. However, this pattern was not observed in neonates who showed differences in liver glycogen between groups exposed to hypoxia, but not when compared to normoxic group. Also, similar levels of this sugar in the muscle were observed in the three treatment groups. Neonates and juveniles of *Potamotrygon cf. hystrix* share characteristics observed in other hypoxia-tolerant fish, such as increased gill/espiracular frequency in response to low oxygen levels; their large glycogen reserves (muscle and liver); the ability to adjust some parameters of metabolism, such as hematology, that in the case of cururu stingray occurs in the early stages of life, and increases in circulating lactate levels as a result of activation of anaerobic metabolism. It is concluded that this freshwater stingray species can be inserted in the group of hypoxia-tolerant animals.

Keywords: Hypoxia, *Potamotrygon cf. hystrix*, spiracular frequency, hematology, metabolites.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

[O<sub>2</sub>]: concentração de oxigênio

%: por cento

μL: microlitros

μg: micrograma

μmoles: micromoles

μS/cm: microsiemens por centímetro

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

cm: centímetros

CT: comprimento total

dL: decilitros

DP: desvio padrão

FE: frequência espiracular

fL: fentolitros

g: gramas

h: horas

Hb: hemoglobina

HCM: hemoglobina corpuscular média

Ht: hematócrito

L: litros

LD: largura do disco

Max: máximo

Min: mínimo

min: minutos

mg: miligramas

mmol: milimol

O<sub>2</sub>: oxigênio

pg: picograma

pH: pontencial hidrogeniônico

pKa: quilopascal

RBC: contagem de eritrócitos totais

VCM: volume corpuscular médio

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros biométricos de indivíduos neonatos da arraia cururu ( <i>P. cf. hystrix</i> ), submetidos à hipóxia gradual .....	17
Tabela 2. Parâmetros biométricos de indivíduos juvenis da arraia cururu ( <i>P. cf. hystrix</i> ), submetidos à hipóxia gradual .....	17
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos dos aquários ao longo de 48 horas de experimento com indivíduos neonatos de arraia cururu.....	18
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos dos aquários ao longo de 72 horas de experimento com indivíduos juvenis de arraia cururu .....	18
Tabela 5. Hematologia de arraias cururu neonatos após exposição gradual à hipóxia ao longo de 48 horas .....	27
Tabela 6. Hematologia de arraias cururu juvenis após exposição gradual à hipóxia ao longo de 72 horas .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rede de mão (rapiché) utilizada para a captura das arraias .....	08
Figura 2. Tanques-rede instaladas nas praias próximas as áreas de pesca .....	08
Figura 3. Tanques de armazenamento no Laboratório Úmido de Organismos Aquáticos na Universidade Federal do Amazonas .....	08
Figura 4. Aquário com tela de contenção do grupo HS .....	10
Figura 5. <i>Potamotrygon cf. hystrix</i> realizando RSA .....	10
Figura 6. Concentração média de oxigênio dissolvido em função do tempo dos seis aquários dos três tratamentos no experimento com neonatos .....	19
Figura 7. Concentração de oxigênio médio dos seis aquários de cada um dos três tratamentos em função do tempo no experimento com juvenis .....	19
Figura 8. Frequência espiracular de neonatos de arraia cururu em função da concentração de O <sub>2</sub> .....	22
Figura 9. Frequência espiracular de juvenis de arraia cururu em função da concentração de O <sub>2</sub> .....	23
Figura 10. Níveis plasmáticos de glicose em arraias cururu neonatos e juvenis após 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	30
Figura 11. Níveis plasmáticos de corpos cetônicos ( $\beta$ -hidroxibutirato) em juvenis de arraia cururu (n = 6) após 72 horas de exposição à hipóxia. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	31
Figura 12. Níveis plasmáticos de lactato em arraias cururu neonatos e juvenis após 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	32

Figura 13. Níveis plasmáticos de proteínas totais em neonatos e juvenis de arraia cururu (N = 6) após 48 e 72 horas de exposição à hipóxia. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	34
Figura 14. Níveis de ureia e amônia plasmáticos em indivíduos neonatos de arraia cururu, expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	35
Figura 15. Níveis de ureia e amônia plasmáticos em indivíduos juvenis de arraia cururu, expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	36
Figura 16. Níveis plasmáticos de colesterol total de neonatos e juvenis da arraia cururu expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	37
Figura 17. Níveis plasmáticos de triglicérides de neonatos e juvenis da arraia cururu expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	38
Figura 18. Glicogênio hepático e muscular em indivíduos neonatos de arraia cururu expresso em $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido fresco, após 48 horas de exposição à hipóxia progressiva. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	40
Figura 19. Glicogênio hepático e muscular em indivíduos juvenis de arraia cururu expresso em $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido fresco, após 72 horas de exposição à hipóxia progressiva. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão .....	41

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	06
Geral .....	06
Específicos .....	06
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	07
Área de Estudo e Captura .....	07
Protocolo experimental .....	08
Experimento 1 .....	10
Experimento 2 .....	11
<b>PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS</b> .....	12
Registro da frequência espiracular (Fe) .....	12
Avaliação dos Parâmetros hematológicos .....	12
Metabólitos plasmáticos .....	13
Glicogênio Hepático e Muscular .....	14
Parâmetros físico-químicos da água .....	15
Análise estatística .....	15
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
Condições experimentais .....	16
Frequência Espiracular .....	20
Hematologia .....	25
Metabólitos Plasmáticos .....	29
Glicogênio Hepático e Muscular .....	39
<b>CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43

## INTRODUÇÃO

A maior bacia de drenagem do planeta é a Amazônica. Ela é compartilhada por Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela e Guianas e possui uma área estimada de 6.869.000 km<sup>2</sup>, dos quais 69% estão situados no Brasil (UNEP, 2004). O Rio Negro é o maior tributário do Rio Amazonas e a sua bacia tem cerca de 715.000 km<sup>2</sup>. As principais áreas de captura de potamotrigonídeos e outros peixes ornamentais se encontram nas regiões próximas aos municípios de Barcelos e Santa Isabel no médio Rio Negro (Araújo *et al.*, 2005).

Além de sua imensa área, a Bacia Amazônica também se destaca pela grande variedade de ambientes que a compõem (praias, igarapés, rios, lagos, várzeas e igapós), onde ocorrem variações físico-químicas marcantes (temperatura, pH, gases dissolvidos, entre outras), o que fez com que os animais que habitam esse bioma desenvolvessem estratégias fisiológicas e/ou comportamentais para se adaptarem a este cenário continuamente variável.

O oxigênio (O<sub>2</sub>) é um dos gases mais importantes na dinâmica e na caracterização de ecossistemas aquáticos. As principais fontes de oxigênio para a água são a fotossíntese, realizada por plantas aquáticas e algas, e a atmosfera. Por outro lado, as perdas de oxigênio se dão pelo consumo na decomposição de matéria orgânica (oxidação), perdas para a atmosfera, oxidação de íons metálicos como o ferro e o manganês e pela respiração de organismos aquáticos. Nos ambientes aquáticos tropicais, essas fontes de perdas de oxigênio associadas a altas temperaturas (24-32°C) causam uma drástica queda nos níveis de oxigênio dissolvido, uma condição ambiental conhecida como hipóxia, que ocorre principalmente no período noturno quando não há a contribuição da produção de oxigênio pela fase luminosa da fotossíntese (Esteves, 1998).

Diaz e Breitburg (2009) colocam que são considerados hipóxicos concentrações de O<sub>2</sub> abaixo de 2-3 mg/L em ambientes marinhos e estuarinos e abaixo de 5-6 mg/L em ambientes de água doce. Wedemeyer (1997), por sua vez, visando garantir a saúde dos peixes em ambientes de criação, recomenda limites para diversos parâmetros químicos da água e ressalta que o limite de concentração do oxigênio é de no mínimo 6,0 mg/L para águas frias e de no mínimo 4,0 mg/L para águas quentes (tropicais).

Mudanças na concentração de oxigênio ambiental podem ocasionar profundos efeitos na fisiologia, comportamento e na distribuição de peixes (Muusze, *et al.*, 1998; Parsons e Carlson, 1998; Soares, *et al.*, 2006; Anjos, *et al.*, 2008). Organismos aeróbios necessitam de O<sub>2</sub> para produzir energia e, por esta razão, a privação desse gás provoca estresse significativo em células vivas, e também está ligada ao acúmulo inadequado de radicais livres, que causam estresse adicional nas proteínas e no DNA destas células (Majmundar *et al.*, 2010). De um modo geral, a maioria dos vertebrados é incapaz de tolerar mais do que alguns minutos de privação de oxigênio. Entretanto, diversas espécies de peixes podem sobreviver a hipóxia extrema, como o tubarão *Hemiscyllium ocellatum* (Routley, *et al.* 2002), e até à anóxia, como é o caso do ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus*, que suporta mais de 3 horas em completa ausência de oxigênio (Muusze, *et al.* 1998).

Os peixes amazônicos desenvolveram muitas maneiras para lidar com as baixas tensões de oxigênio em altas temperaturas, tais como ajustes fisiológicos, bioquímicos, teciduais (Muusze *et al.*, 1998) e estratégias comportamentais (Soares, *et al.*, 2006). Existem evidências de que a decisão de ficar em habitats com pouco oxigênio ou se mudar para outro com maior disponibilidade, depende dos custos relativos dessas alternativas (Rossi *et al.*, 2007; Anjos, *et al.*, 2008). Ajustes nas frequências cardíaca e respiratória para maximizar a transferência de oxigênio para os tecidos (Leite *et al.*, 2007), bem como respostas bioquímicas que incluem a depressão metabólica (Muusze *et al.*, 1988), são exemplos de ajustes fisiológicos realizados por peixes em resposta à hipóxia.

Na maioria dos teleósteos a hipóxia causa um aumento no hematócrito e nos níveis de glicose circulante no sangue, porém isso parece não ocorrer com elasmobrânquios marinhos (Routley *et al.*, 2002). Ao contrário dos teleósteos, informações disponíveis na literatura que relacionam os níveis dos principais metabólitos do plasma com respostas a condições hipóxicas em elasmobrânquios são escassas e incompletas. Alguns autores citam apenas valores de referência para determinados metabólitos, como por exemplo, proteínas totais, glicose, ureia e eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) no tubarão martelo (*Sphyrna tiburo*) (Harms *et al.*, 2002).

Os poucos estudos que abordam os efeitos da hipóxia em elasmobrânquios são realizados com animais marinhos, principalmente tubarões, como o trabalho de

Routley *et al.* (2002), que relata para o tubarão epaulette (*Hemiscyllium ocellatum*), o perfil do lactato e glicose plasmáticos e do hematócrito em indivíduos pré-condicionados à hipóxia e controles. Estudos mais recentes, também com o tubarão epaulette e com uma arraia-viola (*Aptychotrema rostrata*) relatam os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média, glicose e  $\beta$ -hidroxibutirato plasmáticos, os quais não sofreram alterações significativas em resposta a uma exposição progressiva à hipóxia (Speers-Roesch *et al.*, 2012a).

Em outro trabalho paralelo, onde esses mesmos animais foram expostos à hipóxia por 2 a 4 horas a níveis fixos de O<sub>2</sub> dissolvido (Speers-Roesch *et al.*, 2012b), foram avaliados os níveis de glicose e  $\beta$ -hidroxibutirato plasmáticos e a concentração de glicogênio nos tecidos (cardíaco, hepático e muscular), onde da mesma forma os níveis de glicose no sangue não foram alterados, bem como o glicogênio no coração e no músculo em ambas espécies e glicogênio hepático no tubarão, sendo que na arraia houve uma diminuição nas reservas do mesmo. Já em relação ao  $\beta$ -hidroxibutirato plasmático, não houve mudanças nos níveis da arraia-viola, enquanto que no tubarão epaulette houve uma redução, em 2 e 4 horas de exposição a 2,0 kPa (~1,0 mg/L) de oxigênio em relação ao controle.

Valores de referência para os metabólitos plasmáticos em arraias de água doce são também restritos (Oliveira, 2008; Oliveira, 2013). Wood *et al.* (2002) citam dados para alguns parâmetros incluindo o hematócrito e osmolaridade, mas limitam sua discussão ao relatar que estes se assemelham mais aos teleósteos de água doce, do que aos elasmobrânquios marinhos. O estudo de Oliveira (2008) com a arraia cururu (*Potamotrygon cf. hystrix*) determinou o perfil hematológico desta espécie em diferentes fases do nível do rio além de verificar possíveis influências nas diferentes fases do desenvolvimento, do dimorfismo sexual e do estado de prenhez sobre os parâmetros analisados. Considerando o estabelecido por Speers-Roesch e Treberg (2010), aliada à carência de informações sobre o tema, torna-se interessante investigar como os metabólitos plasmáticos se comportam em resposta a uma situação de hipóxia gradual e progressiva.

Do ponto de vista comportamental, segundo Kramer (1987), as principais categorias de resposta à diminuição na disponibilidade de oxigênio dissolvido incluem mudanças na atividade natatória e variações horizontais e verticais do

habitat, o aumento do uso da respiração aérea em espécies que possuem esta adaptação, bem como o aumento da respiração superficial aquática (RSA), uma estratégia comum entre os caraciformes amazônicos. A respiração aérea é observada em várias famílias de peixes, nas quais várias estruturas morfológicas foram “transformadas” em órgãos respiratórios facultativos ou obrigatórios, como a bexiga natatória (*Arapaima gigas*), estômago e intestino (várias espécies de Loricariidae, Doradidae, Callichthyidae, entre outros) e cavidade bucal (muçum, *Symbranchus marmoratus*; poraquê, *Electrophorus* sp.), entre outros. Apesar da respiração aérea e na coluna superficial da água ocorrerem em peixes marinhos de zonas intertidais e arrecifes de corais (Nilsson *et al.*, 2007), sem dúvida nenhuma, a maior frequência desses eventos é observada entre os peixes Amazônicos (Kramer e McClure, 1982; Soares *et al.*, 2006).

A respiração na superfície aquática (RSA) se caracteriza pela subida do peixe à superfície da coluna d'água e pelo posicionamento da boca na interface ar/água rica em oxigênio, devido à difusão equilibrada desse gás entre os dois meios (Saint-Paul e Soares, 1988; Kramer e McClure, 1982). De acordo com Rantin e Kalinin (1996) em função da continuidade da ventilação branquial durante estes eventos, a RSA pode ser eficiente para prevenir a asfixia e os efeitos prolongados da hipóxia, apesar dos riscos de predação aérea, por aves e mamíferos aquáticos, e do relativo alto custo energético, quando comparada com a respiração aérea.

Contudo, em nenhum momento esse tipo de adaptação foi evidenciado e descrito na literatura para elasmobrânquios. No ambiente marinho, tubarões e arraias, normalmente são aptos a realizarem deslocamentos diários (forrageio) ou sazonais (migratórios) em seus ambientes que permitam a escolha de locais mais adequados em relação à oferta de oxigênio na água. Entretanto, Barcellos (1997) relatou em laboratório que exemplares de *Potamotrygon* cf. *histris* submetidos à hipóxia apresentavam o hábito de nadar para a superfície e flutuar na mesma linha da coluna d'água dobrando as extremidades das nadadeiras laterais para explorar a camada mais oxigenada, direcionando o fluxo de água no disco para os espiráculos. Isso dá indícios de que esse animal realiza RSA como uma das estratégias para enfrentar condições de hipóxia em seu ambiente natural.

*Potamotrygon* cf. *histris*, conhecida popularmente como arraia cururu, é uma espécie pertencente à Família Potamotrygonidae, endêmica das florestas alagáveis

de água preta (igapó) do Arquipélago de Mariuá, bacia do médio Rio Negro, nas proximidades do município de Barcelos (Araújo, 1998; Carvalho *et al.*, 2003). Ela é uma das menores espécies de arraias de água doce, com uma medida do disco de no máximo 50 cm, possui corpo oval com coloração marrom e linhas escuras e descontínuas no seu dorso, tendo o padrão de policromatismo mais acentuado nos indivíduos neonatos (Araújo, 1998; Araújo *et al.*, 2004).

Ocupa o topo de cadeia alimentar dos seus habitats, tendo uma dieta heterogênea com participação de crustáceos, insetos aquáticos e pequenos peixes (Shibuya *et al.*, 2009). Esta espécie alcança sua maturidade sexual mais ou menos aos dois anos de idade (Araújo, 1998; Charvet-Almeida *et al.*, 2005), é vivípara matrotrofica e apresenta um ciclo reprodutivo anual regulado pelo nível do Rio Negro, com copula na vazante e parto na seca (Araújo, 1998). Os ambientes onde esta espécie ocorre possuem, predominantemente, água com temperatura elevada e valores baixos de oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica (Oliveira, 2008; Duncan e Fernandes, 2011).

A arraia cururu tem grande valor no mercado de ornamentais e, o que confere a esta espécie este destaque, além do alto policromatismo e aparência exótica, é a facilidade de captura em função da grande abundância e o comportamento sedentário, bem como o tamanho apropriado como peixe ornamental e maior resistência durante o transporte em comparação às demais espécies de *Potamotrygon* (Araújo, 1998; Araújo *et al.*, 2005). Ainda assim, segundo Brinn *et al.* (2012) a espécie *Potamotrygon cf. hystrix* apresentou sinais de estresse ao longo de 24 horas de transporte, aumentando os níveis de corticosterona e diminuindo os níveis de cloreto plasmático e, conseqüentemente, a osmolaridade do plasma.

Tanto em seu habitat natural (igapós) quanto nas etapas de captura e confinamento em caçapas no campo e no transporte por barco, os níveis de oxigênio dissolvido na água podem sofrer depleção, havendo assim necessidade de entender melhor como a arraia cururu responde e se adapta a essa situação ao nível fisiológico e comportamental. Apesar dos indivíduos desta espécie, viverem em ambientes onde a exposição à hipóxia é um fenômeno comum, pouco se sabe sobre seus ajustes fisiológicos diante a essa situação.

Sendo assim, este trabalho pode contribuir para melhor entender os efeitos que a hipóxia gradual exerce sobre a fisiologia da espécie *Potamotrygon cf. hystrix*,

bem como pode auxiliar a definir técnicas de manejo mais adequadas para este animal dentro da cadeia produtiva de peixes ornamentais.

## **OBJETIVOS**

### **Geral:**

Verificar a resposta das propriedades do sangue e das reservas de glicogênio em tecidos de indivíduos neonatos e juvenis da arraia cururu (*Potamotrygon* cf. *histris*) frente à diminuição progressiva dos níveis de oxigênio dissolvido na água.

### **Específicos:**

Estimar a frequência de movimentos espiraculares exibidos pelos neonatos e juvenis da arraia cururu ao longo da exposição à hipóxia gradual;

Avaliar a resposta das variáveis hematológicas frente à hipóxia gradual;

Quantificar os principais metabólitos plasmáticos, (lactato, glicose, proteínas totais, corpos cetônicos, triglicerídeos, colesterol total, amônia e ureia) e suas eventuais alterações em animais submetidos à hipóxia gradual, em relação ao controle (normóxia);

Quantificar os níveis de glicogênio hepático e muscular em relação à exposição à hipóxia gradual;

Estimar de forma indireta a contribuição do acesso à superfície na manutenção das condições fisiológicas da arraia cururu durante a hipóxia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Área de Estudo e Captura:

As arraias desse estudo foram capturadas nas áreas de floresta alagável (igapó) do Arquipélago de Mariuá, que é composto por um sistema de ilhas formadas por depósito de areia durante o período Quaternário, onde zonas mais profundas se intercalam com bancos de areia, além de igarapés e áreas de igapó que margeiam o canal principal (Araújo, 1998). Esse arquipélago é considerado o maior conjunto de ilhas de água doce do mundo, com mais de 1600 ilhas que abrigam uma diversidade considerável de pequenos peixes ornamentais, além de várias espécies da família Potamotrygonidae, incluindo *P. cf. hystrix* (Oliveira, 2008).

A captura das arraias foi realizada no período noturno com auxílio de lanterna e rede de mão (rapiché) (Figura 1). Após a captura elas foram mantidas em tanques-rede de 1m<sup>3</sup> fixados em praias, à sombra, próximos aos locais de pesca (Figura 2). Em seguida, as arraias foram transportadas por via fluvial em bacias (caçapas) das áreas de pesca para Barcelos e, de lá para Manaus (AM) em três viagens distintas (29/01/2013, 05/11/2013 e 03/12/2013), com duração média de 24 horas. Após a chegada, estes animais foram transportados para o Laboratório Úmido de Organismos Aquáticos na Universidade Federal do Amazonas e mantidos em recuperação por 15 dias, em tanques de PVC circulares de 500L, com um sistema de filtro biológico (feito com tubos de PVC, cascalho e areia), aeração contínua, renovação da água periódica e alimentação regular até a realização dos experimentos (Figura 3).



Adriano Teixeira de Oliveira

**Figura 1.** Rede de mão (rapiché).



Jaydione Luiz Marcon

**Figura 2.** Tanques-rede.



Paula Pastório

**Figura 3.** Tanques de armazenamento.

### **Protocolo experimental:**

As arraias foram transferidas aleatoriamente do tanque de armazenamento para os aquários, 24 horas antes do início do experimento para aclimação ao novo ambiente, sendo que cada aquário recebeu apenas uma arraia. Após esse período, cerca de  $\frac{1}{4}$  (um quarto) da água dos aquários foi retirada por sifonação de modo delicado para não estressar a arraia, a fim de aspirar excrementos depositados no fundo do aquário, produzidos pelo animal no período de aclimação. Logo após,

água previamente oxigenada e estabilizada foi adicionada lentamente para repor o volume total utilizado no experimento.

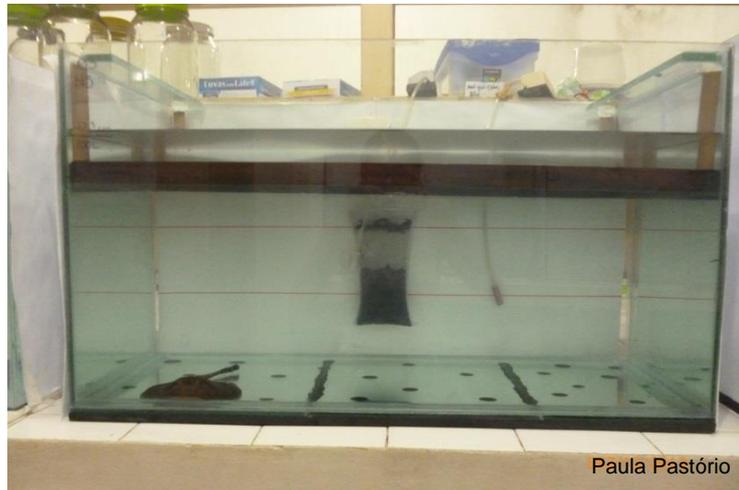
Os aquários tiveram as faces laterais e posteriores revestidas com papel branco para minimizar perturbações externas e receberam um saco contendo carvão ativado para promover a adsorção e retirada de compostos tóxicos excretados pelas arraias na água ao longo do experimento, principalmente a amônia. Esses aquários foram distribuídos, através de sorteio, entre três tratamentos; Hipóxia gradual com acesso à superfície (HC); Hipóxia gradual sem acesso à superfície (HS) e; Normóxia (NO) sendo esse último o grupo controle.

Os animais submetidos a **níveis normais de oxigênio dissolvido** na água (NO) foram mantidos com aeração contínua em níveis de oxigênio dissolvido próximos aos 80% da saturação do ar (cerca de 6,0 mg/L) durante todo o transcurso do experimento. Esse valor de saturação foi escolhido como referência em função de ser mais realista para representar a saturação do oxigênio em águas amazônicas com temperaturas normalmente elevadas (Muusze *et al.*, 1998).

Os animais submetidos à hipóxia gradual **com acesso à superfície (HC)** tiveram a possibilidade de movimentação livre pela coluna d'água, inclusive para explorar a camada mais superficial da mesma, onde ocorre a respiração superficial aquática (RSA) (Saint-Paul e Soares, 1988; Kramer e McClure, 1982; Rantin *et al.*, 1998; Barcellos, 1997). Já no grupo submetido à hipóxia **sem acesso a superfície (HS)**, foi instalada uma estrutura com tela de PVC cinco centímetros abaixo da superfície da água (Figura 4), impedindo que o animal explorasse a camada de água mais oxigenada pela troca gasosa com a atmosfera, conseqüentemente, impedindo que realizasse a RSA (Figura 5). Nos tratamentos HC e HS, o oxigênio decaiu gradualmente pelo consumo na respiração da própria arraia, até que os níveis atingiram entre 1,0 e 0,5 mg/L (Soares *et al.*, 2006), quando esse nível foi alcançado, os animais ainda permaneceram nesse ambiente de extrema hipóxia por mais 60 minutos.

Durante o experimento foi respeitado um fotoperíodo de 12 horas de claro: 12 horas de escuro, sendo que no período noturno, foi usada luz vermelha para iluminação a fim de evitar o efeito da luminosidade sobre as repostas comportamentais das arraias, que poderia alterar a frequência espiracular das mesmas.

Dada à possibilidade de captura em campo de indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (neonatos e juvenis), foi possível realizar dois experimentos similares, cujo detalhamento é apresentado a seguir.



**Figura 4.** Aquário com tela de contenção do grupo HS.



**Figura 5.** *Potamotrygon* cf. *hystrix* realizando RSA.

### Experimento 1:

Esse experimento foi realizado com **neonatos** da arraia cururu com largura do disco <12 cm (Araújo, 1998) em três rodadas distintas, com duração de 48 horas. Cada rodada foi realizada com uma réplica por tratamento, totalizando seis (6)

aquários por rodada e um número amostral final de seis (N=6) indivíduos por tratamento.

Para tanto, foram utilizados aquários com dimensões de 68,5 x 30 x 39 cm (comprimento x largura x altura) preenchidos com água proveniente de poço artesiano com 62 L de volume e 30 cm de coluna d'água, em um delineamento experimental inteiramente casualizado. A profundidade adotada se aproxima daquela em que as arraias estão em maior densidade em seus ambientes de floresta inundada e ao redor de ilhas (Araújo *et al.*, 2004), na qual elas preferem as margens.

Ao final do período de exposição à hipóxia, as arraias foram retiradas do aquário e anestesiadas com Eugenol na proporção de 1 mL diluído em 2 mL de álcool comercial para cada litro de água (Oliveira *et al.*, 2012). Em seguida, foi feita a imobilização do ferrão (com pinça) para evitar acidentes e uma amostra de sangue foi retirada para análise, através de punção do vaso branquial com seringas contendo EDTA (10%).

## **Experimento 2:**

Juvenis da arraia cururu, com largura do disco até 14 cm (Araújo, 1998), foram selecionados em função dos mesmos apresentarem tamanho comercial dentro do intervalo permitido pelo IBAMA (IN - 204/2008) para fins de ornamentação e exportação.

Para tanto, foram utilizados aquários com dimensões de 78,5 x 36,5 x 45 cm (comprimento x largura x altura) com 100 L de volume e 33,8 cm de coluna d'água, contendo um animal por aquário em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Esse experimento foi realizado em duas rodadas, com duração de 72 horas cada rodada, com duas réplicas por tratamento totalizando nove (9) aquários por rodada e um número amostral de seis (N=6) indivíduos por tratamento.

Para equiparar o decaimento de oxigênio nos aquários dos dois grupos expostos à hipóxia onde o decaimento do oxigênio acontecia de maneira mais lenta no grupo HC em relação aos aquários do grupo HS, foi feito o uso de Sulfito de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) nos aquários do grupo hipóxia com acesso, de acordo com a

necessidade, chegando a um total de no máximo 2,7 g em 100 L de água ao longo de 72 horas. Os animais jovens também foram anestesiados com Eugenol, mas na proporção de 1 mL diluído em 5 mL de álcool comercial para cada 1 litro e meio de água (Oliveira *et al.*, 2012). Em seguida, uma amostra de sangue foi retirada para análise, através de punção do vaso branquial com seringas contendo EDTA (10%).

## **PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS**

### **Registro da frequência espiracular (Fe):**

A frequência espiracular (FE) foi obtida pela contagem do número de movimentos do espiráculo (abertura e fechamento) por minuto, por meio de observação direta a cada 60 minutos (beats/min). Foram realizadas duas contagens por animal por rodada para maior exatidão dos dados. Quando houve divergência de valores, uma terceira contagem foi realizada para a confirmação do dado. Esse mesmo procedimento foi adotado para os dois experimentos.

### **Avaliação dos Parâmetros hematológicos:**

Nos dois experimentos o hematócrito (Ht, %) foi determinado pelo método do microhematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971), utilizando-se amostras de sangue contidas em tubos capilares com EDTA 10%, enquanto que a concentração de hemoglobina sanguínea (Hb, g/dL) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Kampen e Zijlstra, 1964). A contagem de eritrócitos (RBC, milhões/ $\mu$ L sangue) foi determinada por meio de leitura óptica em câmara de Neubauer em amostras de sangue fixadas em formol-citrato, conforme o método habitual utilizado para peixes. Os índices hematológicos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram calculados de acordo com Wintrobe (1933).

## **Metabólitos plasmáticos:**

Após a coleta das amostras, o sangue foi centrifugado para a obtenção do plasma, que foi imediatamente armazenado em ultra freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e conservado até o momento das análises laboratoriais.

Os níveis de glicose foram determinados pelo método da enzima Glicose Oxidase, que em presença de oxigênio produz peróxido de hidrogênio que em presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505 nm.

Os níveis de triglicérides foram hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre que é fosforilado pela glicerol quinase cujo produto sofreu a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produziu peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de p-clorofenol e 4-aminoantipirina, produziu um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção em 500 nm.

Os níveis de colesterol total foram medidos por reação com as enzimas Colesterol Esterase, Colesterol Oxidase e Peroxidase, também seguidas de reação com a 4-Aminoantipirina e leitura do complexo formado em 500 nm.

As proteínas do soro formaram complexos corados com os íons cúpricos em meio alcalino contido no reagente de biureto, através de suas ligações peptídicas. Os complexos resultantes apresentaram máximo de absorção em 545 nm e a intensidade de cor formada foi proporcional à concentração de proteínas no meio.

A ureia foi quantificada pelo método enzimático da urease, onde a ureia é hidrolisada à íons amônio e  $\text{CO}_2$ . Os íons reagiram em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada foi proporcional à quantidade de ureia na amostra e a leitura foi feita em espectrofotômetro em 600 nm.

Os níveis de lactato foram determinados pelo método da Lactato Oxidase com posterior reação com a 4-Aminoantipirina e leitura do complexo formado (quinonimina) em 540 nm. Os valores foram expressos em mmol/L.

Todos os metabólitos mencionados acima foram determinados no Laboratório de Atividade Biológica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, por meio da utilização de kits enzimático-colorimétricos (Katal<sup>®</sup>) específicos para cada

constituente e expressos em mg/dL, com exceção da ureia, na qual foi utilizado kit Labtest® e os níveis expressos em mmol/L assim como o lactato.

Para a determinação dos níveis de amônia total no plasma foi utilizado o método de nesslerização (Gentzkon e Masen, 1942), onde 100 µL de plasma foi desproteinizado com a adição de 900 µL de TCA 20%. Logo após, esse extrato ácido foi centrifugado por 2 min a 3000 rpm e 300 µL do sobrenadante foi usado para o ensaio, ao qual foi adicionado 1700 µL de água destilada e 500 µL de reagente de Nessler. Após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 420 nm, com padrão recém-preparado de amônia (1,0 mM).

Os corpos cetônicos foram mensurados apenas no plasma dos juvenis (experimento 2), por meio do uso de medidor *Optium Xceed* (Abbot®) e tiras individuais, conforme as especificações do fabricante. Os níveis são expressos em mmol/mL.

### **Glicogênio Hepático e Muscular:**

As determinações de glicogênio foram realizadas conforme técnica descrita por Bidinotto, *et al.* (1997), onde amostras de fígado e músculo foram transferidas para um tubo de ensaio na proporção de 100 e 200 mg de tecido, respectivamente, para 1,0 ml de Hidróxido de Potássio 6,0N (KOH) e incubado por 5 minutos em banho-maria a 100°C. Após a dissolução dos tecidos, 250 µl deste extrato foram transferidos para outro tubo onde foram adicionados 3 ml de etanol-água 95%, e 100 µl de Sulfato de Potássio 10 % (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) seguidos de agitação. Logo após, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 12000 rpm, e então o sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado ressuspenso em 2,5 ml de água destilada. Feito isso, uma alíquota de 200 µl foi utilizada para determinação de glicose pelo método de Dubois *et al.* (1956). Esta análise consiste na adição de 300 µL de Fenol 3 %, à amostra, e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de reação foram colocados em banho-maria fervente por 2 minutos, e após o resfriamento, a leitura óptica foi realizada em 480 nm com um padrão de glicose de 100 µmoles/L. O conteúdo de glicogênio está expresso em µmoles de glicosil-glicose/mg de tecido.

### **Parâmetros físico-químicos da água:**

Os parâmetros da água como, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e condutividade foram mensurados com um aparelho multiparamétrico Thermo Orion Five Star (USA). Os níveis (mg/L) de amônia total ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ) foram determinados por meio de kit comercial LabconTest, e o teor de  $\text{NH}_3$  (mg/L) foi determinado de acordo com as instruções do fabricante.

### **Análise estatística:**

Os resultados estabelecidos para cada grupo foram testados por análise de variância (ANOVA) e teste a posteriori de Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas quando o nível de significância foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

No experimento 1 com os neonatos, os valores de hematócrito e de CHCM foram log transformados para serem submetidos ao teste paramétrico. No experimento 2 com os juvenis somente os valores de glicose plasmática foram log transformados.

Foi usado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn, para os dados que não apresentaram uma distribuição normal, mesmo após serem transformados, sendo no experimento 1 a ureia e amônia plasmáticas e o glicogênio hepático. No experimento 2, as variáveis submetidas ao teste não paramétrico foram a glicose, corpos cetônicos, ureia e amônia plasmáticas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Condições experimentais

As arraia neonatos utilizadas neste experimento apresentaram peso variando entre 35 e 65 gramas. O comprimento total apresentou intervalo de 17 a 21 cm, esses valores foram condizentes com a largura do disco que apresentou valores entre 9 e 11 cm (Tabela 1). Não houve diferença estatística na biometria dos neonatos entre os tratamentos. As arraia juvenis utilizadas para esse estudo também não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao peso, comprimento total e largura do disco, cujos valores estão apresentados na Tabela 2.

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários estão apresentados na Tabela 3 para neonatos e na Tabela 4 para juvenis. O aumento no valor médio da condutividade no grupo HC do experimento com juvenis se deu pela adição de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) amplamente usado para auxiliar no decaimento dos níveis de oxigênio (Kramer e McClure, 1982; Melnychuck e Chapman, 2002) para que não houvesse diferença temporal em relação ao grupo HS.

Os valores médios de oxigênio dissolvido estão apresentados na Figura 6 em função do tempo nos três tratamentos (48 horas) para neonatos e na Figura 7 para juvenis (72 horas). Foi possível observar que os níveis de  $\text{O}_2$  ficam abaixo de 4,0 mg/L após cerca de 10 horas de experimento com os neonatos, sendo assim, esses animais ficaram expostos à hipóxia cerca de 36 horas. Nos juvenis o  $\text{O}_2$  fica abaixo de 4,0 mg/L após cerca de 25 a 30 horas, sendo que o tempo de exposição à hipóxia foi de cerca de 47 horas.

**Tabela 1.** Biometria dos indivíduos neonatos da arraia cururu (*P. cf. hystrix*), submetidos à hipóxia gradual.

Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
<b>Peso (g)</b>	42,58 ± 3,88	37,50 – 48,50	44,25 ± 3,67	41,50 – 51,00	46,58 ± 9,97	35,00 – 65,00
<b>Comprimento Total (cm)</b>	18,22 ± 0,63	17,20 – 19,00	19,18 ± 0,73	18,20 – 20,40	18,92 ± 1,08	18,00 – 21,00
<b>Largura do Disco (cm)</b>	9,83 ± 0,27	9,50 – 10,10	10,18 ± 0,31	9,90 – 10,70	9,97 ± 0,71	9,00 – 11,20

**Tabela 2:** Biometria de indivíduos juvenis da arraia cururu (*P. cf. hystrix*), submetidos à hipóxia gradual.

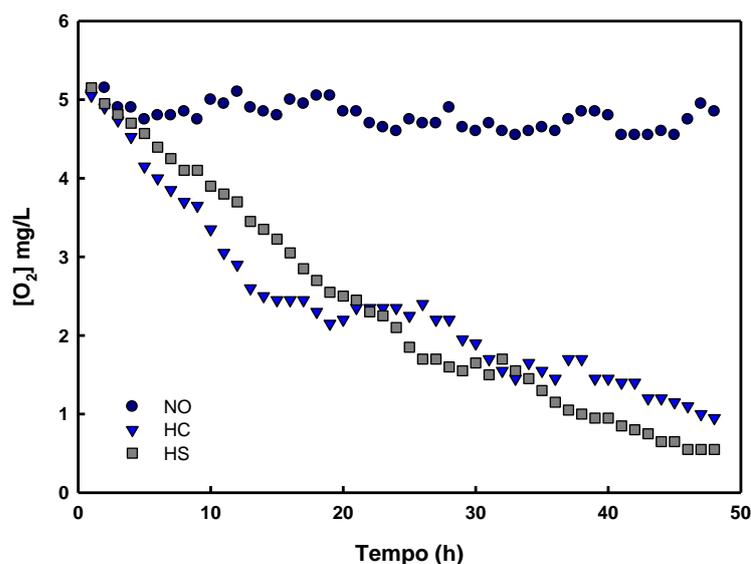
Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
<b>Peso (g)</b>	117,83 ± 13,04	100,00 – 135,00	105,00 ± 20,74	90,00 – 140,00	114,17 ± 33,53	65,00 – 160,00
<b>Comprimento Total (cm)</b>	25,07 ± 1,31	23,30 – 26,70	24,07 ± 2,14	21,00 – 27,40	23,98 ± 2,51	20,50 – 27,80
<b>Largura do Disco (cm)</b>	13,45 ± 0,67	12,70 – 14,30	13,10 ± 0,76	12,20 – 14,40	13,12 ± 1,45	11,00 -15,00

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos dos aquários contendo os neonatos da arraia cururu ao final de 48 horas de experimento.

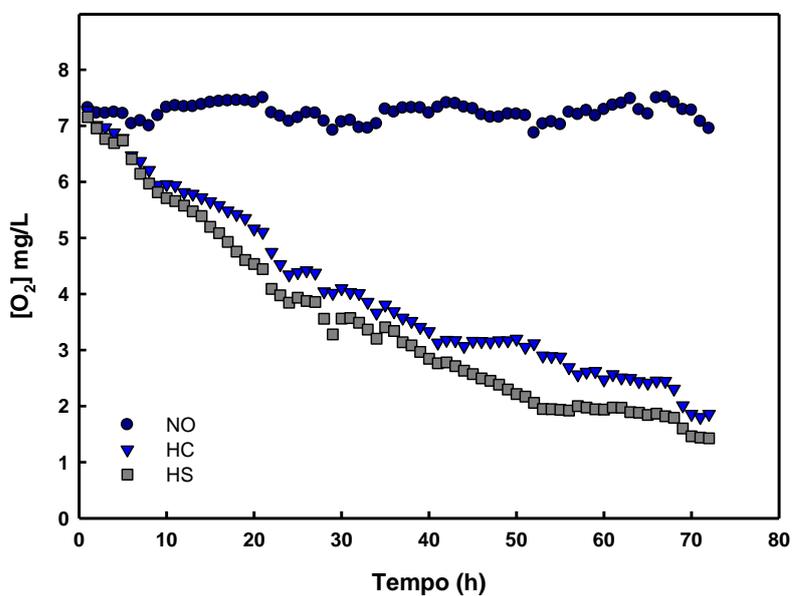
Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
Temperatura (°C)	26,06 ± 0,54	25,10 – 27,20	26,43 ± 0,53	25,40 – 27,70	26,63 ± 0,33	26,00 – 27,50
Condutividade (uS/cm)	19,77 ± 1,37	17,34 – 22,90	19,33 ± 1,84	15,88 – 23,20	19,97 ± 2,19	15,86 – 24,90
pH	5,95 ± 0,25	5,53 – 6,70	5,96 ± 0,23	5,54 – 6,66	5,81 ± 0,15	5,41 – 6,11

**Tabela 4.** Parâmetros físico-químicos dos aquários ao longo de 72 horas de experimento com indivíduos juvenis de arraia cururu.

Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
Temperatura (°C)	27,11 ± 0,76	26,00 – 28,9	27,31 ± 0,85	26,10 – 28,90	27,22 ± 0,78	26,10 – 28,60
Condutividade (uS/cm)	15,40 ± 3,04	10,11 – 25,41	36,87 ± 13,76	9,77 – 87,90	18,10 ± 3,08	11,39 – 54,20
pH	6,69 ± 0,15	6,34 – 7,03	6,56 ± 0,15	6,20 – 6,99	6,53 ± 0,20	6,02 – 7,33
Amônia Total (mg/L)	0,50 ± 0,32	0,25 – 1,00	0,73 ± 0,54	0,25 – 2,00	0,75 ± 0,52	0,25 – 2,00
NH <sub>3</sub> (mg/L)	0,002 ± 0,001	0,001 – 0,003	0,002 ± 0,002	0,001 – 0,006	0,002 ± 0,001	0,001 – 0,006



**Figura 6.** Média de decaimento da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L) na água dos aquários (N=6 para cada tratamento) dos neonatos ao longo das 48 horas de exposição gradual à hipóxia.



**Figura 7.** Média de decaimento da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L) na água dos aquários (N=6 para cada tratamento) dos juvenis da arraia cururu ao longo das 72 horas de exposição gradual à hipóxia.

Com exceção dos níveis de oxigênio, houve pouca variação nos parâmetros mensurados nos aquários de cada tratamento e entre os tratamentos em ambos os experimentos. A amplitude de variação destes parâmetros está de acordo com o observado em ambiente natural (oxigênio dissolvido (mg/dL): 3,7 – 4,6; temperatura (°C): 26,5 – 29,8; pH: 3,7 – 6,4) para a arraia cururu, com exceção da condutividade principalmente do grupo HC do experimento com juvenis, que foi maior (devido à adição de sulfito de sódio) do que a observada nas águas do Rio Negro e afluentes (7,7 – 35,4  $\mu$ S/cm), nos quais a arraia cururu é encontrada (Oliveira, 2008; Duncan e Fernandes, 2011). Isso indica que as respostas apresentadas pelas arraias (frequência espiracular, variáveis hematológicas e metabólitos estudados) são resultado do efeito direto da exposição à hipóxia progressiva nestes animais.

Em decorrência da oscilação do nível dos rios amazônicos, as concentrações de oxigênio dissolvido na água se tornam fatores críticos, principalmente nos ambientes recém-alagados de várzea e igapó, quando os rios atingem seus níveis máximos (Junk *et al.*, 1989). Muitos corpos d'água amazônicos são conhecidos como ambientes hipóxicos, pois apresentam quantidades limitantes de oxigênio dissolvido (Schmidt, 1973; Kramer *et al.*, 1987).

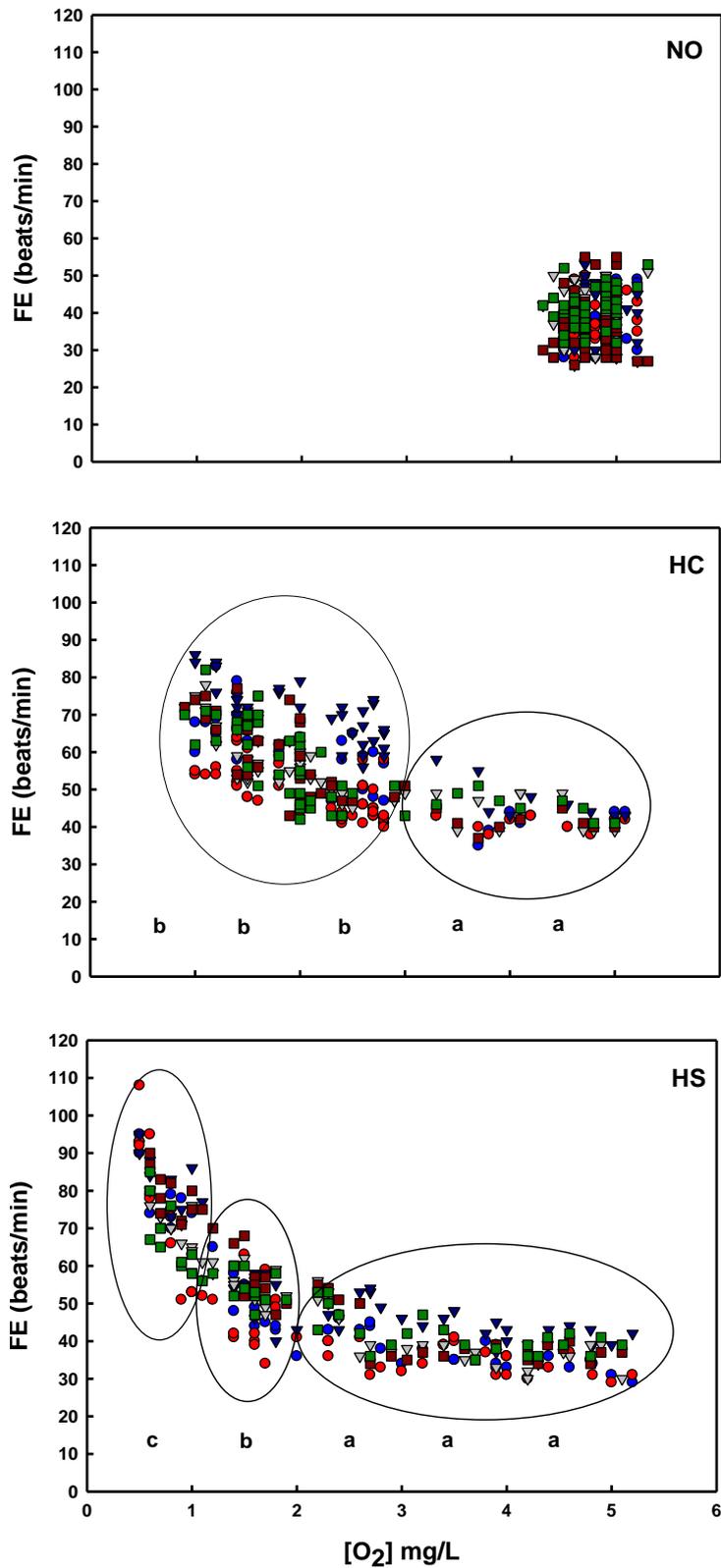
As variações limnológicas nos ambientes hipóxicos favoreceram o desenvolvimento de mecanismos adaptativos eficientes que permitem que os peixes sobrevivam em condições ambientais extremas (Almeida-Val e Hochachka, 1995). O espectro de respostas apresentadas, principalmente pelas espécies tropicais, sugere que a eficiência dos mecanismos de tolerância à hipóxia seja uma característica comum aos peixes da Amazônia (Val, 1993; Almeida-Val *et al.*, 1995). No entanto, estas adaptações são pouco conhecidas entre os elasmobrânquios de água doce (Barcellos, 1997).

### **Frequência Espiracular:**

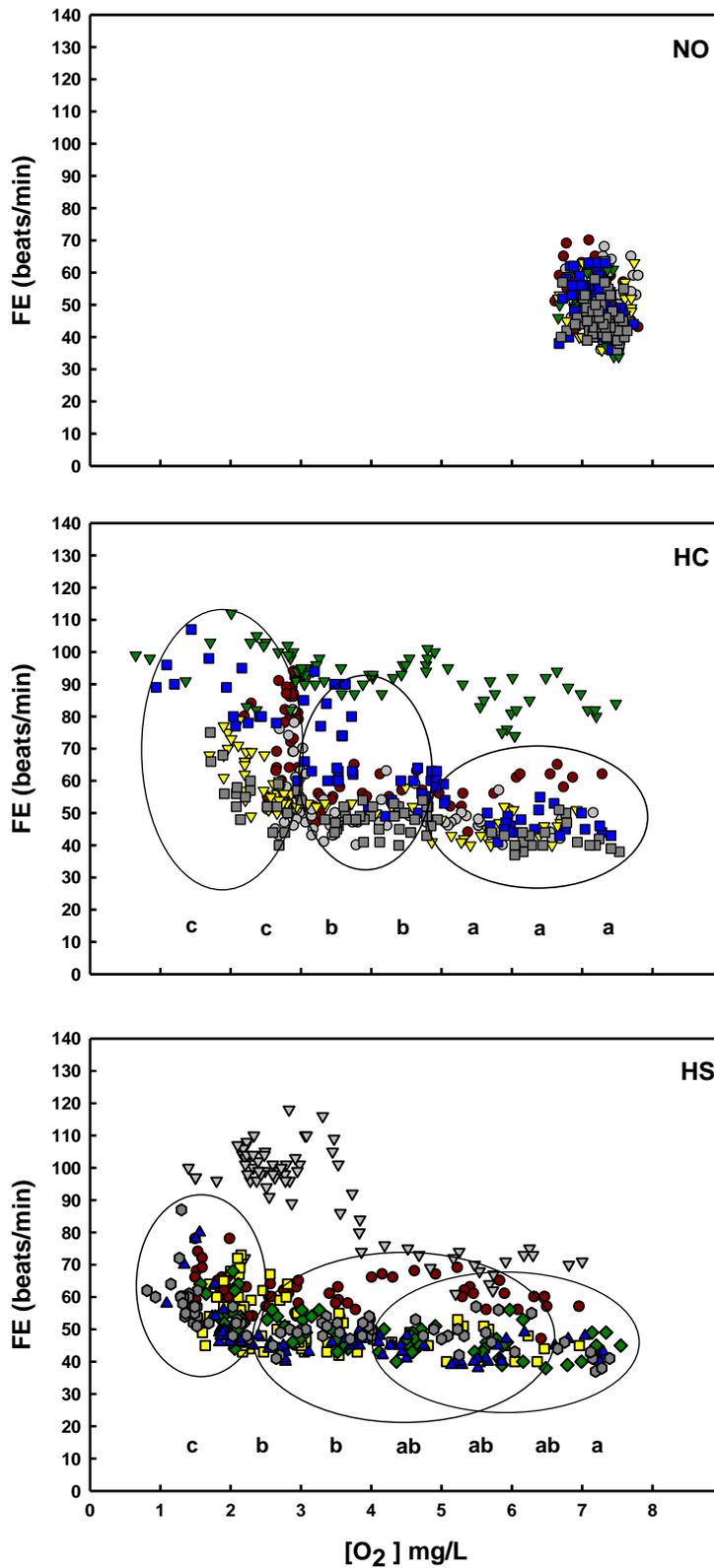
Os dados da frequência espiracular (FE) dos neonatos estão apresentados na Figura 8. Nos animais mantidos em NO a FE oscilou entre 26 e 55 beats/min ao longo das 48 horas de experimento. No grupo HC a FE variou de 35 a 55 beats/min, até os níveis de O<sub>2</sub> atingirem 3,0 mg/L. Abaixo desse nível de oxigenação a FE

aumentou significativamente e a variação ficou entre 40 e 86 beats/min. Nos animais do grupo HS a FE variou de 29 a 56 beats/min, até os níveis de O<sub>2</sub> atingirem 2,0 mg/L. Abaixo desse nível de oxigenação até 1,0 mg/L a FE aumentou, com variação entre 34 e 86 beats/min, e voltou a subir quando os níveis de O<sub>2</sub> caíram abaixo de 1,0 mg/L, variando entre 51 e 108 beats/min.

Quanto a frequência espiracular dos animais juvenis mantidos em normóxia oscilou entre 34 e 70 beats/min ao longo das 72 horas de experimento, porém percebe-se uma maior concentração de dados entre 40 e 60 beats/min. Nos animais do grupo hipóxia com acesso a FE variou de 37 a 59 beats/min até os níveis de oxigênio atingirem 5,0 mg/L e então, houve um aumento até atingir 3,0 mg/L, com valores entre 40 e 94 beats/min. Abaixo desse nível de oxigenação a FE voltou a subir, variando de 40 a 107 beats/min. No grupo hipóxia sem acesso houve um incremento na FE quando os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido estavam entre 4,0 e 2,0 mg/L (FE = 40 a 95 beats/min) em relação à FE até 7,0 mg/L (FE = 38 a 62 beats/min). Abaixo de 2,0 mg/L a FE voltou a subir, alcançando valores entre 56 e 107 beats/min. Os dados das frequências espiraculares dos animais submetidos aos três tratamentos estão apresentados na Figura 9.



**Figura 8.** Frequência espiracular de neonatos de arraia cururu em função da concentração de  $O_2$ . Cada símbolo corresponde a um animal. Foi utilizada análise não paramétrica de Kruskal-Wallis com teste a posteriori de Dunn. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ). Os círculos agrupam os dados estatisticamente iguais.



**Figura 9.** Frequência espiracular de juvenis da arraia cururu em função da concentração de  $O_2$ . Cada símbolo corresponde a um animal. Foi utilizada análise não paramétrica de Kruskal-Wallis com teste a posteriori de Dunn. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ). Os círculos agrupam os dados estatisticamente iguais. Os animais ( $\blacktriangledown$ ) do grupo HC e ( $\blacktriangledown$ ) do grupo HS não foram incluídos nas análises estatísticas.

Foi observada variabilidade nas respostas da frequência espiracular (FE) entre os indivíduos, o que fica bem evidente nos grupos HC e HS no experimento com os juvenis, onde em cada tratamento houve um animal que mostrou comportamento ventilatório evidentemente diferente dos demais. A respeito da FE em condições normóxicas, a variação observada para neonatos e juvenis da arraia cururu abrange valores encontrados para outros elasmobrânquios em normóxia, como os tubarões *Scyliorhinus canicula* com frequência ventilatória igual a 34 beats/min (Metcalf e Butler, 1984), *Hemisyllium ocellatum*, com médias oscilando entre 29,9 e 36,4 beats/min (Chapman *et al.*, 2011; Routley *et al.*, 2002), *Chiloscyllium punctatum* com média de 24,4 beats/min (Chapman *et al.*, 2011) e *Squalus acanthias* com frequências variando entre 27 e 31 beats/min no período prévio à exposição aos hormônios (Perry e Gilmour, 1996) e uma espécie de arraia marinha, *Raja ocellata*, com cerca de 20 beats/min, na qual as medidas da FE também foram feitas por contagem direta dos movimentos do espiráculo (Graham *et al.*, 1990).

Quando as concentrações de oxigênio caem abaixo de 3,0 mg/L nos neonatos e de 5,0 mg/L nos juvenis, no grupo HC e abaixo de 2,0 mg/L no grupo HS dos neonatos e de 4,0 mg/L nos juvenis, se observa um aumento das frequências espiraculares, a exemplo do reportado para *Scyliorhinus canicula*, que demonstrou um aumento de sua frequência basal (34 beats/min) para 50,5 beats/min, após indução rápida (1 hora) à uma condição de hipóxia moderada (~4 mg/L; Metcalf e Butler, 1984), para o tubarão epaulette com média de 74 beats/min quando exposto à hipóxia com concentrações de oxigênio de  $2,16 \pm 0,10$  mg/L e de 79,5 beats/min quando com 1,25 mg/L de oxigênio dissolvido (Routley *et al.*, 2002). De forma diferente, *Mustelus norrisi* apresentou uma diminuição da frequência respiratória de em média 61 beats/min em 4,0 mg/L para 55 beats/min em 3,0 mg/L (Carlson e Parsons, 2001).

A exemplo do trabalho de Metcalf e Butler (1984), apesar de não havermos mensurado o volume de ventilação, se observa claramente um aumento na amplitude da abertura dos espiráculos em ambos neonatos e juvenis submetidos à hipóxia severa (< 3,0 mg/L).

Peixes tolerantes à hipóxia enfrentam condições de baixa disponibilidade de oxigênio muitas vezes alterando seu comportamento, como por exemplo, realizando

a respiração na superfície aquática (RSA) (Rantin e Kalinin, 1996; Soares *et al.*, 2006). No presente trabalho foi possível confirmar as observações comportamentais registradas por Barcellos (1997), na qual a mesma espécie, a arraia cururu, tem a capacidade de realizar a RSA. Entretanto, mesmo não tendo sido quantificada, foi possível perceber que este comportamento foi realizado por poucos indivíduos expostos à hipóxia, em uma frequência baixa, na maioria das vezes, manifestado quando os níveis de O<sub>2</sub> estavam abaixo de 1,0 mg/L. Porém, as arraias expostas à hipóxia com acesso à superfície procuravam frequentemente nadar próximas à superfície da água, e muitas delas apresentavam um movimento vertical, do fundo até à superfície, rentes às paredes dos aquários, não sendo esses movimentos similares ao padrão descrito por Barcellos (1997) para a mesma espécie. Mesmo assim, pode ser um modo alternativo para explorar a camada mais oxigenada em contato direto com a atmosfera. Outro aspecto interessante foi o fato da respiração na superfície aquática ter sido mais comum aos neonatos, sugerindo que, em seu ambiente natural, os juvenis “aprenderam” a lidar com eventos sucessivos de exposição à hipóxia, tanto em intervalos diários, quanto sazonais vinculados ao nível das águas.

### **Hematologia:**

Os neonatos da arraia cururu quando expostos à hipóxia, ajustam algumas propriedades do sangue para lidar com essa situação, fato que não se observa nos juvenis. O hematócrito foi significativamente maior nos animais do grupo HC em relação aos do grupo HS, no entanto, não houve diferença entre os tratamentos HC e HS em relação à normóxia. Não houve diferenças significativas nos valores de hemoglobina entre os tratamentos. Entretanto, a contagem de eritrócitos foi significativamente maior no grupo NO em relação ao grupo HS, mas não apresentou diferença em relação ao grupo HC o qual também não diferiu de HS (Tabela 5).

Quanto aos índices hematológicos, o volume corpuscular médio (VCM) se mostrou menor no grupo normóxia, em relação a ambos HC e HS. Por outro lado, estes não diferiram entre si. Os valores de hemoglobina corpuscular média (HCM)

foram maiores no grupo hipóxia sem acesso em relação aos tratamentos normóxia e hipóxia com acesso, que não apresentaram diferenças entre si. Em relação à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 5).

Ao contrário dos neonatos, os valores de hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM das arraias juvenis não apresentaram diferenças estatísticas nos seus valores entre os tratamentos. Quanto ao número de eritrócitos, não se observa diferenças do grupo NO em relação aos tratamentos HC e HS, porém HS se apresentou estatisticamente menor do que HC (Tabela 6).

O tubarão epaulette e a arraia-viola (*Aptychotrema rostrata*) também não apresentaram mudanças no hematócrito, concentração de hemoglobina e no CHCM em resposta à hipóxia progressiva (Speers-Roesch *et al.*, 2012a). No trabalho de Routley *et al.* (2002) o mesmo tubarão epaulette não alterou seu hematócrito em resposta à hipóxia. A falta de uma mudança no hematócrito ou concentração de hemoglobina durante a hipóxia progressiva é consistente com estudos anteriores com outros elasmobrânquios podendo assim, os ajustes destes parâmetros terem um papel mínimo na melhoria do transporte de O<sub>2</sub> em elasmobrânquios expostos à hipóxia (Speers-Roesch *et al.*, 2012a).

Também não foram observadas mudanças no hematócrito, contagem de eritrócitos e VCM da própria arraia cururu (*Potamotrygon cf. hystrix*) submetida ao estresse pelo transporte em 24 horas, no estudo de Brinn *et al.* (2012). Segundo esses mesmos autores, a ausência de mudanças significativas nas variáveis sanguíneas em resposta ao transporte poderia indicar que arraias de água doce, bem como outras espécies de elasmobrânquios, não respondem da mesma forma à síndrome do estresse geral observada em vários teleósteos de água doce, com aumento de corticosteroides e catecolaminas, seguido de aumento da glicemia, elevação dos níveis plasmáticos de lactato, distúrbios osmorregulatórios e mudanças nos parâmetros hematológicos, em especial do hematócrito (por edema celular) e do número de eritrócitos (por contração esplênica decorrente da estimulação adrenérgica).

**Tabela 5.** Respostas hematológicas de neonatos da arraia cururu após exposição gradual à hipóxia ao longo de 48 horas. Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
<b>Hematócrito (%)</b>	20,60 ± 4,31 <b>a</b>	15,39 – 26,47	29,93 ± 6,78 <b>a, b</b>	24,62 – 42,86	19,72 ± 7,75 <b>a, c</b>	11,11 – 31,43
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	2,32 ± 0,66 <b>a</b>	1,72 – 3,56	3,56 ± 2,14 <b>a</b>	1,66 – 7,02	3,01 ± 1,23 <b>a</b>	1,53 – 4,56
<b>Eritrócitos (milhões/<math>\mu</math>L)</b>	0,55 ± 0,14 <b>a</b>	0,31 – 0,71	0,39 ± 0,14 <b>a, b</b>	0,29 – 0,65	0,24 ± 0,07 <b>b</b>	0,15 – 0,35
<b>VCM (fL)</b>	420,60 ± 234,89 <b>a</b>	243,12 – 867,87	817,12 ± 170,69 <b>b</b>	493,18 – 952,44	847,95 ± 334,18 <b>b</b>	376,61 – 1372,00
<b>HCM (pg)</b>	45,39 ± 18,35 <b>a</b>	24,44 – 70,85	75,11 ± 21,95 <b>a *</b>	49,68 – 108,88	122,65 ± 33,35 <b>b</b>	90,57 – 176,14
<b>CHCM (g/dL)</b>	11,43 ± 2,83 <b>a</b>	8,16 – 15,14	12,01 ± 7,27 <b>a</b>	6,14 – 22,08	16,04 ± 5,57 <b>a</b>	7,45 – 24,05

\* N=5 para o grupo HC.

**Tabela 6.** Parâmetros e índices hematológicos de juvenis da arraia cururu ao longo 72 horas de exposição gradual à hipóxia. Letras diferentes representam diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Parâmetro	Normóxia (N=6)		Hipóxia com acesso (N=6)		Hipóxia sem acesso (N=6)	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
<b>Hematócrito (%)</b>	19,57, ± 2,31 <b>a</b>	15,79 – 21,62	25,40 ± 6,89 <b>a</b>	16,22 – 35,14	26,50 ± 6,72 <b>a</b>	18,42 – 35,14
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	3,33 ± 0,68 <b>a</b>	2,35 – 4,34	3,61 ± 0,37 <b>a</b>	3,17 – 4,13	3,46 ± 0,44 <b>a</b>	2,86 – 4,13
<b>Eritrócitos (milhões/<math>\mu</math>L)</b>	0,28 ± 0,06 <b>a*</b>	0,22 – 0,37	0,33 ± 0,03 <b>a, b</b>	0,29 – 0,38	0,26 ± 0,03 <b>a, c</b>	0,23 – 0,31
<b>VCM (fL)</b>	669,61 ± 140,19 <b>a</b>	517,70 – 823,27	817,55 ± 290,30 <b>a</b>	470,14 – 1313,81	1054,46 ± 338,12 <b>a</b>	594,19 – 1464,78
<b>HCM (pg)</b>	112,79 ± 23,12 <b>a</b>	77,07 – 131,96	110,87 ± 11,24 <b>a</b>	97,33 – 126,69	135,98 ± 23,93 <b>a</b>	105,03 – 159,97
<b>CHCM (g/dL)</b>	16,91 ± 1,92 <b>a</b>	14,89 – 20,06	15,10 ± 5,90 <b>a</b>	8,40 – 25,47	13,65 ± 3,21 <b>a</b>	9,27 – 17,68

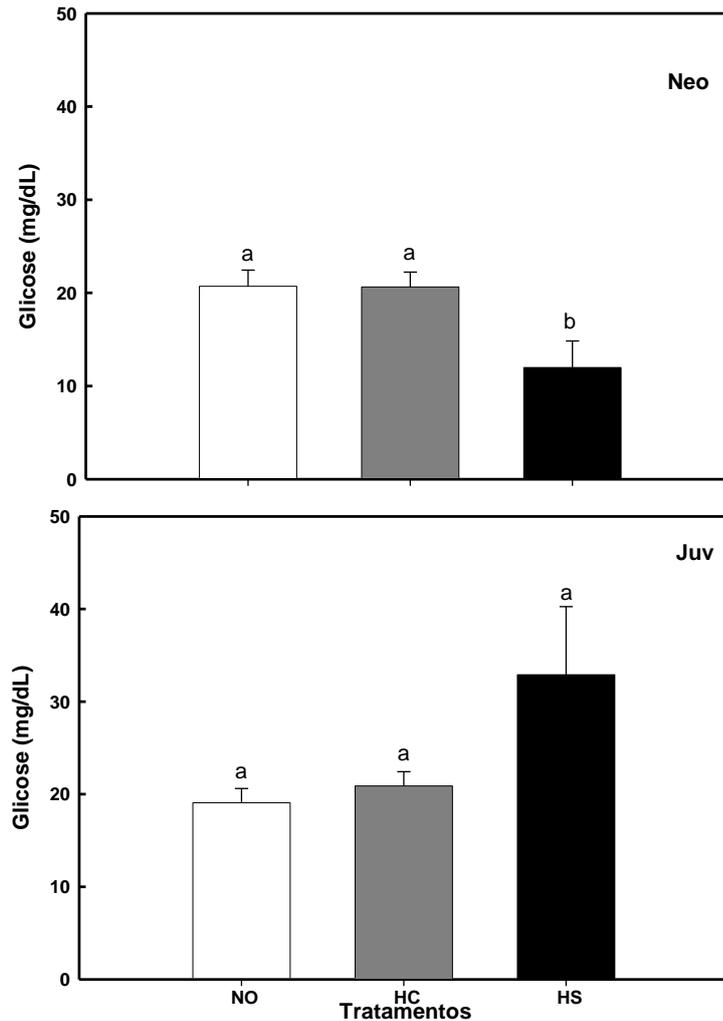
\* N=5 para o número eritrócitos no grupo Normóxia.

Dada à diversidade dos níveis de atividade e padrões de história de vida dos elasmobrânquios, uma resposta “típica” ao estresse para o grupo é improvável. Há indícios, em alguns estudos realizados até o momento (Manire *et al.*, 2001; Mandelman e Skomal, 2009), que as respostas fisiológicas ao estresse para experimentos padronizados é altamente variável entre espécies estreitamente relacionadas de elasmobrânquios (Skomal e Mandelman, 2012).

### **Metabólitos Plasmáticos:**

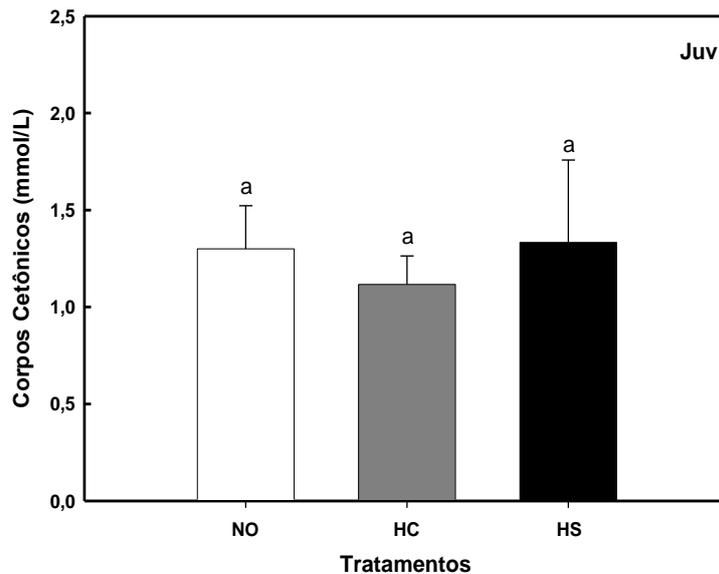
Aparentemente, a maioria dos teleósteos aumenta seus níveis de glicose no sangue em resposta a condições estressantes, como a exposição à hipóxia (McDonald e Milligan, 1992; Routley *et al.*, 2002), porém isso não vem sendo observado em elasmobrânquios, como no tubarão epaulette (Routley *et al.*, 2002; Speers-Roesch *et al.*, 2012a), na arraia-viola (Speers-Roesch *et al.*, 2012a), nem tão pouco na arraia cururu submetida ao estresse de 24 horas de transporte (Brinn *et al.*, 2012), o que se repetiu nas arraias juvenis desse estudo que mantiveram seus níveis de glicose plasmática constantes e nos neonatos, onde na verdade o que ocorreu foi uma queda nos níveis de glicose no grupo HS (Figura 10), provavelmente essa glicose tenha sido utilizada ao longo da exposição.

Routley *et al.* (2012) sugerem que apesar do tubarão epaulette manter um nível de glicose constante no plasma, poderia estar liberando glicose adicional (provavelmente a partir de estoques de glicogênio no fígado), a fim de equilibrar um aumento da utilização de glicose pelos tecidos sem realmente aumentar os níveis circulantes no sangue. Isso explicaria em parte o fato dos juvenis da arraia cururu não alterarem seus níveis de glicose no plasma, mesmo com a depleção expressiva dos estoques de glicogênio presentes no músculo destes animais (Figura 19).



**Figura 10.** Níveis plasmáticos de glicose em arraias cururu neonatos (Neo) e juvenis (Juv) após 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. N = 6 para todos (exceto para o grupo HS do experimento 1; N = 5). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Speers-Roesch e Treberg (2010) descrevem que elasmobrânquios aparentemente usam com frequência corpos cetônicos e aminoácidos como combustíveis oxidativos em condições rotineiras, o que também explicaria a manutenção dos níveis estáveis de glicose no plasma dos indivíduos juvenis de *P. cf. histrix*. Ainda assim, os níveis de corpos cetônicos (quantificados como  $\beta$ -hidroxibutirato), desses animais não sofreram alterações em decorrência da exposição à hipóxia gradual (Figura 11).



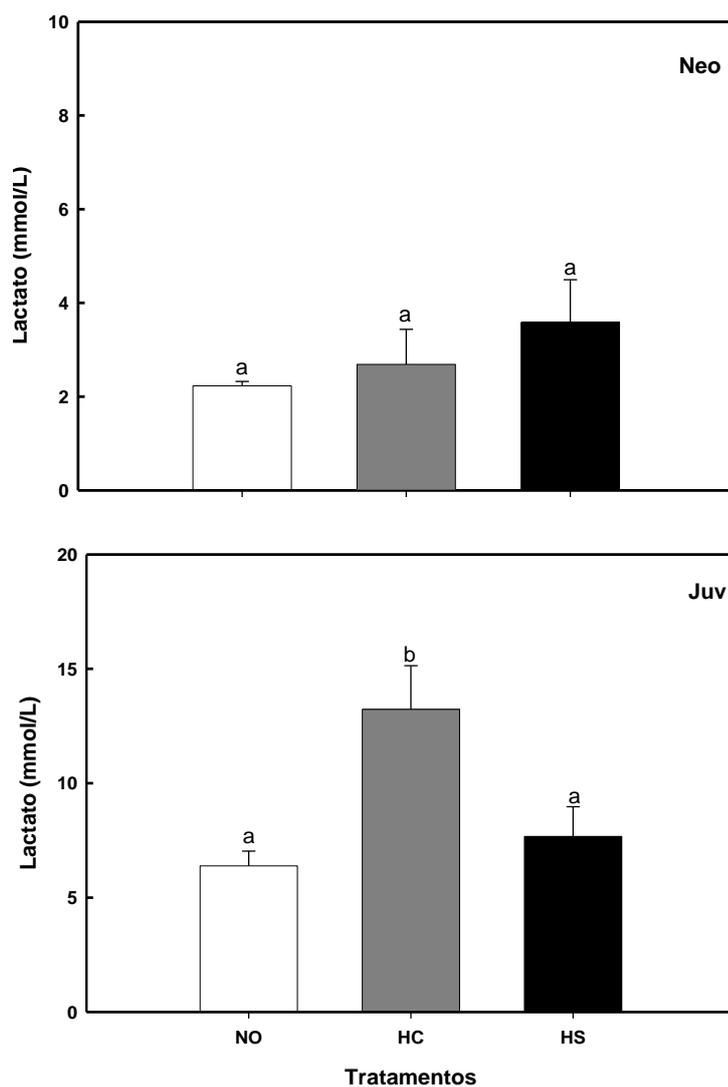
**Figura 11.** Níveis plasmáticos de corpos cetônicos ( $\beta$ -hidroxibutirato) em juvenis de arraia cururu ( $n = 6$ ) após 72 horas de exposição à hipóxia. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. Foi utilizado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com teste a posteriori de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Essa ausência de resposta, em relação às concentrações de  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB) à hipóxia também foi observada no tubarão epaulette e na arraia-viola expostos à hipóxia gradual (Speers-Roesch *et al.*, 2012a). Porém, quando o tubarão epaulette foi exposto por 2 e 4 horas a 2,0 kPa ( $\sim 1,0$  mg/L) e por 2 horas à 1,0 kPa ( $\sim 0,5$  mg/L) de oxigênio, houve uma queda nos níveis de  $\beta$ -HB em relação ao controle em normóxia. Por outro lado, a arraia-viola continuou mantendo estáveis os seus níveis de  $\beta$ -HB quando exposta por 2 e 4 horas em 3,1 kPa ( $\sim 1,55$  mg/L) de oxigênio dissolvido (Speers-Roesch *et al.*, 2012b).

Os níveis plasmáticos de  $\beta$ -HB nos elasmobrânquios parecem variar bastante entre as espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Nesse estudo foram encontrados valores de 0,60 a 3,30 mmol/L para os juvenis de arraia cururu. No tubarão *Squalus acanthias* os níveis variaram de 2,97 a 5,73  $\mu\text{mol/mL}$  (= mmol/L), respectivamente logo após a cirurgia para a colocação de uma cânula na aorta dorsal e cinco dias após. E quando a solução salina foi injetada uma única vez, como controle da injeção de insulina (50, 100 e 250 unidades), a variação de  $\beta$ -HB foi de 4,5  $\mu\text{mol/mL}$  imediatamente e 8,5  $\mu\text{mol/mL}$  após nove dias (deRoos *et al.*,

1985). No tubarão epaulette exposto à hipóxia os valores pré-exposição variaram de 0,69 a 0,97 mmol/L e, na arraia-viola, de 0,12 a 0,23 mmol/L (Speers-Roesch *et al.*, 2012a; Speers-Roesch *et al.*, 2012b).

Os níveis de lactato dos indivíduos neonatos não sofreram alterações pela exposição à hipóxia. Já nos juvenis houve um aumento dos níveis no grupo HC em relação aos demais, mas não houve diferenças entre NO e HS (Figura 12).

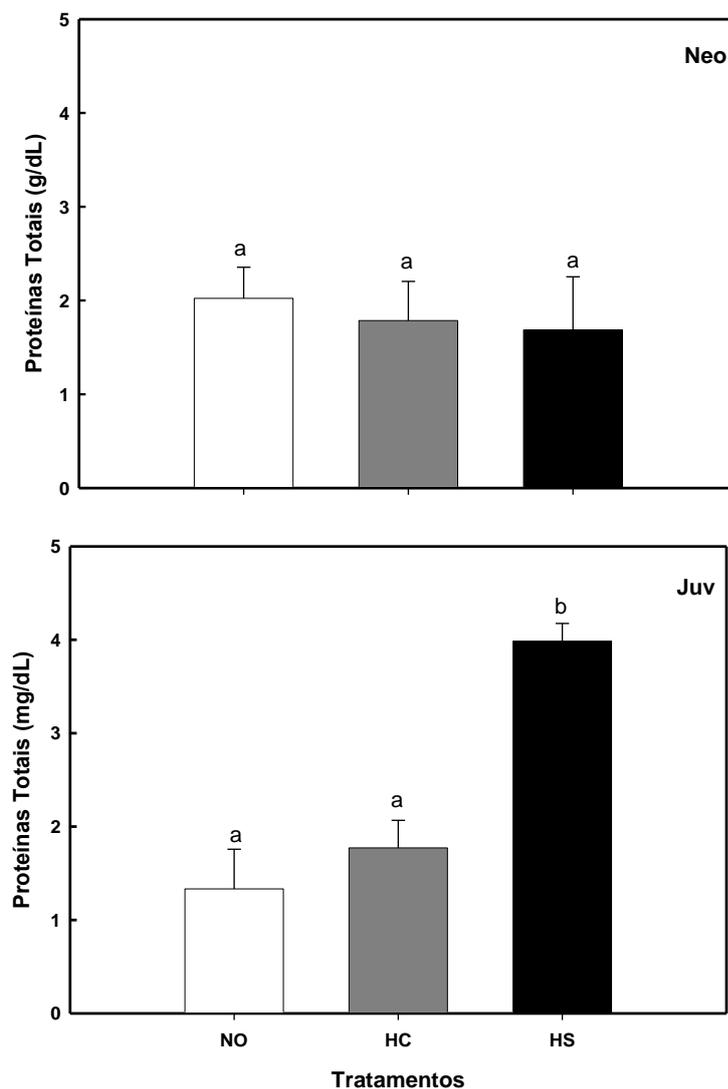


**Figura 12.** Níveis plasmáticos de lactato em arraias cururu neonatos (Neo) e juvenis (Juv) após 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. N = 6 para todos (exceto para o grupo HC do experimento 2, com N = 5). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Assim como ocorreu no grupo HC dos juvenis, também foi observado aumento nos níveis de lactato no tubarão epaulette, a partir do momento em que os níveis de oxigênio na água atingiram a concentração crítica para esse animal (entre 2,2 e 1,7 mg/L; Routley *et al.*, 2002; Speers-Roesch *et al.*, 2012a). Já a arraia-viola aumentou seus níveis de lactato em concentrações abaixo de sua concentração crítica de oxigênio (~3,6 mg/L; Speers-Roesch *et al.*, 2012a). A ausência de aumento nos níveis de lactato nos neonatos é interessante e parece indicar que nas fases iniciais de vida a arraia cururu não investe suas estratégias na mobilização de glicogênio, via metabolismo anaeróbico, mesmo com uma reserva de glicogênio expressiva no fígado e músculo (Figura 18). Por outro lado, os juvenis já acionam esta estratégia, principalmente quando os mesmos possuem mobilidade livre e acesso à superfície da coluna d'água. Nesse sentido, é importante ressaltar que os níveis de lactato encontrados nos juvenis da arraia cururu ainda em condições normóxicas são pelo menos 2,5 vezes maiores do que os encontrados nos indivíduos neonatos nas mesmas condições, o que poderia indicar que os indivíduos juvenis, talvez por já terem sido expostos a condições de baixa disponibilidade de oxigênio no seu ambiente natural, possuam um melhor ajuste do seu metabolismo anaeróbico. Por outro lado, não pode ser descartada a possibilidade de este aumento ser decorrente do maior tempo de exposição (72 horas) ao qual os juvenis foram submetidos.

A quantidade de proteínas totais encontrada no plasma das arraias desse estudo está de acordo com o que já foi determinado para a espécie por Oliveira (2008) e não sofreram variações nos neonatos pela exposição à hipóxia gradual em 48 horas. Entretanto, houve um aumento significativo nos níveis de proteínas totais dos juvenis no grupo HS em relação aos demais (Figura 13).

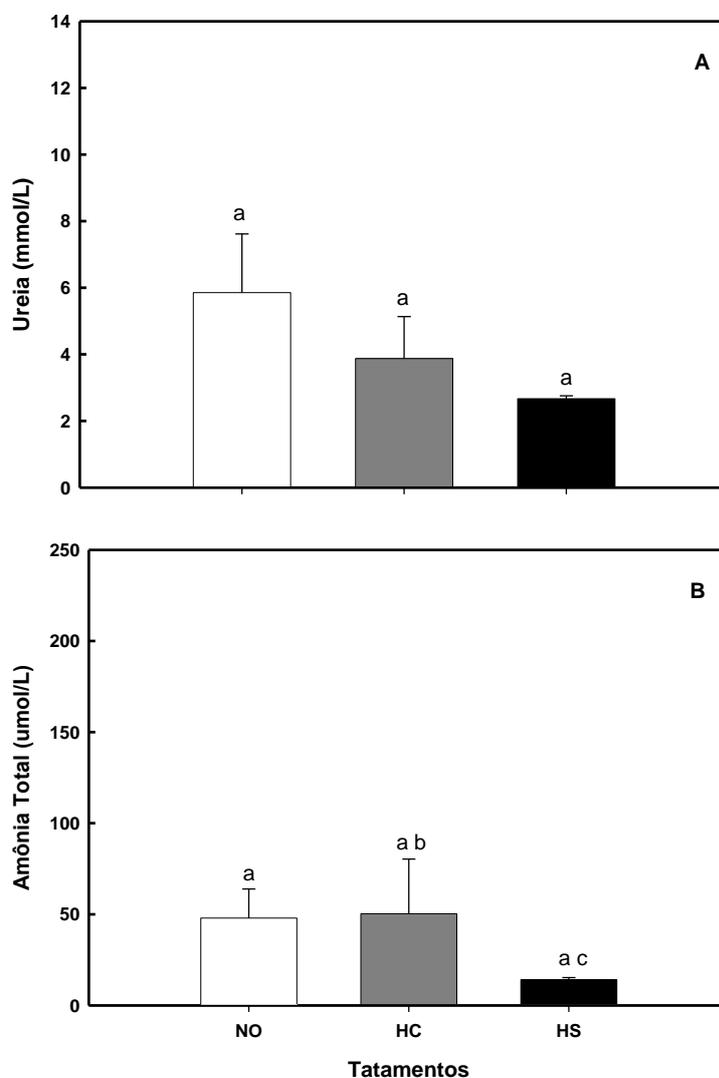
O aumento das proteínas totais observado nos juvenis do grupo HS parece não se dar em função de um desequilíbrio osmótico no plasma, tendo em vista que o volume celular (VCM) não foi alterado. Nem tampouco podemos afirmar que essas proteínas estão sendo produzidas para serem catabolizadas e os aminoácidos mobilizados para atuarem como combustíveis oxidativos (Speers-Roesch e Treberg, 2010), pois não houve aumento concomitante nos níveis de ureia e amônia plasmáticas (Figuras 14 e 15).



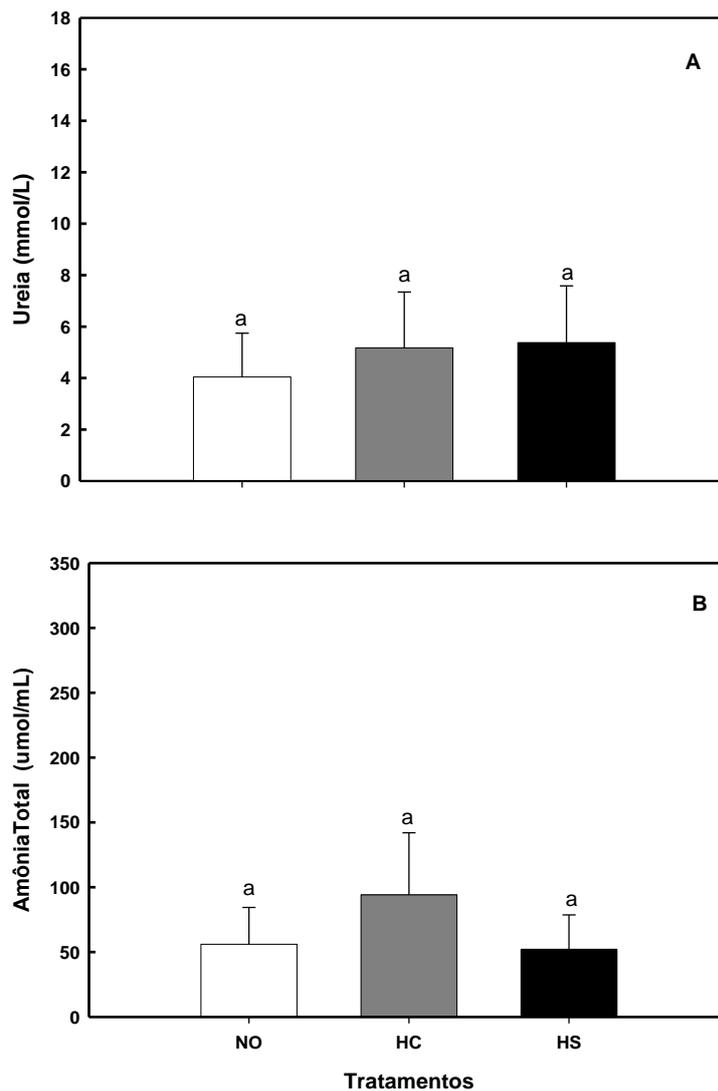
**Figura 13.** Níveis plasmáticos de proteínas totais em neonatos (Neo) e juvenis (Juv) de arraia cururu (N = 6) após 48 e 72 horas de exposição à hipóxia. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão.

Uma possível explicação estaria no aumento da produção de proteínas de defesa, como as globulinas, tendo em vista que o animal está sendo exposto a uma condição progressiva de estresse, como por exemplo, ocorrido com indivíduos de *Oreochromis niloticus*, que tiveram aumento no percentual de  $\alpha$ + $\beta$ -globulinas e, ao

mesmo tempo, uma diminuição na proporção de  $\gamma$ -globulinas, durante uma exposição crônica à hipóxia ( $O_2=1,5$  mg/L, por 18 dias), indicando rearranjos na distribuição destas globulinas (Melo *et al.*, 2009).

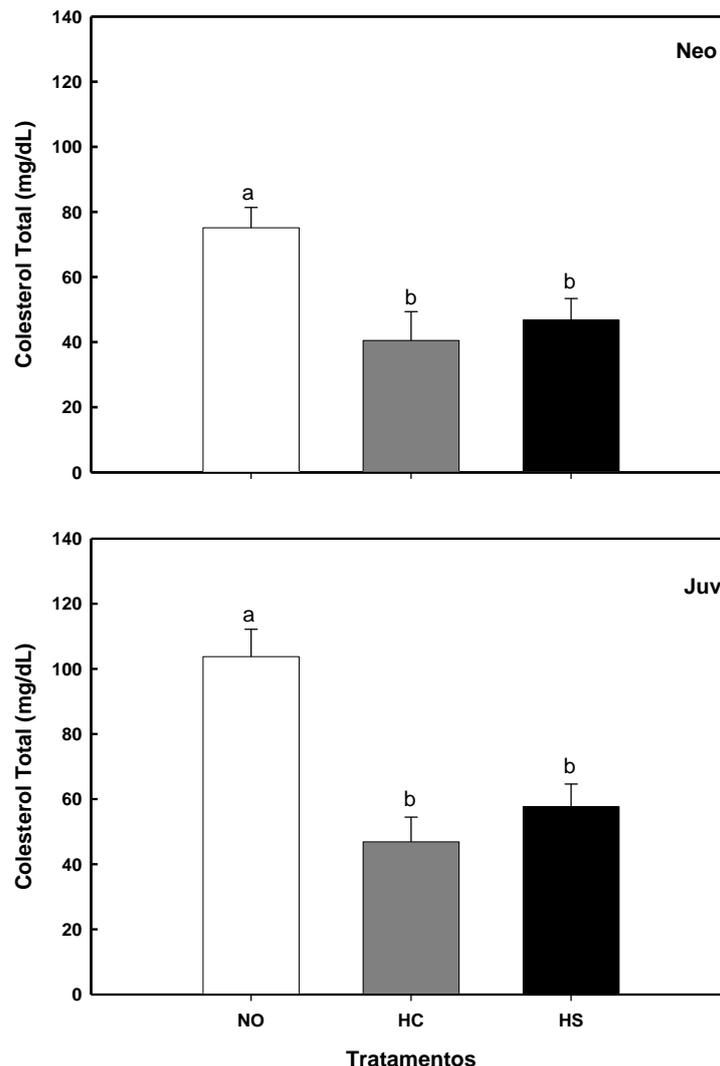


**Figura 14.** Níveis plasmáticos de ureia (A) e amônia total (B) em indivíduos **neonatos** (N=6) da arraia cururu, expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas. Foi utilizada análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn ( $p < 0,05$ ) para ambas as variáveis.



**Figura 15.** Níveis de ureia (A) e amônia total (B) presentes no plasma de **juvenis** da arraia cururu, expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. N = 6 para todos. Letras diferentes entre os tratamentos representam diferenças estatísticas. Foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para ambos.

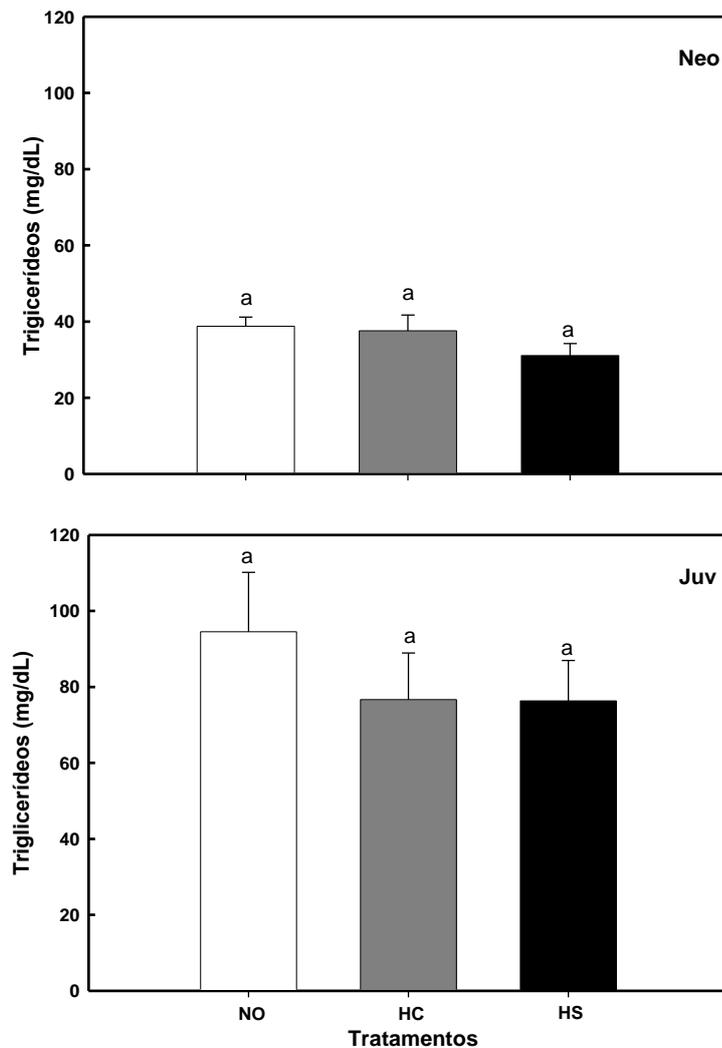
Os níveis de colesterol total e triglicerídeos estão próximos aos valores descritos anteriormente para *Potamotrygon cf. hystrix* por Oliveira (2008). A queda nos níveis de colesterol total nos grupos expostos à hipóxia dos dois experimentos (Figura 16) poderia indicar uma diminuição da síntese para diminuir o gasto de ATP frente à queda dos níveis de oxigênio ambiental.



**Figura 16.** Níveis plasmáticos de colesterol total de neonatos (Neo) e juvenis (Juv) da arraia cururu expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. N = 5 para todos (exceto para NO do exp. 1, e HC do exp.2 com N = 6). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

Como os elasmobrânquios não possuem tecido adiposo, os lipídeos incluindo os triglicerídeos são armazenados no fígado. Estes, por sua vez, podem ser mobilizados para a utilização nos tecidos periféricos, ou seguir para a  $\beta$ -oxidação hepática e cetogênese, com formação dos corpos cetônicos que, como já mencionado anteriormente, são utilizados como combustíveis oxidativos alternativos (Ballantyne, 1997; Speers-Roesch e Treberg, 2010). Porém, em nosso estudo não

houve mudanças, tanto nos níveis de triglicerídeos (Figura 17) como nos de  $\beta$ -hidroxibutirato plasmáticos (Figura 11), indicando que não parece ter havido cetogênese em resposta à exposição à hipóxia gradual.

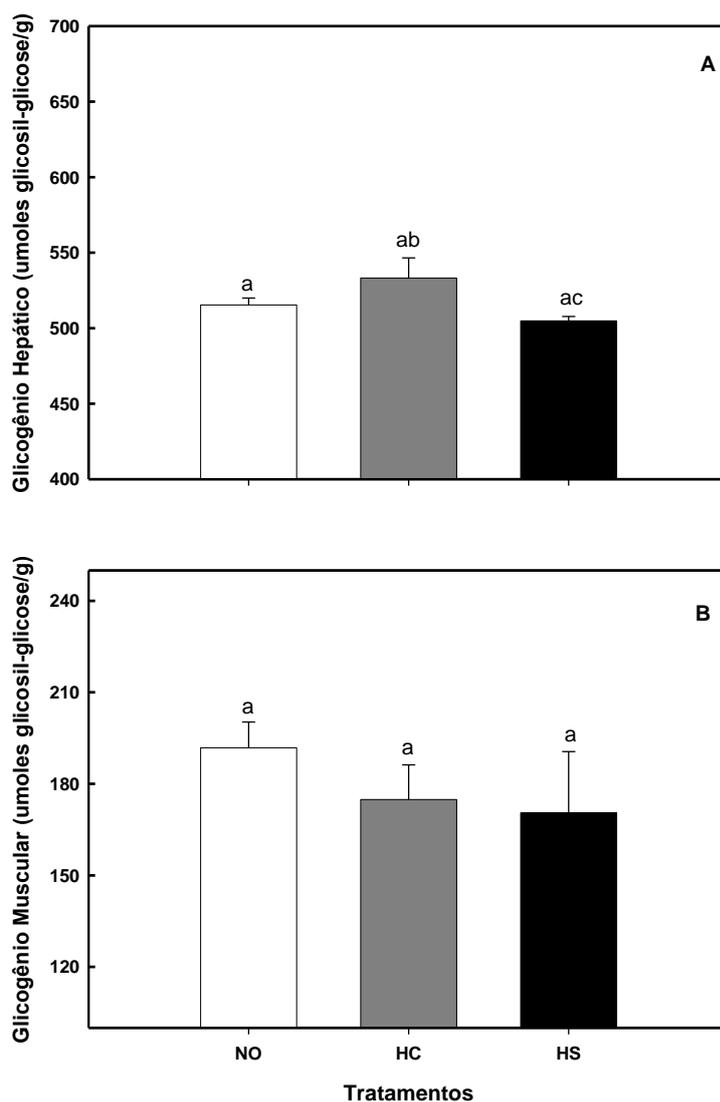


**Figura 17.** Níveis plasmáticos de triglicerídeos de neonatos (Neo) e juvenis (Juv) da arraia cururu expostos à hipóxia gradual. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. N = 6 para todos. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

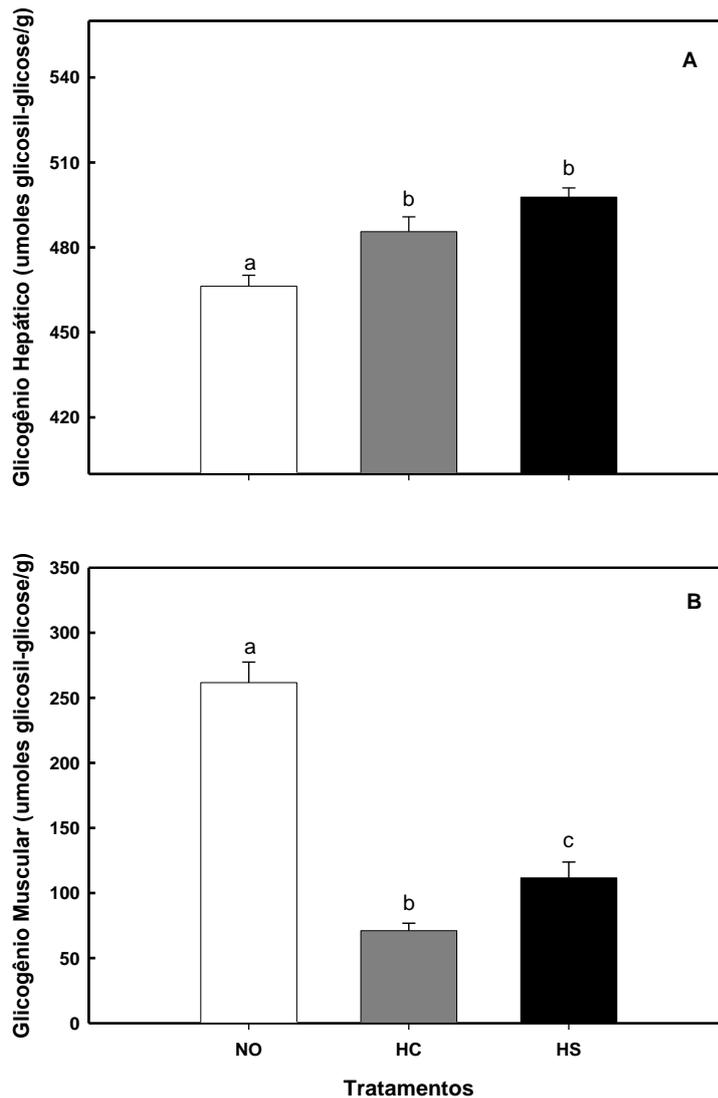
## **Glicogênio Hepático e Muscular:**

Em relação aos níveis de glicogênio hepático e muscular, foi possível observar que neonatos e juvenis apresentaram respostas distintas quando expostos à hipóxia. Enquanto nos neonatos os níveis de glicogênio hepático e muscular se mantiveram estáveis (Figura 18), nos juvenis o aumento do glicogênio hepático nos animais submetidos à hipóxia (Figura 19) indica que houve gliconeogênese. De forma similar, o perfil metabólico de *Gymnotus carapo* sugere gliconeogênese hepática por proteólise em resposta à hipóxia (Moraes *et al.*, 2002), o que não foi o caso da arraia cururu, tendo em vista que os níveis de proteínas foram mantidos e até aumentados nos juvenis do grupo HS. Dentro dos elasmobrânquios, a arraia-viola mobilizou glicogênio hepático em resposta à hipóxia, entretanto, estas respostas não foram confirmadas no tubarão epaulette exposto à hipóxia (Speers-Roesch *et al.*, 2012b). Isso indica que espécies diferentes ou uma mesma espécie (neonatos e juvenis) podem apresentar respostas distintas na manutenção ou mobilização de suas respectivas reservas de glicogênio tecidual, que podem ser influenciadas pelo protocolo experimental e pelo tempo de exposição à hipóxia gradual. Os efeitos deste último fator não podem ser descartados quando consideradas as distintas respostas observadas entre os neonatos e juvenis avaliados no presente estudo.

A mobilização do glicogênio muscular nos juvenis, que foi mais intensa no grupo exposto à hipóxia com acesso (Figura 20), acompanhado pelo aumento do lactato plasmático (Figura 13), pode indicar que essa diferença provavelmente se deve à maior movimentação das arraias do grupo HC (por consequência, maior gasto energético) em relação às arraias do grupo HS, às quais por terem livre acesso podiam realizar deslocamentos verticais e horizontais até a superfície e por toda coluna d'água. Já as arraias do grupo HS procuraram subir na coluna d'água assim que os níveis de  $O_2$  começaram a decair, mas logo apresentavam comportamento de ficarem mais paradas ao fundo do aquário. No estudo de Speers-Roesch *et al.* (2012b) a exposição à hipóxia não causou nenhuma mudança nas concentrações de glicogênio muscular na arraia-viola e no tubarão epaulette.



**Figura 18.** Glicogênio hepático (A) e muscular (B) em **neonatos** (n = 6) da arraia cururu após exposição à hipóxia progressiva. Valores expressos como  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido fresco. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas. Foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste a posteriori de Dunn nos dados de glicogênio hepático. Para o glicogênio muscular, utilizou-se one way ANOVA, com teste a posteriori de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19.** Glicogênio hepático (A) e muscular (B) em **juvenis** (N=6) da arraia cururu após 72 horas de experimento. Valores expressos em  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido fresco. Os resultados estão apresentados como médias e erro padrão. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

Hochachka e Somero (1984) consideram que os valores de glicogênio hepático podem ser índices para apontar a resistência à hipóxia nos animais. Tendo em vista os valores de glicogênio hepático determinados para arraia cururu (média de 515 e 466  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido em neonatos e juvenis, respectivamente) e comparando estes valores com o que foi encontrado para o tubarão epaulette (média de 75  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido) considerado tolerante à hipóxia, e para a arraia-viola (média de 21  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g de tecido), considerada uma espécie não tolerante

à hipóxia (Speers-Roesch *et al.*, 2012b), percebemos valores bem superiores para a arraia cururu, de pelo menos 6 vezes maiores do que no tubarão epaulette e no mínimo 21 vezes maiores do que a arraia-viola, indicando que a arraia cururu pode ser considerada uma espécie tolerante à hipóxia.

## CONCLUSÕES

Diante das evidências obtidas nesse trabalho, é possível concluir que *Potamotrygon cf. hystrix* responde à hipóxia gradual com algumas diferenças na estratégia entre neonatos e juvenis, e também em relação a ter acesso (grupo HC) ou não (grupo HS) à camada mais oxigenada da coluna d'água. Apesar de não termos quantificado a concentração crítica de oxigênio para a arraia cururu (por não termos feito respirometria), temos evidências que colocam essa espécie de arraia dentro do grupo dos animais tolerantes à hipóxia, por compartilhar características, como o aumento da frequência branquial/espíracular em resposta a níveis baixos de oxigênio; o fato de possuírem grandes reservas de glicogênio tecidual (hepático e muscular); a capacidade de ajuste de alguns parâmetros do metabolismo, como a hematologia, que no caso da arraia cururu ocorre nas primeiras fases de vida, e aumentos dos níveis circulantes de lactato, como resultado da ativação do metabolismo anaeróbico.

No presente estudo, foi possível concluir que a mobilização dos corpos cetônicos ( $\beta$ -hidroxibutirato) não parece ser uma estratégia importante para a arraia cururu, pelo menos durante sua fase juvenil.

No caso da arraia cururu, pode-se sugerir que a espécie apresenta uma concentração de oxigênio limitante abaixo de 2,0 mg/L, o que sem dúvida, confere à mesma um status de animal tolerante à hipóxia, a exemplo de várias espécies amazônicas, como *Astronotus ocellatus* (Muusze, 1998; Scott *et al.*, 2008) e diversas espécies de caraciformes (Soares *et al.*, 2006), assim como os peixes marinhos intertidais, conhecidos por suas habilidades em lidar com situações rotineiras de hipóxia ambiental (Richards, 2010).

Estudos futuros com outras espécies de potamotrigonídeos poderão ser esclarecedores, no sentido de entender como diferentes espécies respondem a

um estímulo comum, mas fundamental na distribuição e determinação dos padrões ecológicos destes representantes de elasmobrânquios de água doce.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIASS, I. P.; SILVA, M. N. P.; DUNCAN, W. P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 28:1257-1263.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; HOCHACHKA, P. W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. *Environmental and Ecological Biochemistry* (ed. P. W. Hochachka e T. Mommsen). 45-55.
- ANJOS, M.B.; DE OLIVEIRA, R.R.; ZUANON, J. 2008. Hypoxic environments as refuge against predatory fish in the Amazonian floodplains. *Brazilian Journal of Biology*. 68(1): 45-50.
- ARAÚJO, M.L.G. 1998. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. Dissertação Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 171p.
- ARAÚJO, M.L.G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. 2004. Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20 info. 08:1-6 <http://cites.org/common/cttee/animals/20/E20-inf-08.pdf>.
- ARAÚJO, M.L.G.; DUNCAN, W.L.P.; MELO, S.V. 2005. Plano de Monitoramento de Arraias de Água Doce. Relatório Final. 78p.
- BALLANTYNE, J. S. 1997. Jaws: The inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B 118: 703-742.
- BARCELLOS, J.F.M. 1997. Amônia, Ureia e Conteúdo de Oxigênio no Sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 67p.
- BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. 1997. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico CEPTA*. 10:53-60.
- BRINN, R. P.; MARCON, J. L.; MCCOMB, D.M.; GOMES, L. C.; ABREU, J. S.;

- BALDISSEROTO, B. 2012. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 162(2):139 -145.
- CARLSON, J. K.; PARSONS, G. R. 2001. The effects of hypoxia on three sympatric shark species: physiological and behavioral responses. *Environmental Biology of Fishes*. 61:427–433.
- CARVALHO, M. R. De; LOVEJOY, N. R.; ROSA, R. S. 2003. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C. J. (orgs.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS, 729p.
- CHAPMAN, C. A.; HARA HUSH, B. K.; RENSHAW, G. M. C. 2011. The physiological tolerance of the grey carpet shark (*Chiloscyllium punctatum*) and the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) to anoxic exposure at three seasonal temperatures. *Fish Physiology Biochemistry*. 37:387-399.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. 2005. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*. 35:165–171.
- deROOS, R.; deROOS, C. C.; WERNER, C. S.; WERNER, H. 1985. Plasma levels of glucose, alanine, lactate, and  $\beta$ -hydroxybutyrate in the unfed spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) after surgery and following mammalian insulin infusion. *General and Comparative Endocrinology*. 58:28-43.
- DIAZ, R. J.; BREITBURG, D. L. 2009. The hypoxic environment. In *Hypoxia* (ed. J.G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner), 1-23.
- DUBOIS, M. K. A.; GILLES, H. J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28(3):350-355.
- DUNCAN, W. P.; FERNANDES, M. N. 2011. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 5(3):1-11.
- ESTEVEZ, F. de A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª Ed. Rio de Janeiro. Interciência. 226p.
- GENTZKOW, C. J.; MAZEN, J. M. 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *Journal of Biological Chemistry*. 143:531-544.

- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*. 56:35-39.
- GRAHAM, M.S.; TURNER, J.D.; WOOD, C.M. 1990. Control of ventilation in the hypercapnic skate *Raja ocellata*: I. Blood and extradural fluid. *Respiration Physiology*, 80:259-277.
- HARMS, C.; ROSS, T.; SEGARS, A. 2002. Plasma Biochemistry References Values of Wild Bonnethead Sharks, *Sphyrna tiburo*. *Veterinary Clinical Pathology*. 31:111-115.
- HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. 1984. Limiting oxygen availability. In: Hochachka, P. W.; Somero, G. N. (ed.). *Biochemical Adaptation*. Princeton: Princeton Univ. Press.
- JUNK, W. J.; BAILEY, P. B.; SPARKS, R. E. 1989. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D. (Ed.). Proceedings of the International Large River Symposium. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 106:110-127.
- KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. 1964. Standardization of haemoglobinometry. In: Boroviczeny, C. G. Erythrocytometric Methods and their standardization (ed.). *Bibliotheca Haematology*. 18:68-72.
- KRAMER, D.L., MCCLURE, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environmental Biology Fish*;7:47–55. In: RANTIN F. T.; GUERRA C. Del R.; KALININ A. L.; GLASS M. L. 1998. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 119(4):991–997.
- KRAMER, D.L. 1987. Dissolved oxygen and fish behaviour. *Environmental Biology of Fishes*. 18:81–92.
- LEITE C.A.C., FLORINDO L. H., KALININ A. L., MILSOM W. K., RANTIN F. T. 2007. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Physiology A*. 193(9):1001-1011.
- MAJMUNDAR A. J.; WONG W. J.; SIMON M. C. 2010. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell* 40, October 22:294-309.
- MANDELMAN, J.M., SKOMAL, G.B. 2009. Differential sensitivity to capture stress assessed by blood acid–base status in five carcharhinid sharks. *Journal of Comparative Physiology B*. 179:267–277.

- MANIRE, C.; HEUTER, R.; HULL, E., SPIELER, R. 2001. Serological changes associated with gillnet capture and restraint in three species of sharks. *Trans. Am. Fish. Soc.* 130:1038–1048.
- McDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. 1992. Chemical properties of the blood. *In*: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Ed.). *Fish Physiology*. The Cardiovascular System, XIIB. Academic Press, San Diego, 55-33.
- MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; MELO, M. M.; JÚNIOR, D. V. TEIXEIRA, E. A.; GUIMARÃES, S. R. 2009. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(5):1183-1190.
- MELNYCHUCK M.C.; L.J. CHAPMAN. 2002. Hypoxia Tolerance of Two Haplochloramine Cichlids: Swamp Leakage and Potential Interlacustrine Dispersal. *Environmental Biology of Fishes*. 65: 99-110.
- METCALFE, J. D.; BUTLER, P. J. 1984. Changes in activity and ventilation in response to hypoxia in unrestrained, unoperated dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *Journal of Experimental Biology*. 108:411-418.
- MORAES, G.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; BARBOSA, C. C. 2002. Biochemical and hematological response of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. *Brazilian Journal of Biology*. 62(4A):633-640.
- MUUSZE, B.; MARCON, J.; THILLART G. V. D.; ALMEIDA-VAL V. 1998. Hypoxia tolerance of Amazon fish Respiriometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Parte A. 120:151–156.
- NILSSON, G.; HOBBS, J.P.; ÖSTLUND-NILSSON, S.; MUNDAY, P. 2007. Hypoxia tolerance and air-breathing ability correlate with habitat preference in coral-dwelling fishes. *Coral Reefs*. 26(2):241-248
- OLIVEIRA, A.T. 2008. Caracterização Hematológica de *Potamotrygon* cf. *histris*: Subsídios para o manejo e Conservação da Espécie. Dissertação Mestrado em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas. 118p.
- OLIVEIRA, A. T.; LEMOS, J. R.G.; SANTOS; M. Q. C.; ARAÚJO, M. L. G.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L. 2012. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias de água doce. EMBRAPA Amapá. ISSN – 1517-4559.
- OLIVEIRA, A. T. 2013. Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas, Brasil. Tese de Doutorado em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas. 202p.

- PARSONS, G.R.; CARLSON, J.K. 1998. Physiological and behavioral responses to hypoxia in the bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*: routine swimming and respiratory regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19:189-196.
- PERRY, S. F.; GILMOUR, K. M. 1996. Consequences of catecholamine release on ventilation and blood oxygen transport during hypoxia and hypercapnia in an elasmobranch (*Squalus acanthias*) and a teleost (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*. 199:2105-2118.
- RANTIN F. T.; GUERRA C. Del R.; KALININ A. L.; GLASS M. L. 1998. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 119(4): 991–997.
- RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. 1996. Cardio-respiratory function and aquatic surface respiration in serrasalmid fish *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D;J., editors. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Manaus, Brazil: Editora do INPA.169–80.
- RICHARDS, J. G. 2010. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*. 214:191-199.
- ROSSI L.; CORDIVIOLA E.; PARMA M. J. 2007. *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Parte IV. 305-325.
- ROUTLEY, M. H.; NILSSON G. E., RENSHAW G. M. C. 2002. Exposure to hypoxia primes the respiratory and metabolic responses of the epaulette shark to progressive hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 131:313-321.
- SAINT-PAUL, U.; SOARES, G.M. 1988. Ecomorphological adaptations to oxygen deficiency in Amazon floodplains by serrasalmid fish of the genus *Mylossoma*. *Journal of Fish Biology*. 32:231–6. In: RANTIN F. T.; GUERRA C. Del R.; KALININ A. L.; GLASS M. L. 1998. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 119(4):991–997.
- SCHIMIDT, G. W. 1973. Primary production of phytoplankton in the three types of Amazonian Waters II. The limnology of a tropical floodplain lake in central Amazonia (Lago do Castanho). *Amazoniana*. 4(2):139-203.
- SCOTT, G. R.; WOOD, C. M.; SLOMAN, K. A.; IFTICAR, F. I.; De BOECK, G.; ALMEIDA-VAL, V. M.; VAL, A.L. 2008. Respiratory responses to

progressive hypoxia in the Amazonian Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Respiratory Physiology e Neurobiology*. 162(2):109-116.

- SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J.A.S. 2009. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 4(4):466-465.
- SKOMAL, G. B.; MANDELMAN, J. W. 2012. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: A review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Parte A. 162:146-155.
- SOARES, M. G. M.; MENEZES, N. A.; JUNK, W. J. 2006. Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia*. 568(1):353 -367.
- SPEERS-ROESCH, B., TREBERG, J.R., 2010. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry Physiology*. 155A:417-434.
- SPEERS-ROESCH, B.; RICHARDS, J. G.; BRAUNER, C. J.; FARRELL, A. P.; HICKEY, A. J. R.; WANG, Y. S.; RENSCHAW, G. M.V. 2012a. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. I. Critical oxygen tension as a measure of blood oxygen transport during hypoxia exposure. *The Journal of Experimental Biology*. 215:93-102.
- SPEERS-ROESCH, B.; BRAUNER, C. J.; FARRELL, A. P.; HICKEY, A. J. R.; RENSCHAW, G. M.V. ; WANG, Y. S.; RICHARDS, J. G. 2012b. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. II. Cardiovascular function and tissue metabolic responses during progressive and relative hypoxia exposures. *The Journal of Experimental Biology*. 215:103-114.
- UNEP, 2004. BARTHEM, R. B.; CHARVET-ALMEIDA, P.; MONTAG, L. F. A.; LANNA, A.E. Amazon Basin, GIWA Regional assessment 40b. University of Kalmar, Kalmar, Sweden.
- VAL, A. L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh water. *In*: Bicudo, J. E. P. W. (Ed.). *The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life*. CRC Press, Boca Raton. 43-53.
- WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. *In*: Iwama, G. K.; Pickering, A. D.; Sumpter, J. P. Schreck, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. United Kingdom: Cambridge University Press. 35-71.

- WINTROBE, M.M. 1933. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*. 51: 32-49.
- WOOD, C. M.; MATSUO, A. Y. O.; GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; PATRICK, M. L.; VAL, A. L. 2002. Mechanisms of ion transport in Potamotrygon, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology*. 205:3039-3054.