



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA – PPGZOO



**Efeito da Hipóxia Aguda na Respiração Superficial Aquática (RSA) e
na fisiologia da arraia cururu, *Potamotrygon wallacei*
(Carvalho, Rosa e Araújo, 2016)**

Lara de Jesus da Silva

Manaus, Amazonas

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA – PPGZOO

**Efeito da Hipóxia Aguda na Respiração Superficial Aquática (RSA) e
na fisiologia da arraia cururu, *Potamotrygon wallacei*
(Carvalho, Rosa e Araújo, 2016)**

Discente: Lara de Jesus da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jaydione Luiz Marcon

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Billalba Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, área de concentração Fisiologia e Comportamento Animal.

Manaus, Amazonas

2023

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Lara de Jesus da
Efeito da hipóxia aguda na Respiração Superficial Aquática (RSA) e na fisiologia da arraia cururu, *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) / Lara de Jesus da Silva . 2023
53 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Comportamento respiratório. 2. Elasmobrânquios de água doce. 3. Resposta ventilatória. 4. Eritrograma. 5. Metabólitos plasmáticos. I. Marcon, Jaydione Luiz. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

O presente estudo analisou as respostas fisiológicas e o comportamento da respiração superficial aquática (RSA) em uma espécie de arraia de água doce, *Potamotrygon wallacei*, exposta às condições de normóxia e hipóxia aguda. Os resultados demonstram que *P. wallacei* se ajusta à hipóxia aguda com a hiperventilação sem deprimir o metabolismo, ativar a via anaeróbica, ou utilizar estoques energéticos para obter glicose.

Palavras-chave: comportamento respiratório, elasmobrânquios de água doce, resposta ventilatória, eritrograma, hipóxia, metabólitos plasmáticos.

A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.

Charles Robert Darwin

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar pelo cientista responsável por me inspirar para área de zoologia e também que acreditou no meu potencial, mesmo quando eu duvidei, além de todo o suporte e preocupação, ao saudoso e amado Professor Marcelo Menin.

Agradeço ao meu orientador Jaydione Luiz Marcon pela coragem em aceitar me orientar, ele pode não saber, mas o efeito que fez em minha vida é muito especial e positivo, além de me educar cientificamente com todo respeito e carinho. Muito obrigada por me apresentar um universo que eu não conhecia.

Agradeço a minha coorientadora Thaís Billalba Carvalho, que me inspira como mulher e cientista e por estar sempre colaborando para meu desenvolvimento científico e até mesmo pessoal.

Agradeço ao Professor Ronis Da Silveira por todo o suporte e preocupação com meu mestrado, enquanto orientador interino.

Agradeço aos meus amigos Ana Carolyny Cerdeira Lopes e Eike Nascimento de Oliveira pelo help em laboratório e noites em claro rodando experimento. Ao Técnico e amigo Philip Darbert da Silva Castro pelo apoio, inclusive em madrugadas, domingos e feriados estar disposto a me ajudar. Ao Maiko Willas Soares Ribeiro e Jhomaxon de Souza Gonçalves por dicas e força braçal nos momentos críticos em laboratório. A Natasha Moura dos Reis pela parceria e por revezar o cuidado e compartilhar experiências com as “nossas” arraias

Obrigada aos Professores Cintia Cornelius Frische e Fabrício Beggiato Baccaro pela coordenação e colaboração e, ao Gildázio Costa, que sempre está organizando nossas demandas. Agradeço o comprometimento de vocês e tenho orgulho de fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Zoologia (PPG-ZOOL).

Eles não têm noção o quando podem ter feito a diferença na minha vida acadêmica e pessoal. Agradeço mais uma vez por ter tido a oportunidade de trabalhar com essas pessoas incríveis. A ciência e o mundo precisam de mais seres humanos como vocês.

Resumo

O presente estudo analisou as respostas fisiológicas e o comportamento da respiração superficial aquática (RSA) em uma espécie de arraia de água doce, *Potamotrygon wallacei*, exposta às condições de normóxia e hipóxia aguda. Para isso, as arraias foram previamente aclimatadas em laboratório em condições normóxicas por 15 dias para elaboração do etograma da RSA e por 30 dias para as análises fisiológicas. Durante esse período, foram alimentadas diariamente com pedaços de peixe fresco, minhoca e camarão vivos até a saciedade. Ao término da aclimação, as arraias foram distribuídas aleatoriamente em aquários individuais e submetidas a duas condições distintas durante 16 horas consecutivas: i) normóxia, com número amostral de 4 indivíduos para elaboração do etograma e 8 indivíduos para análise de dados fisiológicos. Nessa condição, a concentração de oxigênio dissolvido (O₂) foi mantida em 74% de saturação (~6,0 mg/L) durante todo o experimento; ii) hipóxia aguda (n = 4 para o etograma e n = 8 para análise de dados fisiológicos). Nessa condição, a concentração de O₂ diminuiu de valores normóxicos até pelo menos 18% de saturação (1,5 mg/L) nas primeiras oito horas (pela injeção de nitrogênio gasoso), sendo então mantida por mais oito horas consecutivas. Todos os ensaios experimentais realizados em ambos, normóxia e hipóxia aguda, tiveram início às 16:00h e término às 08:00h do dia seguinte, totalizando 16 horas de duração. Para o registro da RSA em ambos os grupos experimentais, as arraias foram filmadas durante todo o período com câmeras de visualização noturna (infravermelho) acopladas a um sistema de gravação Digital Video Recorder. Além disso, foram avaliados os parâmetros fisiológicos como a frequência dos movimentos espiraculares (FE), o eritrograma (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e índices hematimétricos), a concentração de glicose e lactato no plasma e de corpos cetônicos (β -hidroxibutirato) no sangue. Para a obtenção das amostras de sangue, as arraias foram anestesiadas com eugenol 75 mg/L. As arraias expostas à hipóxia aguda com aclimação de 30 dias não manifestaram a RSA. Acredita-se que o longo tempo de aclimação em condições de normóxia, que não necessariamente acontecem no ambiente natural, especialmente durante o período noturno no qual situações de hipóxia são comumente observadas, podem ter modificado essa resposta comportamental. Por outro lado, arraias recém-chegadas e mantidas em aclimação por até 15 dias, realizaram a RSA. Em relação aos parâmetros fisiológicos, houve um aumento na FE em resposta ao tempo de exposição

à hipóxia aguda (de 38 para 89 beats/min), quando comparados com aqueles mantidos em normóxia, que se manteve estável (entre 40 e 60 beats/min) até o final do experimento. Por outro lado, não foram observadas alterações no eritrograma, bem como nas concentrações de glicose, lactato e de corpos cetônicos no grupo de arraiais expostas à hipóxia aguda, quando comparadas com aquelas mantidas em normóxia. Nosso estudo demonstra que *P. wallacei* se ajusta à hipóxia aguda com a hiperventilação sem deprimir o metabolismo, ativar a via anaeróbica, ou utilizar estoques energéticos para obter glicose.

Palavras-chave: comportamento respiratório, elasmobrânquios de água doce, resposta ventilatória, eritrograma, hipóxia, metabólitos plasmáticos.

Abstract

The present study analyzed the physiological responses and the behavior of aquatic surface respiration (ASR) in a species of freshwater stingray, *Potamotrygon wallacei*, exposed to conditions of normoxia and acute hypoxia. For this, the stingrays were previously acclimatized in the laboratory under normoxic conditions for 15 days for the elaboration of the ASR ethogram and for 30 days for the physiological analyses. During this period, they were fed daily with pieces of fresh fish, live worms and shrimp until satiation. At the end of acclimatization, the stingrays were randomly distributed in individual aquariums and subjected to two different conditions for 16 consecutive hours: i) normoxia, with a sample number of 4 individuals for the elaboration of the ethogram and 8 individuals for the analysis of physiological data. In this condition, the dissolved oxygen (O₂) level was maintained at 74% saturation (~6.0 mg/L) throughout the experiment; ii) acute hypoxia (n = 4 for the ethogram and n = 8 for the analysis of physiological data). In this condition, the O₂ levels decreased from normoxic values to at least 18% saturation (1.5 mg/L) in the first eight hours (through the injection of gaseous nitrogen), and then maintained for more eight consecutive hours. All experimental tests carried out in both normoxia and acute hypoxia began at 4:00 pm and ended at 8:00 am the next day, totaling 16 hours of duration. To record the ASR in both experimental groups, the stingrays were filmed throughout the entire time with night viewing cameras (infrared) coupled to a Digital Video Recorder recording system. In addition, physiological parameters such as the frequency of spiracular movements (SF), the erythrogram (hematocrit, hemoglobin concentration, number of erythrocytes and hematimetric indices), the concentration of glucose and lactate in the plasma and of ketone bodies (β - hydroxybutyrate) in the blood. To obtain blood samples, the stingrays were anesthetized with eugenol 75 mg/L. Stingrays exposed to acute hypoxia with 30 days of acclimatization did not manifest ARS. It is believed that the long acclimatization time in normoxic conditions, which do not necessarily occur in the natural environment, especially during the night period in which hypoxia situations are commonly observed, may have modified this behavioral response. On the other hand, newly arrived stingrays kept in acclimatization for up to 15 days, performed the ASR. Regarding the physiological parameters, there was an increase in SF in response to the time of exposure to acute hypoxia (from 38 to 89 beats/min), when compared to those maintained in normoxia,

which remained stable (between 40 and 60 beats/min) until the end of the experiment. On the other hand, no changes were observed in the erythrogram, as well as in the concentrations of glucose, lactate and ketone bodies in the group of stingrays exposed to acute hypoxia, when compared with those kept in normoxia. Our study demonstrates that *P. wallacei* adjusts to acute hypoxia with hyperventilation without depressing metabolism, activating the anaerobic pathway, or utilizing energy stores to obtain glucose.

Keywords: respiratory behavior, freshwater elasmobranchs, ventilatory response, erythrogram, blood count, hypoxia, plasmatic metabolites.

Sumário

Índices de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XV
1. Introdução.....	1
1.1. Potamotrygon wallacei	8
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. Hipóteses	11
4. Material e Métodos.....	12
4.1. Coleta das arraias	12
4.3. Parâmetros comportamentais	20
4.5. Procedimentos analíticos	21
4.5.1. Avaliação do hemograma	21
4.5.2. Metabólitos plasmáticos	21
4.6. Parâmetros físico-químicos da água	23
4.7. Análises estatísticas	23
5. Resultados.....	24
5.1. Comportamento: Etograma.....	24
5.2. Frequência espiracular (FE).....	31
5.3. Eritrograma	34
5.4. Metabólitos sanguíneos.....	35
6. Discussão	36
6.1. Comportamento	36
6.2. Fisiologia	38
6.2.1. Frequência espiracular (FE)	38
6.2.2. Eritrograma	39

6.2.3. Metabólitos sanguíneos	40
7. Conclusões.....	44

Índices de Figuras

Figura 1. Medição da largura do disco de <i>Potamotrygon wallacei</i>	12
Figura 2. Mapa da bacia do médio Rio Negro no Estado do Amazonas, destacando a cidade de Barcelos (círculo vermelho) e o Arquipélago Mariuá localizado em frente à cidade, na margem oposta do rio (Fonte: Google Earth, 2023).....	13
Figura 3. Coleta noturna de <i>P. wallacei</i> com auxílio de puçá de mão, remo e lanterna de cabeça, por pescadores nas áreas do Arquipélago de Mariuá, Barcelos, Amazonas. (Fonte: Oliveira, 2012).....	13
Figura 4. Juvenis de <i>Potamotrygon wallacei</i> transportados em caçapas de Barcelos até a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em Manaus, Amazonas.	14
Figura 5. Aclimação de <i>P. wallacei</i> em piscinas de lona providas de aeração constante e filtro biológico (com carvão ativado) para manutenção da qualidade da água.	15
Figura 6. Curvas de oxigênio dissolvido na água em função do tempo obtidas nos grupos normóxia e hipóxia aguda. A linha tracejada separa o período de decaimento gradual da concentração de oxigênio dissolvido da fase de manutenção em hipóxia profunda (~1,5 mg/L)	19
Figura 7. Retirada de amostras de sangue por meio de punção do vaso branquial de espécimes de <i>P. wallacei</i> previamente anestesiados.....	20
Figura 8. Amostras de sangue resfriadas em gelo, imediatamente após a coleta (A), para a determinação da concentração de corpos cetônicos (na forma de β - hidroxibutirato), por meio do uso de medidor FreeStyle Optium Neo β -Ketone, Abbott do Brasil(B).	22
Figura 9. Juvenil de <i>Potamotrygon wallacei</i> apresentando natação errática em 16 horas de hipóxia aguda, sem realização da RSA.....	24
Figura 10. Movimentação horizontal em direção frontal (A) e caudal (B).....	27
Figura 11. Natação vertical em zigue-zague (sequência A a D).	28

Figura 12. Natação vertical com ângulo 45°	28
Figura 13. Natação próximo a lâmina superficial da água (sequência A a D).	29
Figura 14. Flutuação estativa na lâmina superficial da água (A); Flutuação dinâmica na lâmina superficial da água (B); Natação na lâmina superficial da água com dobramento das extremidades da nadadeira na parte frontal e caudal (C); Natação na lâmina superficial da água com batida frontal para cima (D).	29
Figura 15. Direcionamento do fluxo de água do disco para os espiráculos. Visão ventral (A) e visão ligeiramente abaixo da lâmina da água (B).	30
Figura 16. Lançamento de água para cima com a nadadeira em direção aos espiráculos. Visão dorsal na linha da lâmina da água (A) e visão ventral (B).	30
Figura 17. Arraia em repouso.	31
Figura 18. Valores de frequência espiracular (FE, beats/min; média ± EP) registrados em <i>P. wallacei</i> (n = 8) em função da concentração de O ₂ dissolvido na água. * indica diferença significativa (ANOVA de uma via, seguido de teste de Holm-Sidak; p<0,05) em relação à concentração inicial (5,6 mg/L) do mesmo grupo. Para comparação, foi adicionado o valor médio da FE nas arraiais expostas à normóxia, com concentração de O ₂ igual a 5,8 mg/L. Não houve diferença significativa (NS, teste t de Student; p>0,05) entre os dois grupos experimentais nesse intervalo de concentração.	32
Figura 19. Valores de frequência espiracular (FE, beats/min; média ± EP) registrada em <i>P. wallacei</i> em função do tempo de condução do experimento. A linha tracejada separa o período de decaimento gradual da concentração de oxigênio dissolvido da fase de manutenção em hipóxia profunda (~1,5 mg/L) no grupo submetido à hipóxia aguda até a finalização do experimento. * indica diferença significativa (teste t de Student; p<0,05) em cada tempo de exposição entre os grupos normóxia e hipóxia aguda.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água mensurados nas piscinas contendo espécimes de <i>Potamotrygon wallacei</i> , durante o período de aclimação.	16
Tabela 2. Biometria de neonatos e juvenis de <i>P. wallacei</i> , submetidos a experimento de normóxia e hipóxia aguda para elaboração do etograma da RSA.	17
Tabela 3. Biometria de juvenis e adultos de <i>P. wallacei</i> submetidos à normóxia e hipóxia aguda para a coleta de dados fisiológicos.	17
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos mensurados na água dos aquários utilizados durante o período experimental de 16 horas, contendo neonatos, juvenis e adultos de <i>Potamotrygon wallacei</i>	19
Tabela 5. Eritrograma de espécimes de <i>Potamotrygon wallacei</i> expostos à normóxia e à hipóxia aguda ao longo de 16 horas.	34
Tabela 6. Concentração dos metabólitos (corpos cetônicos, glicose e lactato) em espécimes de <i>Potamotrygon wallacei</i> mantidos em normóxia e em hipóxia aguda ao longo de 16 horas.	35

1. Introdução

O oxigênio molecular (O_2) é fundamental para a vida dos organismos dependentes da respiração aeróbia. Essa dependência se torna ainda maior em função das propriedades físicas e químicas do meio aquático, que possui uma disponibilidade de oxigênio cerca de 30 vezes menor quando comparada ao ambiente aéreo (Schmidt-Nielsen, 2002). Em determinadas circunstâncias, pode haver uma diminuição na quantidade de oxigênio dissolvido na coluna da água, condição amplamente conhecida e definida como hipóxia. Nessas condições, as concentrações de oxigênio dissolvido podem cair abaixo dos níveis exigidos pela maioria dos animais, que a partir daí, passam a enfrentar situações de hipóxia moderada e profunda e, em condições extremas, sofrer com a completa ausência deste gás, que caracteriza uma condição de anóxia (Hochachka e Somero, 2002). Nesse contexto, um cenário cada vez mais frequente nos dias atuais é o aumento da temperatura das águas, que repercute de forma negativa para os organismos aquáticos, diminuindo a disponibilidade e saturação de O_2 , especialmente em ambientes tropicais (Esteves, 1998; Diaz e Breitburg, 2009).

A hipóxia é comum em muitos habitats de água doce, especialmente em lagos e corpos de água presentes nas planícies de inundação existentes ao longo da bacia Amazônica, como as várzeas (presentes nos sistemas de águas barrentas) e igapós (florestas sazonalmente inundadas com águas pretas). Durante as cheias, há pouca correnteza e circulação de água e estratificação da coluna da água (Sioli, 1984) e, em águas rasas, dependendo do equilíbrio entre a produção e a respiração, pode ocorrer um ciclo diário natural de supersaturação durante o dia que se encaminha para um cenário de hipóxia ou até mesmo anóxia durante a noite (Diaz e Breitburg, 2009). Essas características são frequentes e amplamente conhecidas para diferentes ambientes aquáticos distribuídos ao longo da bacia Amazônica (Val e Almeida-Val, 1995), sendo por isso, considerados como ambientes naturalmente hipóxicos (Kramer et al., 1987).

Essa variedade de habitats abriga uma ictiofauna altamente diversificada, de modo que sua distribuição e composição está relacionada às suas adaptações frente as condições limnológicas vigentes nestes ambientes (Val e Almeida-Val, 1995). A elevação do nível dos rios amazônicos diminui a concentração de oxigênio dissolvido na água e a hipóxia se torna um fator crítico em ambientes recém-alagados, como os igapós (Junk et al., 1989) pois nestas áreas, a baixa profundidade da coluna d'água favorece o aumento da temperatura e a aceleração das reações metabólicas dos organismos presentes (Junk,

1997) que aumentam o consumo de O₂. Além disso, estes corpos d'água apresentam altas taxas de decomposição do material orgânico oriundo da vegetação (Goulding, 1980) e, todos estes fatores em conjunto, influenciam nas concentrações de oxigênio dissolvido disponíveis para a biota aquática (Almeida-Val et al., 1993). Com isso, os peixes desenvolveram vários mecanismos evolutivos para garantir a obtenção de uma maior quantidade de oxigênio dissolvido nesses ambientes, em situações onde a disponibilidade deste gás é criticamente baixa, i.e., hipóxica (Kramer et al., 1987; Brauner et al., 1995).

A hipóxia força os peixes a trabalharem mais na extração do oxigênio da água, ou alternativamente, reduzir as taxas de gasto de energia durante o metabolismo de rotina, para contrabalancearem com a disponibilidade de oxigênio existente na água (Thomas et al., 2018). Por isso, há uma diversidade de espécies aquáticas tolerantes à hipóxia e grande variedade de adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais direcionadas para enfrentar esse fenômeno ambiental. Essas constatações nos trazem à luz a possibilidade de que, após o grande evento de oxigenação atmosférica há cerca de 2,3 bilhões de anos (Catling et al., 2001), os ambientes de baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido desempenharam um papel importante na evolução de muitas estratégias adaptativas observadas principalmente entre os peixes neotropicais (Val e Almeida-Val, 1995). Essa diversidade de estratégias permitem que as espécies de peixes amazônicas se distribuam por diferentes habitats, sendo algumas encontradas nos canais principais dos grandes rios, como as espécies de bagres migradores, enquanto outras ocupam tributários de tamanho médio, córregos, canais e lagos permanentes e temporários (Oliveira et al., 2001). Estes corpos d'água que são geralmente hipóxicos, contêm peixes capazes de lidar com valores abaixo de 2,3 mg/L por semanas e até meses (Kramer, 1978; Soares, 2006).

Com essas adaptações, diferentes nichos ambientais podem ser ocupados e variados tipos de respiração observados entre as diversas espécies de peixes, que incluem além da respiração aquática obrigatória, a respiração bimodal aérea, que ocorre com o auxílio de estruturas anatômicas modificadas, até o uso de mecanismos comportamentais, como o “*aiú*”, conhecido entre os indígenas e ribeirinhos como a subida dos peixes para efetuar a extração do O₂ na lâmina superficial da coluna d'água (Kramer et al., 1978; Kramer, 1983; Soares et al., 2006). Quando os peixes são desafiados em seus respectivos ambientes, a maneira mais simples para evitarem a hipóxia é mudar de área, buscar zonas mais oxigenadas para suprir suas demandas metabólicas no transcurso de suas atividades diárias. No entanto, em alguns casos, o comportamento de fuga não é viável ou necessário, e os peixes respondem empregando uma combinação de estratégias

comportamentais e fisiológicas para manter o fornecimento adequado de oxigênio aos tecidos. (Kramer, 1987; Jensen et al., 1994).

Além da respiração aquática obrigatória, a respiração aérea e o “*aiú*”, conhecido tecnicamente como a respiração na superfície aquática (RSA), são respostas comportamentais muito pronunciadas entre os peixes amazônicos (Graham, 1997). Aproximadamente 49 famílias de peixes têm representantes que utilizam a respiração aérea (Graham, 1997), em muitos casos desenvolvidos de forma concomitante com a respiração aquática, na qual os peixes conservam as brânquias funcionais e engolem o ar diretamente da atmosfera que, por sua vez, é armazenando em um órgão especializado na realização das trocas gasosas (Graham, 1997; Chapman e Mckenzi, 2009). Esses peixes com respiração bimodal são classificados em dois grupos, respiradores facultativos e os respiradores obrigatórios (Graham, 1997). Os respiradores facultativos captam o oxigênio na superfície (ar atmosférico), mas sobrevivem pela ventilação branquial se não houver acesso ao ar. É o caso do muçum (*Synbranchus marmoratus*) (Bicudo e Johansen, 1979), que realiza o processo de trocas gasosas no epitélio bucofaríngeo e na câmara branquial (Moraes et al., 2005). Já os respiradores obrigatórios se afogam se lhes for negado o acesso à respiração aérea, mesmo em água normóxica, porque eles têm áreas de superfície branquiais reduzidas (Graham, 1997). O exemplo mais conhecido neste grupo é o pirarucu (*Arapaima gigas*), que apesar de possuir brânquias voltadas mais para a osmorregulação e excreção, estas são insuficientes para realizar a respiração aquática. Sua respiração depende da bexiga natatória modificada, que se tornou especializada para funcionar como pulmão no exercício da respiração aérea (Sawaya, 1946; Salvo-Souza e Val, 1990).

Mesmo no ambiente amazônico, a maioria das espécies de peixes é incapaz de realizar a respiração aérea, mesmo que estejam sujeitos a eventos regulares de hipóxia moderada ou extrema (Kramer et al., 1978). Com isso, uma alternativa para contornar situações rotineiras de hipóxia e, conseqüentemente, aumentar as chances de sobrevivência, é a adoção da RSA (Kramer e McClure, 1982; Val e Almeida-Val, 1995). Para acionar esse comportamento, o animal sobe à superfície da coluna d'água para ventilar para as brânquias com a fina camada de água da superfície que está em equilíbrio com o ar atmosférico e, portanto, mais rica em oxigênio dissolvido do que a água subjacente. Com isso, a RSA mostra-se como uma alternativa potencial à respiração aérea, visto que esses animais não possuem um órgão acessório especializado para a realização das trocas gasosas (Kramer e McClure, 1982; Lewis, 1970). Embora muitas

espécies de peixes não exibam nenhuma especialização morfológica particular para essa atividade, vários deles apresentam modificações temporárias, como por exemplo, a extensão morfológica do lábio inferior que ocorre em várias espécies de caracídeos como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que melhora a eficiência da RSA (Kramer e McClure, 1982; Lewis, 1970; Val e Almeida-Val, 1995). Riscos fisiológicos e ecológicos são recorrentes para realização da respiração aérea e da RSA, como gasto energético para subir para a superfície e aumento significativo da probabilidade de predação por outros organismos (Kramer, 1983). Há evidências que os peixes que realizam RSA e respiração aérea possuem padrões de comportamento significativamente influenciados pelo risco percebido de predação, utilizando como alternativa para contornar a hipóxia, a migração sazonal (Kramer, 1987). Por outro lado, o desempenho da RSA parece se constituir em grande benefício ecológico, pois permite que os peixes colonizem refúgios hipóxicos nos quais espécies predadoras menos tolerantes não podem ocupar com sucesso (Junk et al., 1983; Chapman et al., 1995; Anjos et al., 2008).

Uma resposta comum a hipóxia demonstrada pelos peixes é a hiperventilação. O aumento no volume de ventilação, impulsionados por mudanças na frequência ou amplitude respiratória, serve para aumentar a extração do oxigênio dissolvido na água e, com isso, incrementar a pressão parcial deste gás no sangue arterial, uma estratégia que pode atrasar o início da transição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico (Graham, 1997) e evitar o acúmulo de metabólitos indesejáveis, como o lactato e os íons de hidrogênio, que podem interferir no mecanismos ácido-base e comprometer a homeostasia do organismo (Hochachka e Somero, 2002).

O aumento dos movimentos operculares em teleósteos, leva a uma maior ventilação e perfusão da água pelas brânquias, aumentando a capacidade de oxigenação do sangue nas lamelas branquiais (Hughes 1984). Já, no grupo dos elasmobrânquios caracterizados pelas arraias (Superordem Batoidea), os espiráculos fazem a função semelhante aos opérculos, pois levam água às cavidades branquiais e proporcionam a vazão da água após ter ocorrido a extração de O₂ pelas lamelas branquiais (Carvalho et al., 2016a). Essa atividade pode ser medida, pela frequência espiracular (FE) e se constitui em ferramenta útil e análoga à frequência opercular utilizada em teleósteos para quantificação da capacidade ventilatória de um indivíduo. Valores de FE obtidos em condições normóxicas podem ser comparados com aqueles registrados em animais submetidos a condições de hipóxia. Pastório (2014) constatou para a arraia cururu (*Potamotrygon wallacei*) que a variação observada na FE de neonatos e juvenis abrange

valores encontrados para outros elasmobrânquios marinhos mantidos em normóxia, como os tubarões *Scyliorhinus canicula* (Metcalf e Butler, 1984), *Hemiscyllium ocellatum* (Chapman et al., 2011; Routley et al., 2002), *Chiloscyllium punctatum* (Chapman et al., 2011) e *Squalus acanthias* (Perry e Gilmour, 1996). Estudos dessa natureza são raros em espécies de arraias, contudo, na espécie marinha *Raja ocellata*, valores de FE = 20 beats/min foram registrados a partir da contagem direta dos movimentos do espiráculo (Graham et al., 1990). Caso a hiperventilação não seja suficiente para contornar a hipóxia, haverá a redução na frequência ventilatória (e provavelmente dos batimentos e contração cardíaca) para diminuir o gasto energético, acarretando uma série de ajustes bioquímicos e metabólicos que visam melhor a oferta e utilização do oxigênio pelos tecidos (Hochachka e Somero, 2002).

A resposta fisiológica em peixes a agentes estressantes, como a hipóxia, pode ser caracterizada em três níveis ou etapas sucessivas: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são geralmente desencadeadas no eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (PHI), na qual neurotransmissores e hormônios como as catecolaminas, acionam respostas em cadeia em outras glândulas e órgãos responsáveis pela regulação hormonal (Wendelaar Bonga, 1997). As respostas secundárias, por sua vez, acontecem quando outros hormônios, como o cortisol em teleósteos, são liberados provocando mudanças no metabolismo intermediário e envolvendo vários parâmetros fisiológicos (ventilação, hematologia) e bioquímicos (metabólitos plasmáticos e teciduais). Já, as respostas terciárias comprometem o desempenho, alteram o comportamento em longo prazo e aumentam a suscetibilidade a doenças, além de comprometer a performance reprodutiva dos representantes de uma dada população (Barton, 1997; Wendelaar Bonga, 1997).

Elasmobrânquios, por outro lado, não respondem da mesma maneira à diferentes condições de estresse como aquelas observadas em teleósteos. Distintamente deste último grupo de peixes que tem o cortisol como o principal hormônio de estresse (Barton, 1997), os elasmobrânquios possuem o 1- α -hidroxicorticosterona (Idler & Truscott, 1966; Anderson, 2012) como candidato a essa função. Entretanto, sua mensuração é ainda muito limitada, em função da ausência de um protocolo técnico disponível comercialmente. Nestes organismos, também ocorre a secreção de corticosterona, um hormônio análogo ao cortisol, que não pode ser armazenado intracelularmente, sendo sintetizado e liberado na circulação sob demanda e, portanto, um grande alvo para estudos de estresse (Idler & Truscott, 1967). Este hormônio foi sugerido como indicador de estresse com ação

mineralocorticoide para uma espécie de arraia de água doce da Amazônia, *P. wallacei* (Brinn et al., 2012).

Peixes que não sobem até a superfície em busca de oxigênio, devido à sua estrutura anatômica inadequada para zona pelágica e/ou risco de predação, são mais dependentes da supressão do metabolismo oxidativo e a concomitante ativação do metabolismo glicolítico anaeróbico (Almeida-Val e Hochachka, 1995). Estes processos objetivam o melhor aproveitamento energético, diminuindo a demanda de oxigênio e, com isso, o consumo de ATP. Assim, formas anaeróbicas de produção deste metabólito energético são ativadas (Chippari-Gomes et al., 2005), embora obtenham menos energia com esta estratégia metabólica (Hochachka e Somero, 2002). A ativação do metabolismo anaeróbico e supressão do metabolismo oxidativo envolvem a participação de enzimas-chaves, na qual suas atividades são ajustadas de modo específico aos diferentes tecidos nas diferentes espécies (Almeida-Val e Hochachka, 1995; Wendelaar Bonga, 1997). Uma das enzimas mais estudadas é a lactato-desidrogenase (LDH) que promove a conversão reversível de piruvato a lactato, no fim da glicólise anaeróbica, indicando a capacidade anaeróbica dos tecidos mediante maior atividade da enzima, resultando em acúmulo de lactato em peixes teleósteos submetidos à hipóxia extrema, ao invés da usual liberação de CO₂ provocada pela aerobiose (Almeida-Val e Val, 1993; Muusze et al., 1998; McKenzie et al., 2000).

Diversas espécies de peixe podem ainda reduzir o metabolismo anaeróbico nestes tecidos como resultado da supressão geral do seu metabolismo, como no caso do acará comum (*Cichlasoma amazonarum*) (Almeida-Val et al., 1995), que implica na depressão da taxa metabólica do organismo abaixo do nível metabólico considerado padrão para a atividade rotineira do animal (Van Ginneken et al., 1995). Em muitos casos, os peixes amazônicos de respiração estritamente aquática apresentam adaptações metabólicas mais eficientes às condições hipóxicas que os peixes de respiração aérea, respiração superficial aquática, ou aqueles com adaptações anatômicas, sendo os ciclídeos neotropicais um ótimo exemplo de caso, como a espécie amazônica acará-açu, *Astronotus ocellatus* (Muusze et al., 1998).

Entre os produtos do metabolismo intermediário sintetizados como resposta secundária ao estresse, os corpos cetônicos (como o β -hidroxibutirato) têm um papel funcional no metabolismo energético dos elasmobrânquios marinhos mais importante do que em qualquer outro vertebrado, sendo utilizados como fonte de energia extra-hepática (Ballantyne et al., 1997). Uma das possíveis causas para essa elevada dependência dos

corpos cetônicos, pode estar relacionada com a incapacidade de transportar rapidamente o carbono dos lipídeos, como os ácidos graxos não esterificados (NEFA) para os tecidos extra-hepáticos. Nesse grupo, a produção dos corpos cetônicos parece ter uma vinculação com o metabolismo da ureia, que é acumulada nos fluidos corpóreos e tecidos em altas concentrações (>500 mM; Schmidt-Nielsen, 2002) como estratégia de regulação osmótica. Entretanto, a presença destas altas concentrações de ureia exerce efeitos negativos no catabolismo extra-hepático dos lipídeos, reduzindo o transporte de ácidos graxos não esterificados e aumentando a dependência dos corpos cetônicos para a produção de energia com o objetivo de atender à demanda de tecidos como o coração e a musculatura vermelha (Ballantyne, 1997). Entretanto, pouco se conhece sobre a importância e utilização destes metabólitos energéticos em espécies de elasmobrânquios dulcícola. Um dos únicos estudos desenvolvidos nesse sentido demonstrou que as concentrações circulantes destes compostos no sangue de juvenis de *P. wallacei* não variaram em resposta a uma condição de hipóxia progressiva (Pastório, 2014).

A hiperglicemia, uma resposta fisiológica secundária comum em teleósteos, tem sido amplamente utilizada como medida da intensidade de estresse (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Wendelaar Bonga, 1997). Contudo, nos elasmobrânquios, a glicose parece ter um papel secundário na manutenção do metabolismo desses animais, que habitualmente exibem baixas concentrações circulantes no sangue (Ballantyne, 1997), inclusive em espécies de arraias de água doce, como *Potamotrygon motoro* (Speer-Roesch et al., 2006) e juvenis de *P. wallacei* (Pastório, 2014), que não responderam com variações nas concentrações deste metabólito, quando submetidas a condições de hipóxia. Isso indica que elasmobrânquios de água doce podem apresentar outros mecanismos fisiológicos e bioquímicos em resposta à hipóxia ambiental. De fato, o conhecimento existente sobre as respostas metabólicas à hipóxia em espécies de elasmobrânquios de água doce é ainda incipiente e demonstra que mais estudos precisam ser conduzidos com outras espécies e com indivíduos em diferentes faixas etárias de uma mesma espécie, para que padrões de respostas à hipóxia possam ser identificados. Isso se torna ainda mais importante para espécies como *P. wallacei*, que parece desenvolver a RSA em situações de hipóxia profunda, como relatado pelos pescadores ribeirinhos de peixes ornamentais que atuam na bacia do médio Rio Negro e confirmada em campo por Araújo (1998) e em condições experimentais em laboratório (Barcellos, 1997; Pastório, 2014).

1.1. *Potamotrygon wallacei*

Conhecida popularmente como a arraia cururu, *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo 2016 é uma espécie endêmica, sendo a menor em tamanho dentro dos potamotrigonídeos, que habita preferencialmente as áreas de floresta inundada (igapós) existentes ao longo do Arquipélago do Mariuá, que se estendem ao longo da bacia de drenagem do médio Rio Negro (Carvalho et al., 2016b). Essa espécie é frequentemente encontrada entre os folhiços ou nas regiões arenoso-argilosas das áreas de igapó, ou em torno das ilhas que se formam próximos aos canais principais de afluentes de água preta, geralmente hipóxicos ou com concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a 4 mg/L (Araújo, 1998; Duncan e Fernandes, 2010; Carvalho et al., 2016b). A arraia cururu se caracteriza por apresentar nadadeiras pélvicas e aberturas dos espiráculos proporcionalmente grandes em relação ao seu tamanho (Carvalho et al., 2016a), além de uma grande área de superfície branquial especialmente em neonatos a termo (Duncan et al., 2015). Essas características morfológicas em conjunto contribuem para que essa espécie explore ambientes que podem ser considerados inadequados ou inóspitos para outros potamotrigonídeos.

Estudos prévios têm registrado taxas de mortalidade mais baixas em condições de hipóxia para peixes dotados da capacidade de realizar a RSA, indicando que essa estratégia tem valor biológico voltado à sobrevivência das espécies (Lewis, 1970; Kramer e McClure, 1982), sendo uma estratégia alternativa para aumentar a captação de oxigênio em condições de hipóxia. A eficácia dessa resposta ventilatória, bem como seus custos e benefícios fisiológicos ainda não foram descritas em elasmobrânquios (Chapman e Mckenzie, 2009), embora Barcellos (1997) tenha relatado em laboratório que exemplares de *P. wallacei* 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. Pastório (2014) em seu trabalho sobre respostas fisiológicas à hipóxia progressiva em neonatos e juvenis da arraia cururu, registrou que esse animal realiza respiração superficial aquática como uma das estratégias para enfrentar estas condições, sendo um comportamento mais pronunciado nos neonatos e mais moderado nos juvenis, provavelmente devido ao risco de predação aos quais estes últimos enfrentam, quando expostos à hipóxia em seus ambientes naturais.

Como ainda existe uma grande lacuna no conhecimento sobre o comportamento e fisiologia desta espécie relacionados à RSA, estudos direcionados a esse tema são necessários para investigar a expressão deste comportamento e os benefícios que esta estratégia adaptativa pode oferecer para indivíduos de *P. wallacei* quando submetidos a situações de hipóxia, sendo essa proposta inédita para espécies de arraias de água doce. Além disso, pretende-se ampliar os achados iniciados por Pastório (2014) a cerca de como os metabólitos energéticos presentes no sangue respondem à hipóxia, com a possibilidade de realização da RSA em condições experimentais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar como a diminuição aguda das concentrações de oxigênio dissolvido na água (hipóxia) afeta o comportamento (acionamento da RSA) e o metabolismo de *Potamotrygon wallacei* em condições experimentais.

2.2. Objetivos Específicos

Descrever o comportamento da RSA em *P. wallacei* durante a exposição à hipóxia aguda;

Analisar as mudanças da frequência dos movimentos espiraculares de *P. wallacei* em reposta à normóxia e hipóxia aguda;

Avaliar o eritrograma de *P. wallacei* exposta à normóxia e hipóxia aguda;

Analisar como as concentrações dos metabólitos do sangue de *P. wallacei* respondem às situações de normóxia e hipóxia aguda.

3. Hipóteses

De acordo com o conhecimento existente gerado sobre a fisiologia e o comportamento de *P. wallacei*:

1. Espera-se que os espécimes de *P. wallacei* expressem o comportamento de acionamento da RSA em situações de hipóxia aguda, na qual as concentrações de O₂ estejam abaixo de 2,0 mg/L;
2. Espera-se, com exceção da glicose no plasma, que as concentrações circulantes de corpos cetônicos no sangue e lactato no plasma sejam aumentadas em *P. wallacei*, em resposta à condição de estresse promovida pela hipóxia aguda.

4. Material e Métodos

4.1. Coleta das arraias

Neonatos (<12 cm), juvenis (12 a 16 cm) e adultos (> 16 cm) de *P. wallacei*, com largura de disco (Figura 1) entre 10 e 20 cm (Araújo, 1998), foram coletados nas áreas de floresta alagável (igapó) existentes ao longo do Arquipélago de Mariuá (Figura 2), localizado na bacia do médio Rio Negro próximo ao município de Barcelos, Amazonas, Brasil. O Arquipélago de Mariuá é considerado o maior grupo de ilhas de água doce do mundo e fornece abrigo para uma rica biodiversidade de peixes ornamentais, incluindo as espécies da arraia cururu (Oliveira et al., 2017). Este estudo dispõe de autorização prévia (Sisbio nº 18285-1) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) para a coleta das arraias no Arquipélago do Mariuá, em Barcelos (AM) e foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética para o uso de animais em animais em Pesquisa da Universidade Federal das Amazonas (Protocolo CEUA/UFAM # 002/2017).



Figura 1. Medição da largura do disco de *Potamotrygon wallacei*

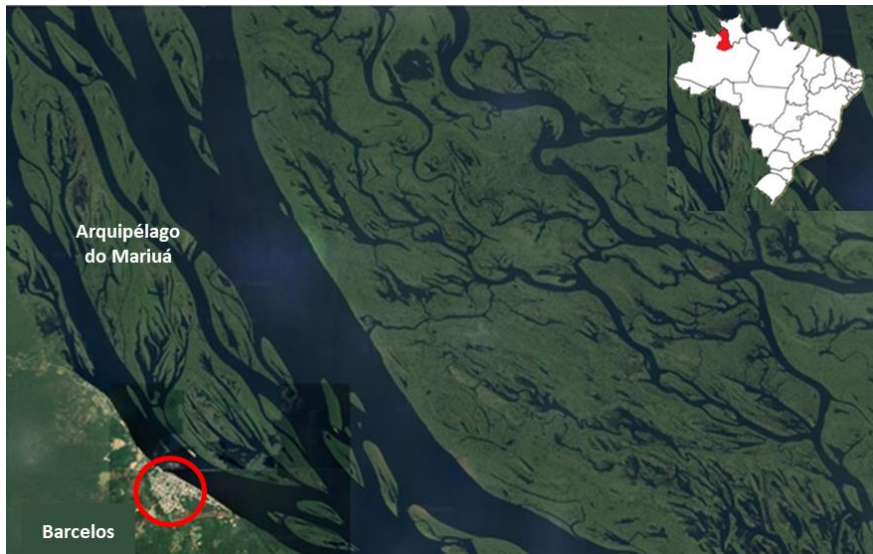


Figura 2. Mapa da bacia do médio Rio Negro no Estado do Amazonas, destacando a cidade de Barcelos (círculo vermelho) e o Arquipélago Mariuá localizado em frente à cidade, na margem oposta do rio (Fonte: Google Earth, 2023).

Os espécimes de *P. wallacei* foram coletados no período noturno com auxílio de lanterna e rede de puçá de mão (Figura 3), por pescadores profissionais que residem na cidade de Barcelos. Após a coleta, as arraias foram mantidas em tanques-rede de 1m³ fixados em praias, próximos aos locais de pesca até que o número necessário de animais fosse atingido.



Figura 3. Coleta noturna de *P. wallacei* com auxílio de puçá de mão, remo e lanterna de cabeça, por pescadores nas áreas do Arquipélago de Mariuá, Barcelos, Amazonas. (Fonte: Oliveira, 2012).

Em seguida, todo o plantel coletado foi transportado por via fluvial em recipientes plásticos (caçapas) contendo 2-3 litros de água, sendo mantidos na quantidade de um (adulto) a dois (neonato e juvenil) animais em cada recipiente (Figura 4), sem aeração e troca de água durante o trajeto, das áreas de pesca para Barcelos. Nesse local as arraias foram transferidas para novas caçapas contendo o mesmo volume de água renovada do próprio Rio Negro e a mesma quantidade de animais por recipiente e, então, transportadas, sem aeração e troca de água para Manaus, em uma viagem de barco com duração de 24 horas. Após a chegada, estes animais foram transportados para o Laboratório Experimental de Fisiologia e Comportamento de Animais Aquáticos (LEFCAQ), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram mensurados os parâmetros de qualidade da água contida nas caçapas, como o pH, as concentrações de O₂ dissolvido e de amônia total, a condutividade e a temperatura. Os neonatos e juvenis utilizados em experimento piloto e elaboração do etograma foram mantidos em aclimatação por 15 dias, já as arraias nas fases juvenil e adulta utilizados para obtenção dos dados fisiológicos, foram aclimatados por 30 dias consecutivos.



Figura 4. Juvenis de *Potamotrygon wallacei* transportados em caçapas de Barcelos até a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em Manaus, Amazonas.

Durante o período de aclimação, todos os espécimes foram mantidos em piscinas de lona com capacidade de 400 litros e dimensões de 33 x 106 x 115 cm (altura, largura e comprimento), contendo areia proveniente do Rio Negro no fundo para maior conforto dos animais, na quantidade de quatro a seis indivíduos em cada piscina (Figura 5). Nesse período, foram mensurados em dias alternados os parâmetros físico-químicos da água (Tabela 1). Esses valores foram mantidos próximos aos encontrados no ambiente natural da arraia cururu, com o oxigênio dissolvido entre 3,7 e 4,6 mg/dL, temperatura entre 26,5 e 29,8 °C, e pH entre 3,7 e 6,4 (Duncan e Fernandes, 2011). As piscinas foram dotadas com sistemas de filtro biológico individuais, com aeração contínua e renovação diária da água para manutenção da estabilidade dos parâmetros físico-químicos. Durante esse período as arraias receberam, uma vez ao dia, alimentação constituída por pequenos pedaços de peixe fresco, além de minhocas, e camarão vivos até a saciedade.



Figura 5. Aclimação de *P. wallacei* em piscinas de lona providas de aeração constante e filtro biológico (com carvão ativado) para manutenção da qualidade da água.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água mensurados nas piscinas contendo espécimes de *Potamotrygon wallacei*, durante o período de aclimação.

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Mín.	Máx.
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	30,3	8,7	18,5	48,3
pH (unidades)	6,9	0,5	6,2	7,8
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25,9	1,2	23,9	28,0
Oxigênio (mg/L)	6,0	0,8	5,0	7,7
Amônia total (mg/L)	0,4	0,31	0	1,0

4.2. Protocolo experimental

Vinte e quatro horas antes do experimento, os animais foram transferidos, ao acaso, das piscinas de aclimação para aquários de vidro com dimensões de 45 x 36,5 x 78 cm (altura x largura x comprimento), contendo um volume de 100 litros e nível da água de 35 cm de profundidade, para se ajustarem ao novo ambiente com o intuito de atenuar o estresse decorrente dessa fase de transição. Cada aquário acomodou um animal durante o experimento. Os aquários experimentais foram revestidos por plástico azul opaco em três lados para evitar contato visual com animais de aquários vizinhos no laboratório. A cor azul foi utilizada porque reduz o estresse em uma espécie de ciclídeo, *Oreochromis niloticus* (Volpato e Barreto, 2001), sendo a face anterior dividida em três linhas horizontais equidistantes a partir da coluna d'água, que auxiliaram na definição do grau de deslocamento vertical de cada indivíduo

Decorrido esse período, foi feita a troca de 1/3 do volume de água por sifonação, para a retirada de excrementos e outros detritos. Também, foi adicionado um pequeno saco de fibra contendo carvão ativado para a adsorção e remoção de compostos nitrogenados (amônia e nitrito) excretados pelos animais na água ao longo do experimento. Em seguida, a água foi oxigenada até atingir condições normóxicas ($\text{O}_2 = 6$ mg/L) e estabilizada em um volume de 100 litros e uma coluna de água de 35 cm, que representa a profundidade mais habitual utilizada por *P. wallacei* em seu habitat natural (M.L.G. Araújo, comunicação pessoal).

Para a elaboração do etograma da RSA, foram utilizados oito espécimes na fase neonatal e juvenil, sendo quatro ($n=4$) para a normóxia representando o grupo controle, e

quatro (n=4) para a hipóxia aguda. Os valores referentes à massa e largura do disco desses animais estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Biometria de neonatos e juvenis de *P. wallacei*, submetidos a experimento de normóxia e hipóxia aguda para elaboração do etograma da RSA.

Parâmetro	Normóxia (N = 4)		Hipóxia aguda (N = 4)	
	Média ± DP	Min – Max	Média ± DP	Min – Max
Massa (g)	85,75 ± 25,38	66 – 120	75,75 ± 17,65	50 – 92
Largura do disco (cm)	12 ± 1,82	10 – 14	11,75 ± 1,70	10 – 14

Para a coleta de dados fisiológicos, juvenis e adultos de *P. wallacei* foram distribuídos ao acaso nos mesmos grupos experimentais descritos acima (normóxia e hipóxia aguda), contendo em cada um deles oito espécimes (n=8). Os valores referentes à massa e largura do disco desses animais estão descritos na Tabela 3. A elaboração do etograma foi independente das análises fisiológicas, ou seja, para coleta desses dados experimentais foram utilizados animais diferentes. Por esse motivo, não há a possibilidade de relacionar as mudanças metabólicas em hipóxia aguda com o comportamento da RSA.

Tabela 3. Biometria de juvenis e adultos de *P. wallacei* submetidos à normóxia e hipóxia aguda para a coleta de dados fisiológicos.

Parâmetro	Normóxia N=8		Hipóxia aguda N=8	
	Média ± DP	Min – Max	Média ± DP	Min – Max
Massa (g)	224 ± 48,10	169 – 316	216,5 ± 79,46	139 – 364
Largura do disco (cm)	18,25 ± 1,38	16 – 20	16,81 ± 1,64	15 – 19

Os aquários experimentais foram distribuídos aleatoriamente, entre os dois grupos experimentais citados acima. A partir do momento em que todos os aquários atingiram as condições normóxicas ($O_2 > 5\text{mg/L}$), o experimento foi iniciado às 16 horas e finalizado às 8 horas do dia seguinte, totalizando 16 horas de experimento. Todos os ensaios obedeceram estritamente aos horários de início e fim, bem como a duração total do experimento.

Nos aquários do grupo normóxia, a aeração permaneceu ativa durante todo o transcurso do experimento. Durante esse período não houve troca de água, para evitar oscilações nas concentrações de O_2 . Nos animais expostos à hipóxia aguda, as bombas de aeração foram desligadas e o decaimento da concentração de O_2 se deu pela injeção contínua de nitrogênio gasoso, com o borbulhamento desse gás na água, que foi feito com auxílio de manômetro acoplado a um cilindro que continha N_2 , durante oito horas até que a concentração de oxigênio chegasse em torno de $1,5\text{ mg/L}$ (Soares et al., 2006). Quando essa concentração foi alcançada, os animais foram mantidos nessa condição por mais oito horas consecutivas (Figura 6), com o intuito de exacerbar as respostas fisiológicas relacionadas ao metabolismo energético em uma condição de hipóxia profunda, visto que esses animais são resistentes a essas condições.

Durante o experimento foi respeitado um fotoperíodo de 12 horas de claro: 12 horas de escuro, e no período noturno, foi utilizada lanterna de cabeça com iluminação vermelha, para contagem dos batimentos espiraculares, para minimizar o efeito das variações bruscas da luminosidade sobre as repostas comportamentais dos animais, que por sua vez, poderiam alterar a frequência espiracular, visto que Baerends (1971) em seu estudo verificou que *Astronotus ocellatus*, quando mantido em luz vermelha, apresentou atividades motoras deprimidas em comparação à luz branca.

Os parâmetros físico-químicos da água foram mensurados durante o experimento e encontram-se descritos na Tabela 4. Os intervalos obtidos nesta fase se mantiveram semelhantes aos valores mensurados durante o período de aclimação e descritos na Tabela 1.

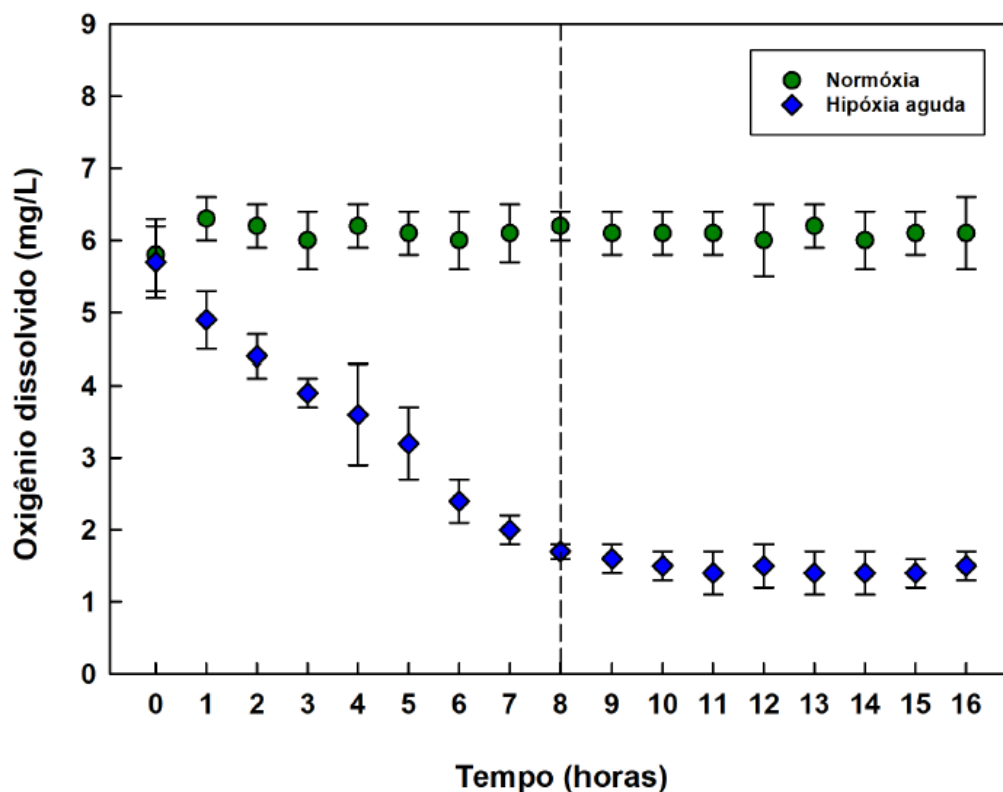


Figura 6. Curvas de oxigênio dissolvido na água em função do tempo obtidas nos grupos normóxia e hipóxia aguda. A linha tracejada separa o período de decaimento gradual da concentração de oxigênio dissolvido da fase de manutenção em hipóxia profunda (~1,5 mg/L)

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos mensurados na água dos aquários utilizados durante o período experimental de 16 horas, contendo neonatos, juvenis e adultos de *Potamotrygon wallacei*.

Parâmetro	Normóxia		Hipóxia aguda	
	Média ± DP	Min-Max	Média ± DP	Min-Max
Temperatura (°C)	27,88 ± 1,17	26,0 - 29,9	27,77 ± 1,12	26,0 - 29,9
Condutividade (µS/cm)	17,11 ± 8,79	4,4 - 29,4	18,31 ± 7,51	4,7 - 29,4
pH (unidades)	6,76 ± 0,22	6,1 - 7,0	6,73 ± 0,17	6,2 - 7,0
Amônia total (mg/L)	0,48 ± 0,32	0,0 - 1,0	0,49 ± 0,25	0,25 - 1,0

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados com eugenol, na concentração de 75 mg/L, conforme as recomendações de Lima et al. (2021). Imediatamente após, uma amostra de sangue total (3 mL) foi retirada para análise, por meio de punção do vaso branquial (Figura 7), com seringas contendo EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) dissódico 10%, como agente anticoagulante.



Figura 7. Retirada de amostras de sangue por meio de punção do vaso branquial de espécimes de *P. wallacei* previamente anestesiados.

4.3. Parâmetros comportamentais

A descrição das respostas comportamentais de *P. wallacei* mantidos em condições normóxicas e de hipóxia aguda foi feita a partir da elaboração de um etograma, já que não há etograma previamente padronizado para o requisito RSA em elasmobrânquios, visto que nem mesmo há registro de publicações que confirmem esse comportamento no grupo.

O registro do comportamento foi feito por meio de filmagem contínua durante todo o período experimental. Para isso, foi utilizado um sistema com câmeras de segurança (Intelbras) com visualização noturna (infravermelho) acopladas a um sistema de gravação Digital Video Recorder, que ficaram posicionadas perpendicularmente na face frontal dos aquários experimentais a 1,5 m de distância. Após o término dos registros,

as imagens foram analisadas caso a caso. O método de amostragem dos dados comportamentais foi transcrito em planilhas de registro, posteriormente a elaboração do etograma e a definição das unidades comportamentais.

4.4. Frequência espiracular

A frequência espiracular (FE, beats/min) foi obtida pela contagem do número de movimentos do espiráculo (abertura e fechamento) realizados durante um minuto, por meio de observação direta (Graham, 1990) a cada 60 minutos. Foi realizada duas contagens por animal e, quando houve divergência de valores, uma terceira contagem foi realizada para a confirmação do dado. Esse mesmo procedimento foi adotado para os dois tratamentos testados.

4.5. Procedimentos analíticos

4.5.1. Avaliação do hemograma

O hematócrito (Ht, %) foi determinado pelo método do micro hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), com amostras de sangue total contidas em tubos capilares. A concentração de hemoglobina sanguínea (Hb, g/dL) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Kampen e Zijlstra, 1964), enquanto a contagem do número de eritrócitos (RBC, milhões/ μ L) foi determinada por meio de leitura óptica em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) em amostras de sangue fixadas em formol-citrato, conforme o método utilizado para peixes teleósteos. Os índices hematológicos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram calculados a partir dos parâmetros mensurados no sangue, de acordo com as fórmulas de Wintrobe (1933):

$$\text{VCM (pg)} = \text{Ht} \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{HCM (fL)} = \text{Hb} \times 10/\text{RBC}$$

$$\text{CHCM (g/dL)} = \text{Hb} \times 100/\text{Ht}$$

4.5.2. Metabólitos plasmáticos

Imediatamente após a coleta das amostras de sangue, uma alíquota foi utilizada para a determinação da concentração dos corpos cetônicos (na forma de β -hidroxibutirato), que foram mensurados em duplicata, por meio de um medidor eletrônico portátil *FreeStyle Optium Neo* (Abbott do Brasil) acoplado a tiras individuais

para cada determinação (Figura 8), conforme as especificações estabelecidas pelo fabricante. As concentrações de corpos cetônicos foram expressadas em mmol/L.

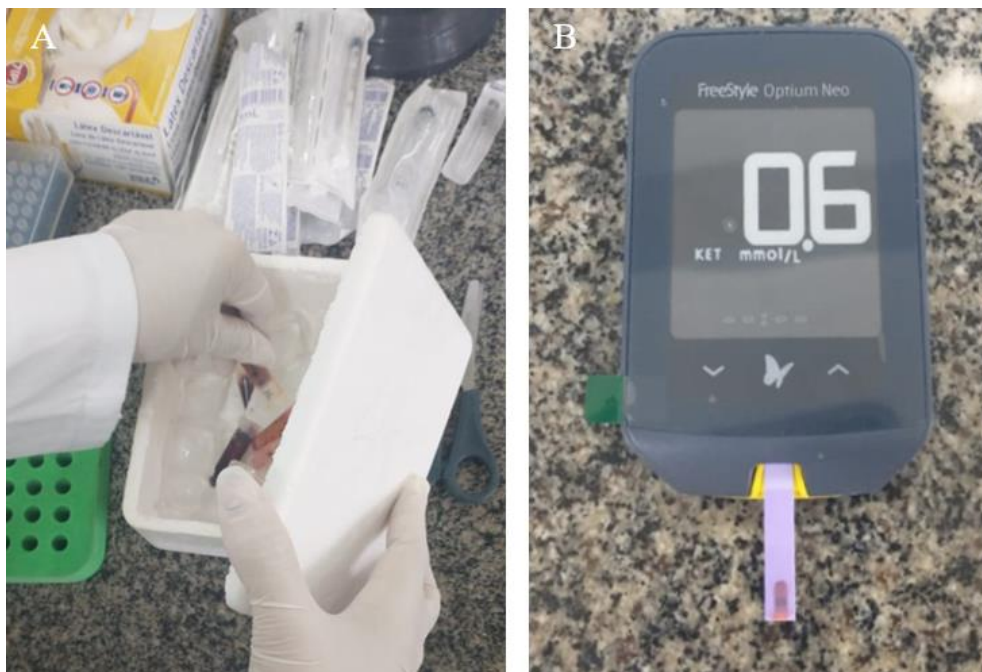


Figura 8. Amostras de sangue resfriadas em gelo, imediatamente após a coleta (A), para a determinação da concentração de corpos cetônicos (na forma de β - hidroxibutirato), por meio do uso de medidor *FreeStyle Optium Neo β -Ketone*, Abbott do Brasil(B).

O conteúdo restante de sangue foi então centrifugado para a obtenção do plasma, que foi imediatamente armazenado em ultrafreezer a -80°C e conservado nesta condição até o momento das análises de glicose e lactato.

As concentrações de glicose foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico, utilizando a glicose oxidase, que em presença de oxigênio produz peróxido de hidrogênio. Ao reagir com o fenol e de 4-aminoantipirina, o peróxido de hidrogênio sofre ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máxima absorção em 505 nm. Os valores plasmáticos de glicose foram expressos em mmol/L.

As concentrações de lactato foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico 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.

Tanto as concentrações de glicose, como as de lactato no plasma foram determinados no Laboratório de Fisiologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Amazonas, por meio da utilização de kits comerciais da marca In Vitro®, específicos para cada constituinte.

4.6. Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água como, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, foram mensurados com multiparamétrico AK87 (AKSO). As concentrações (mg/L) de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foram determinados por meio de kit comercial LabconTest, e a amônia não ionizada (NH_3 , mg/L) foi determinada por meio de cálculo, de acordo com as tabelas de conversão baseadas no pH e temperatura fornecidos pelo fabricante.

4.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram previamente testados quanto à normalidade e homoscedasticidade, pelo uso dos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente.

Para testar as variações da FE em relação à concentração de O_2 , foi aplicada a ANOVA de uma via, seguido do teste de Holm-Sidak para comparação das demais concentrações com a concentração inicial (5,6 mg/L) deste gás na água no início.

Para a análise dos dados referentes à FE em cada tempo experimental, ao eritrograma e à concentração dos metabólitos plasmáticos (glicose e lactato), foi utilizado o teste paramétrico *t de Student* para comparação das médias entre os grupos normóxia e hipóxia aguda. Nos casos em que a normalidade dos dados não foi alcançada, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para os dados de FE no tempo de 3 horas e da concentração de corpos cetônicos no sangue, houve violação da premissa de igualdade de variâncias. Nesse caso, foram utilizados os resultados do teste de Welch, em substituição ao teste *t de Student*, para comparação das médias referentes aos grupos normóxia e hipóxia aguda.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos normóxia e hipóxia quando o nível de significância foi superior a 95% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Comportamento: Etograma

O etograma foi elaborado com animais de ensaios pilotos, visto que os espécimes utilizados para coleta de dados fisiológicos não apresentaram o comportamento da RSA. Com isso, não houve número suficiente de espécimes para quantificar a RSA e relacionar este comportamento com mudanças no metabolismo ocasionadas pela hipóxia aguda.

Não houve comportamento de RSA em quatro espécimes na fase juvenil com aclimação de 30 dias, mas com 16 horas de experimento os dois animais submetidos hipóxia começaram a apresentar natação errática mudando a postura anatômica com a parte ventral para cima (Figura 9), e um deles veio a óbito.

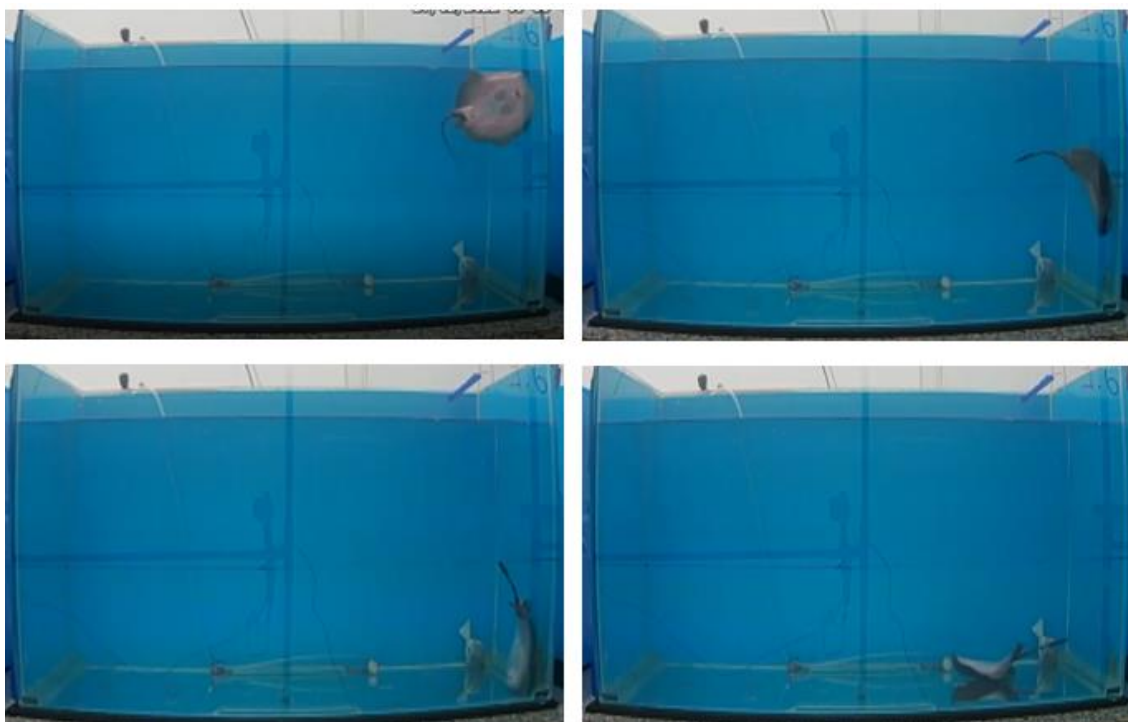


Figura 9. Juvenil de *Potamotrygon wallacei* apresentando natação errática em 16 horas de hipóxia aguda, sem realização da RSA.

Dois espécimes na fase de neonato com aclimação de 15 dias, acionaram a RSA quando submetidos a hipóxia, a partir de 4,0 mg/L de O₂ na água em 5 horas de experimento, apresentando natação errática e mudando a postura anatômica com a parte

ventral para cima em 14 horas. Os outros dois espécimes que representavam o grupo controle (normóxia) não acionaram a RSA.

Dois juvenis de *P. wallacei* aclimatados por 30 dias, que não realizaram RSA foram utilizados para elaboração do etograma, para comparar padrões e mudanças de comportamento quando submetidos a hipóxia aguda, visto que foram os espécimes mais próximos em tamanho e massa corpórea, quando comparados aos espécimes neonatos que realizaram RSA.

Quatro juvenis e doze adultos de *P. wallacei* foram utilizados para coleta de dados fisiológicos, visto que por se tratar de um animal de ciclo reprodutivo sazonal (Araújo, 1998; Carvalho et al., 2016b), a pesca ocorreu fora do período de coleta de neonatos e de juvenis na natureza, impossibilitando a continuação dos ensaios com animais nesta fase de vida. Esses 16 espécimes, com aclimação de 30 dias, não realizaram RSA durante 16 horas de experimento, nem apresentaram natação errática. Não foi registrada mortalidade nesse grupo de animais durante o ensaio.

O etograma elaborado para a RSA está descrito no Quadro 1. Foram identificadas 12 unidades comportamentais, que podem ser visualizadas nas Figuras 10 a 17.

Quadro 1. Etograma da Respiração Superficial Aquática (RSA) registrado para *Potamotrygon wallacei*.

Etograma da Respiração Superficial Aquática	
Unidade Comportamental	Descrição do Comportamento
Movimentação horizontal direção frontal e caudal.	O animal posiciona-se de maneira horizontal com a parte ventral no substrato e movimenta-se na direção frontal e caudal, agitando a água no substrato.
Natação Vertical em Zigue-Zague	O animal nada a partir do substrato, podendo chegar até a lâmina d'água ou não, e desce em direção ao substrato, com trajeto em zigue-zague tanto na subida, quanto na descida.

Natação Vertical com ângulo 45°	O animal nada a partir de 15 cm de altura, subindo até a lâmina d'água. Seu trajeto é oblíquo (forma um ângulo de 45°)
Natação próximo a lâmina d'água	O animal nada em direções aleatórias, próximo a lâmina d'água e mantém olhos, espiráculos e parte dorsal submersos.
Flutuação estativa na lâmina d'água	O animal se mantém no mesmo local de forma paralela e na lâmina d'água ondulando a nadadeira discretamente na direção frontal para a caudal. Os olhos, espiráculos e parte mais alta do dorso ficam emersos.
Flutuação dinâmica na lâmina d'água	O animal movimentar-se de forma paralela por toda a lâmina d'água, ondulando a nadadeira na direção frontal para a caudal (direcionamento do fluxo da água do disco para os espiráculos). Os olhos, espiráculos e parte mais alta do dorso ficam emersos.
Fechamento abrupto dos espiráculos	O animal se mantém no mesmo local de forma paralela e na lâmina d'água ondulando a nadadeira discretamente na direção frontal para a caudal. Os olhos, espiráculos e parte mais alta do dorso ficam emersos, onde os espiráculos são abertos com maior amplitude e são fechados de forma abrupta fazendo com que a água passe com maior pressão pelas brânquias.
Natação na lâmina d'água com dobramento das extremidades da nadadeira na parte frontal e caudal	O animal se mantém na lâmina d'água e na quina do aquário de forma curvada para baixo na parte frontal e caudal, com olhos, espiráculos e ferrão submersos e a parte mais alta do dorso emersa.
Natação na lâmina d'água com batida frontal para cima	O animal se mantém no mesmo local de forma paralela e na lâmina d'água ondulando a nadadeira indiscretamente na direção frontal para a caudal. Os

	olhos, espiráculos e parte mais alta do dorso ficam emersos. Na parte frontal da nadadeira o animal entra em contato com o vidro do aquário, fazendo com que esta parte da nadadeira seja curvada para cima, exibindo uma pequena parte ventral para parte de cima.
Direcionamento do fluxo de água do disco para os espiráculos	Movimento da nadadeira em formas de ondas proporcionando movimentação da água próximos aos espiráculos. Parte dorsal emersa. Olhos e espiráculos submersos ou emersos
Lançamento de água para cima com nadadeira	Água lançada para cima com a parte frontal da nadadeira com animal paralelo a lâmina d'água. Olhos e espiráculos emersos. O ferrão pode estar emerso ou submerso.
Repouso	Apenas mantendo a movimentação de olhos e espiráculos, estando o animal no substrato.

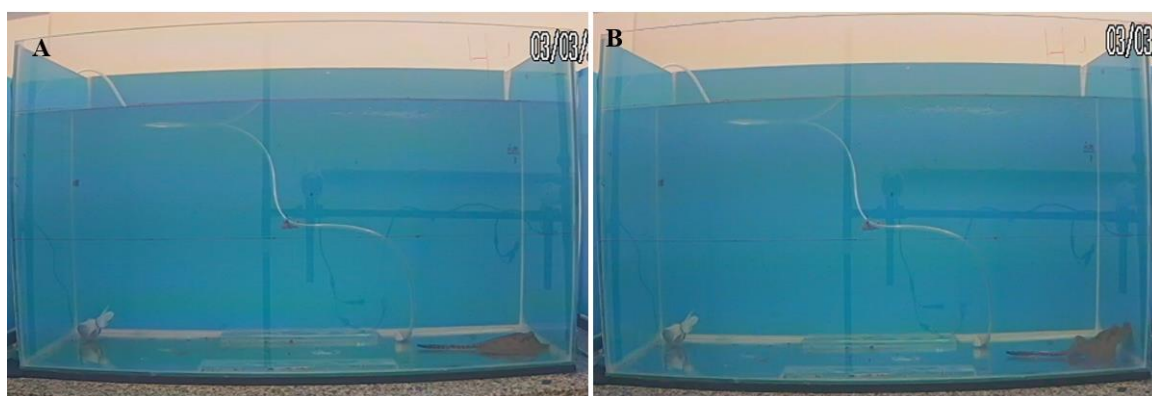


Figura 10. Movimentação horizontal em direção frontal (A) e caudal (B).

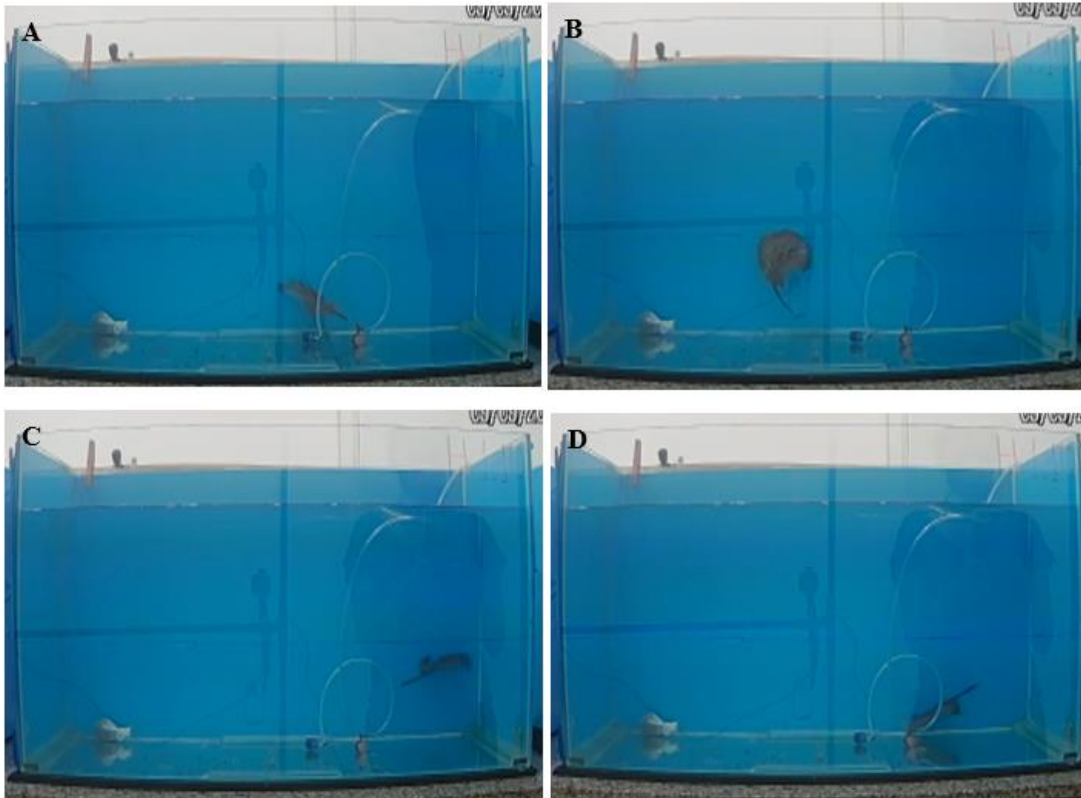


Figura 11. Natação vertical em zigue-zague (sequência A a D).

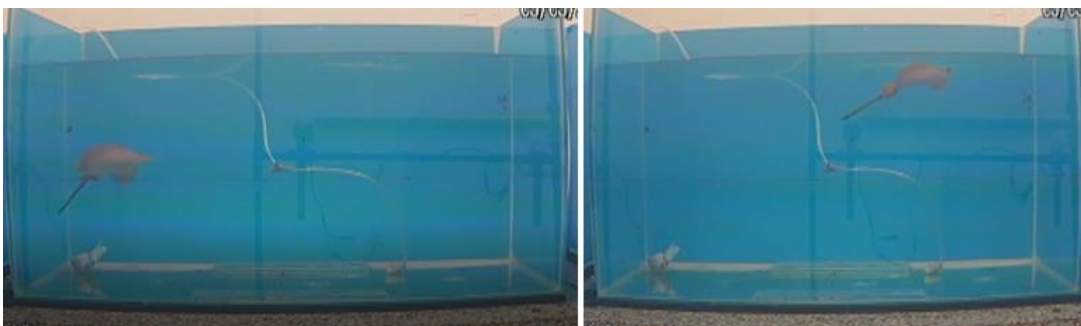


Figura 12. Natação vertical com ângulo 45°

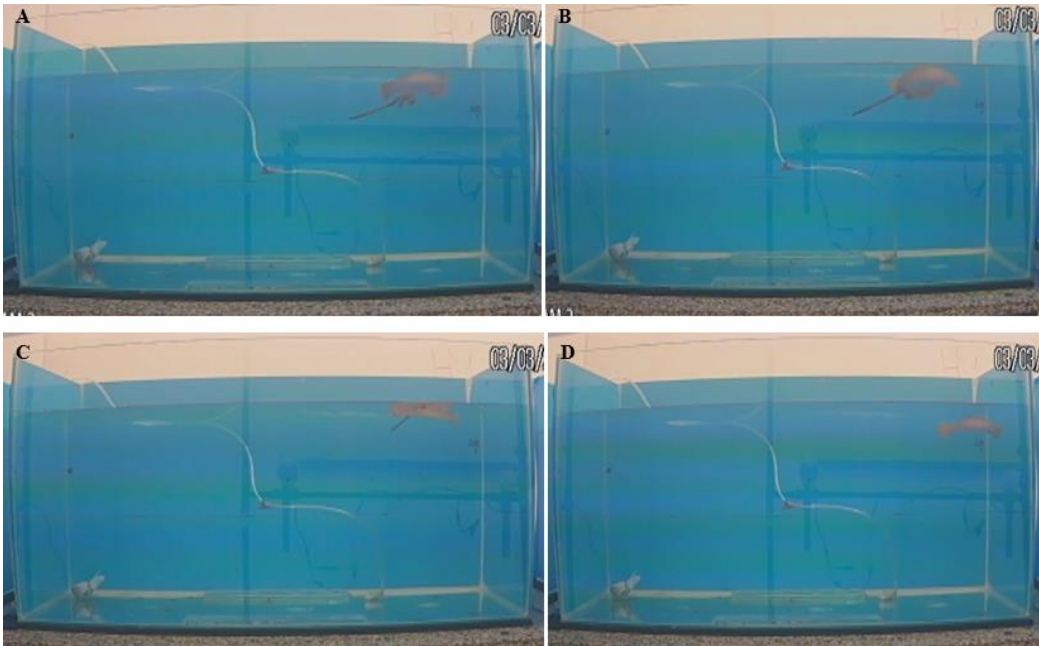


Figura 13. Natação próximo a lâmina superficial da água (sequência A a D).

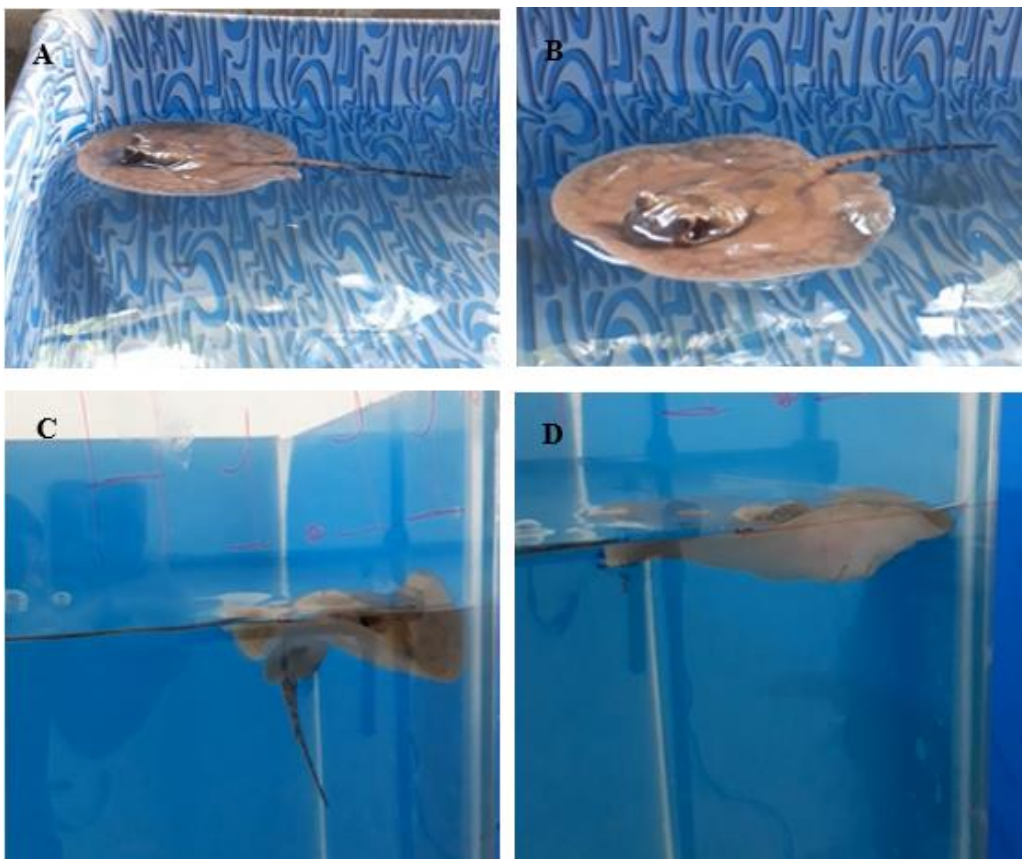


Figura 14. Flutuação estativa na lâmina superficial da água (A); Flutuação dinâmica na lâmina superficial da água (B); Natação na lâmina superficial da água com dobramento das extremidades da nadadeira na parte frontal e caudal (C); Natação na lâmina superficial da água com batida frontal para cima (D).

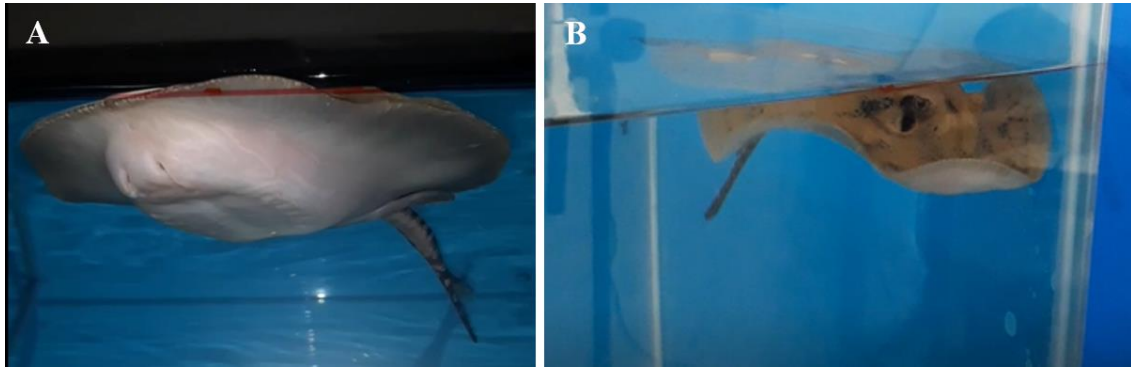


Figura 15. Direcionamento do fluxo de água do disco para os espiráculos. Visão ventral (A) e visão ligeiramente abaixo da lâmina da água (B).

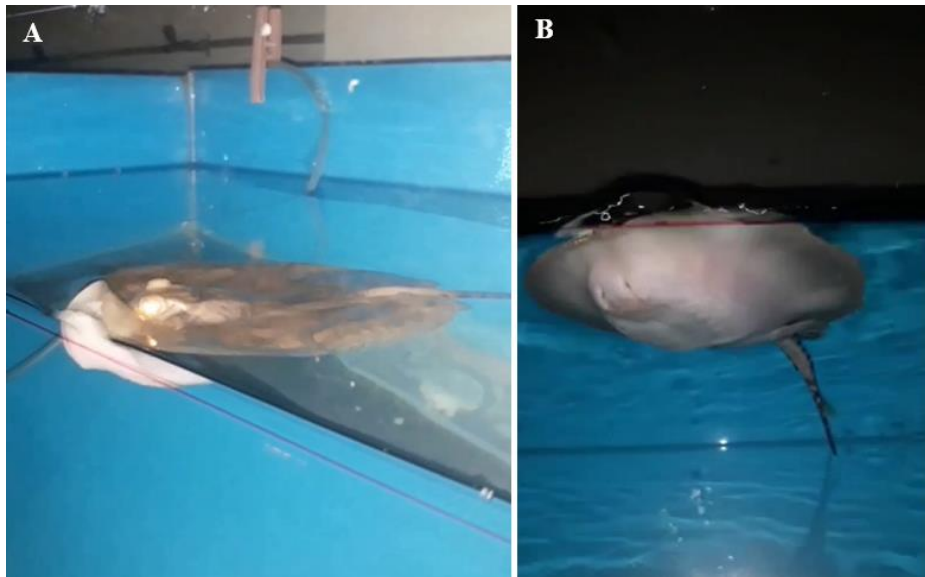


Figura 16. Lançamento de água para cima com a nadadeira em direção aos espiráculos. Visão dorsal na linha da lâmina da água (A) e visão ventral (B).



Figura 17. Arraia em repouso.

5.2. Frequência espiracular (FE)

Os espécimes mantidos em normóxia apresentaram valores de FE entre 40 e 60 beats/min ao longo das 16 horas de experimento. Entretanto, aqueles submetidos à hipóxia aguda, tiveram aumento estatisticamente significativo da FE quando comparados ao grupo exposto à normóxia, a partir do momento em que a concentração de oxigênio dissolvido atingiu valores abaixo de 3,0 mg/L (Figura 18), após 6 horas de experimento (Figura 19). Nesse grupo, a FE apresentou um valor mínimo de 38 beats/min um valor máximo de 89 beats/min, mantendo-se elevada até o final do experimento (Figura 19). O maior valor atingido para a FE nas arraias expostas à hipóxia aguda foi correspondente a 78%, quando comparado a média, dos valores de mínima e máxima registrados nas arraias mantidas em normóxia, num intervalo de tempo de 16 horas consecutivas (Figura 19). Comparando os valores de mínima e máxima da FE dos espécimes mantidos em hipóxia durante o experimento, houve um aumento de 134%.

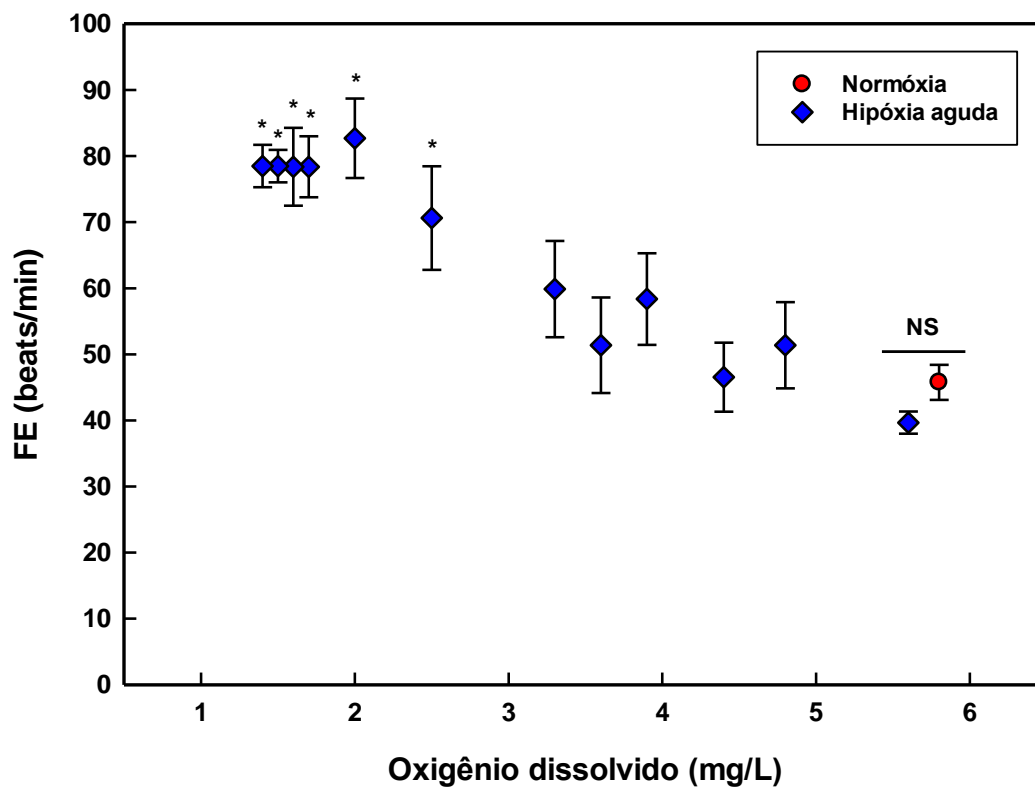


Figura 18. Valores de frequência espiracular (FE, beats/min; média \pm EP) registrados em *P. wallacei* (n = 8) em função da concentração de O₂ dissolvido na água. * indica diferença significativa (ANOVA de uma via, seguido de teste de Holm-Sidak; $p < 0,05$) em relação à concentração inicial (5,6 mg/L) do mesmo grupo. Para comparação, foi adicionado o valor médio da FE nas arraias expostas à normóxia, com concentração de O₂ igual a 5,8 mg/L. Não houve diferença significativa (NS, teste t de Student; $p > 0,05$) entre os dois grupos experimentais nesse intervalo de concentração.

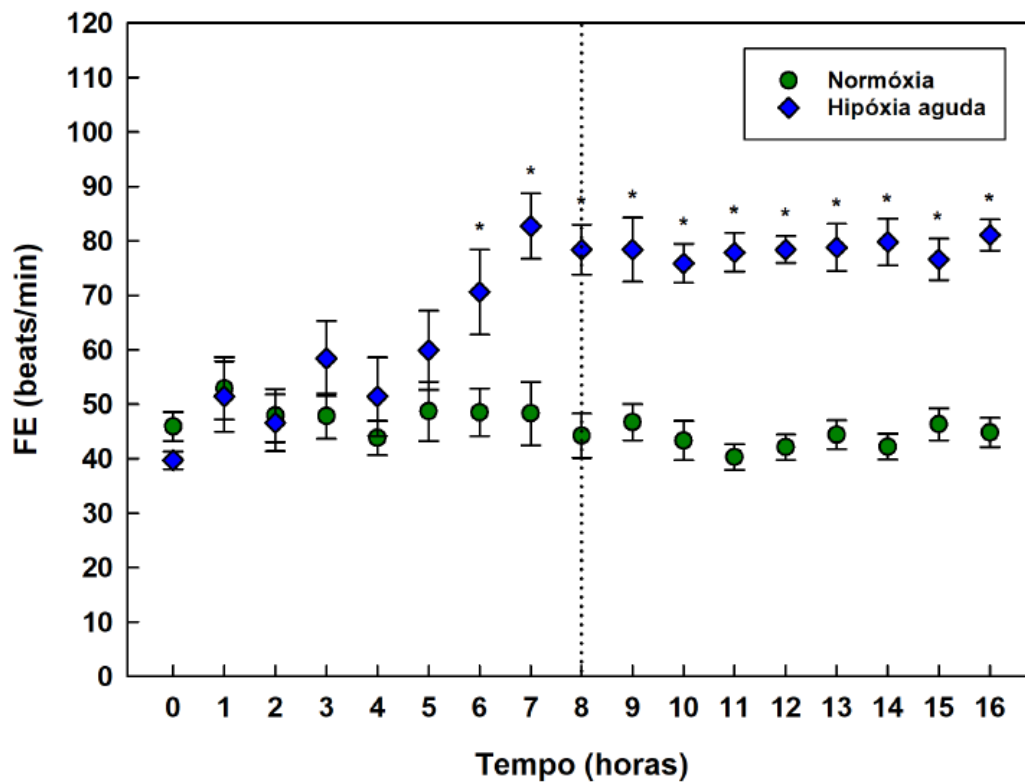


Figura 19. Valores de frequência espiracular (FE, beats/min; média \pm EP) registrada em *P. wallacei* em função do tempo de condução do experimento. A linha tracejada separa o período de decaimento gradual da concentração de oxigênio dissolvido da fase de manutenção em hipóxia profunda ($\sim 1,5$ mg/L) no grupo submetido à hipóxia aguda até a finalização do experimento. * indica diferença significativa (teste t de Student; $p < 0,05$) em cada tempo de exposição entre os grupos normóxia e hipóxia aguda.

5.3. Eritrograma

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os animais submetidos à normóxia e à hipóxia aguda quanto aos valores de hematócrito, hemoglobina, e na contagem de eritrócitos. Também não houve diferença no volume corpuscular médio (VCM), na hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) entre os grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5. Eritrograma de espécimes de *Potamotrygon wallacei* expostos à normóxia e à hipóxia aguda ao longo de 16 horas.

Parâmetro	Normóxia (N=8)		Hipóxia Aguda (N=8)	
	Média ± EP	Min - Max	Média ± EP	Min - Max
Hematócrito (%)	22,81 ± 1,86	15,6 - 31,7	22,14 ± 1,25	16,0 - 26,7
Hemoglobina (g/dL)	5,37 ± 0,25	4,2 - 6,4	4,58 ± 0,28	3,4 - 5,6
RBC (milhões/ μ L)	0,77 ± 0,09	0,5 - 1,3	0,63 ± 0,06	0,4 - 1,0
VCM (fL)	311,13 ± 31,21	165,9 - 446,7	364,03 ± 26,29	215,7 - 471,2
HCM (pg)	74,94 ± 7,80	34,4 - 103,5	74,36 ± 3,99	56,1 - 91,0
CHCM (g/dL)	24,27 ± 1,54	16,7 - 30,6	20,85 ± 1,10	17,1 - 26,0

5.4. Metabólitos sanguíneos

Não foram constatadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos de arraias submetidas à normóxia e à hipóxia aguda, quanto as concentrações de lactato e glicose no plasma e de corpos cetônicos no sangue (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração dos metabólitos (corpos cetônicos, glicose e lactato) em espécimes de *Potamotrygon wallacei* mantidos em normóxia e em hipóxia aguda ao longo de 16 horas.

Parâmetro	Normóxia (N=8)		Hipóxia aguda (N=8)	
	Média ± EP	Min – Max	Média ± EP	Min – Max
Corpos Cetônicos (mmol/L)	0,76 ± 0,12	0,35 - 1,40	0,50 ± 0,03	0,35 - 0,65
Glicose (mmol/L)	1,76 ± 0,13	1,18 - 2,29	1,48 ± 0,15	0,78 - 2,28
Lactato (mmol/L)	0,41 ± 0,06	0,15 - 0,72	0,59 ± 0,11	0,3 - 1,18

6. Discussão

6.1. Comportamento

Embora se saiba previamente que a arraia cururu realiza a RSA, tanto na natureza quanto em laboratório (Araújo, 1998, Barcellos, 1997; Pastório 2014) e, que esse comportamento ocorre predominantemente em condições hipóxicas, os animais aclimatados por 30 dias não manifestaram esse comportamento quando submetidos à hipóxia aguda, o que inviabilizou a quantificação da frequência e duração das unidades comportamentais identificadas e descritas no etograma. No entanto, pôde ser observado que esses mesmos animais flutuavam na superfície da água dentro das caçapas quando chegaram de Barcelos, nas quais as concentrações de oxigênio dissolvido na água registraram a média de 0,78 mg/L. Porém, nos últimos dias de aclimação, esses animais pararam de subir à lâmina superficial da água e se mantiveram no substrato.

A constatação de que os animais que permaneceram em aclimação por 30 dias, independente da fase de vida (juvenis e adultos) não expressaram o comportamento da RSA, enquanto aqueles aclimatados por até 15 dias realizaram tal comportamento, pode ser um indicativo de que o tempo de aclimação pode modificar o comportamento que eles exibem de forma rotineira na natureza. Essa influência pode não ser decorrente do tempo em si, mas do fato de que durante o período de aclimação, as concentrações de oxigênio dissolvido na água terem sido mantidas em valores normóxicos e estáveis (~ 5 mg/L) ao longo de todo o ciclo diário, um cenário que diverge daquele observado comumente em seu habitat natural, onde há uma flutuação diária da concentração de oxigênio dissolvido na água, que varia de patamares normóxicos durante o dia e decaem para valores de hipóxia profunda ($\leq 2,0$ mg/L) e até mesmo anóxia durante a noite. Essa mudança imposta em seu ambiente artificial pode ter influenciado os animais a modularem e modificarem o seu comportamento relacionado à RSA. Embora no ambiente marinho ocorram eventos de hipóxia ocasionados por diversos fatores, como aumento de temperatura, eutrofização e estratificação (Breitburg et al., 2018), este ambiente é mais estável do que os ambientes dulcícolas, quando relacionados à quantidade de oxigênio (Schmidt-Nielsen, 2002), visto que em ambientes de água doce há vários corpos d'água lênticos com limitações na entrada de luz (igapós e várzeas) (Kramer, 1983; Chapman e Liem, 1995). Possivelmente por isso, ainda não foi documentado que elasmobrânquios marinhos realizem a RSA (Hughes e Johnston, 1978; Craig et al., 2010).

Contudo, registros na literatura (Araújo, 1998, Barcellos, 1997; Pastório 2014), além de observações diretas em campo, revelam que as arraiais amazônicas realizam a RSA, assim como uma variedade de espécies de peixes teleósteos amazônicos. Isso nos mostra que a RSA é uma resposta comportamental comum a diversas espécies de peixes que habitam ambientes que apresentam flutuações diárias nos níveis de oxigênio (Kramer e McClure, 1982; Kramer, 1983; Soares e Junk, 2000). Soares et al. (2006) verificaram que, entre 20 espécies estudadas, mais da metade realizaram a RSA em resposta à hipóxia e anóxia. Nesse sentido, apesar de ser um evento único entre os elasmobrânquios em geral, não seria surpreendente constatar que espécimes de *P. wallacei*, por viverem quase que exclusivamente nas florestas de igapó, também utilizam esse comportamento para sobreviverem e maximizarem a exploração desse nicho. Existem registros de espécies de elasmobrânquios marinhos, como a arraia *Rhinoptera bonasus*, habitando zonas hipóxicas com concentrações de $O_2 \leq 2,0$ mg/L em áreas da plataforma continental do Golfo do México. No entanto, não há evidências de que esta espécie manifeste o comportamento da RSA nestas condições (Craig et al., 2010). Da mesma forma, a aclimação de outra espécie marinha, *Torpedo marmorata* à hipóxia profunda (Hughes e Johnston, 1978) por mais de cinco horas (também com a injeção de N_2 gasoso no sistema) não desencadeou a RSA como uma resposta comportamental.

Como já mencionado, a manifestação da RSA é ampla entre os peixes amazônicos e independe de relações filogenéticas, já que diferentes grupos taxonômicos incluindo elasmobrânquios, expressam esse comportamento. Essa ampla manifestação pode ser decorrente de uma convergência evolutiva dos peixes em resposta a uma força comum e extremamente importante nos ambientes aquáticos amazônicos, caracterizada pelas oscilações diárias regulares, assim como por variações sazonais cíclicas na disponibilidade de O_2 que ocorrem em função das mudanças na hidrologia da região e dos níveis das águas (Junk et al., 1983). Quando eventos climáticos em nível global são considerados, por exemplo, existem evidências para duas espécies de teleósteos marinhos que habitam recifes de corais, de que o aumento da temperatura da água em $3,0$ °C ocasionou a perda da tolerância à hipóxia, condição não revertida com a aclimação destes animais a altas temperaturas por semanas seguidas (Nilsson et al., 2010), demonstrando que a tolerância à hipóxia associada à manifestação de comportamentos como a RSA, é uma importante estratégia de sobrevivência em diferentes ambientes aquáticos tropicais, especialmente na Amazônia.

6.2. Fisiologia

6.2.1. Frequência espiracular (FE)

Os valores de FE obtidos para *P. wallacei* mantidas em condições normóxicas (40 a 60 beats/min) são condizentes com o intervalo obtido por Pastório (2014) com neonatos e juvenis da espécie expostos à hipóxia progressiva. Por outro lado, a FE registrada neste estudo está acima dos valores encontrados para outros elasmobrânquios marinhos submetidos à condições normóxicas e/ou pré-hipóxicas, como os tubarões *Scyliorhinus canicula* com FE = 34 beats/min (Metcalf & Butler, 1984), *Hemisyllium ocellatum*, com médias oscilando entre 30 e 36 beats/min (Chapman et al., 2011; Routley et al., 2002), *Chiloscyllium punctatum* com média de 24 beats/min (Chapman et al., 2011) e *Raja ocellata*, com 20 beats/min, na qual as medidas deste parâmetro também foram feitas por contagem direta dos movimentos do espiráculo (Graham et al., 1990).

Os espécimes submetidos à hipóxia aguda praticamente dobraram a frequência espiracular, a partir do momento em que a concentração de oxigênio dissolvido na água decaiu para 2,5 mg/L, confirmando os resultados obtidos em estudo anterior realizado com neonatos e juvenis de *P. wallacei* submetidos à hipóxia progressiva por 48 e 72 horas, respectivamente (Pastório, 2014), bem como com outras espécies de elasmobrânquios, como nos tubarões *S. canicula*, que aumentou a frequência branquial após exposição rápida à hipóxia moderada (~4 mg.L⁻¹; Metcalf e Butler, 1984) e *H. ocellatum*, que atingiu frequências médias de 80 beats/min quando a concentração de oxigênio atingiu 1,25 mg/L (Routley et al., 2002). Esse aumento da FE observado em espécimes de *P. wallacei* foi acompanhado por incrementos importantes na amplitude de abertura de seus espiráculos, especialmente quando as concentrações de O₂ decaíram para valores abaixo de 2,0 mg/L. A presença de um espiráculo proporcionalmente grande em relação ao tamanho corpóreo e a constatação de uma ampla área de superfície branquial (Duncan et al., 2015), podem constituir-se em adaptações vantajosas que proporcionem maior capacidade de trocas gasosas, já que os ambientes de igapó onde *P. wallacei* habita normalmente apresentam baixas concentrações (<4,0 mg/L) de oxigênio dissolvido na água (Duncan e Fernandes, 2010).

Essa resposta indica que *P. wallacei* aumentou a ventilação com o propósito de incrementar o volume de água que passa pelas brânquias na tentativa de maximizar a captação de oxigênio, sem necessariamente deprimir a taxa metabólica, como acontece

com algumas espécies marinhas, como o tubarão epaulette *H. ocellatum* (Routley et al., 2002). Outra possibilidade é que o tempo de exposição à hipóxia aguda não foi suficiente para acionar outras vias para obtenção de energia, como a ativação do metabolismo anaeróbico, com consequente aumento das concentrações sanguíneas e teciduais de lactato, resposta observada em espécies de arraias marinhas, como *T. marmorata* (Hughes & Johnston, 1978) e *Zearaja maugeana* (Morash et al., 2020). Neste ensaio, a resposta apresentada por *P. wallacei* demonstra que a espécie utiliza a hiperventilação como mecanismo de regulação do metabolismo para se contrapor aos eventos cíclicos de decaimento da concentração de oxigênio dissolvido na água que ocorrem durante o período noturno nas áreas de igapó, permitindo-a explorar ambientes que podem ser inadequados ou inóspitos para outros potamotrigonídeos que vivem na bacia do Rio Negro (Duncan e Fernandes, 2010). Além disso, considerando que a FE se manteve aumentada até o momento final de exposição à hipóxia aguda em relação ao grupo mantido em normóxia, é possível afirmar que a hiperventilação branquial, dentro do conjunto de variáveis analisadas, pode ser reconhecida como um mecanismo relevante de ajuste empregado por *P. wallacei* para lidar com os eventos de hipóxia ambiental que ocorrem diariamente em seu habitat natural.

6.2.2. Eritrograma

Os valores obtidos para o eritrograma dos espécimes de *P. wallacei* mantidos em normóxia e expostos à hipóxia aguda estão dentro do intervalo de variação registrado para animais de vida livre coletados na bacia do médio Rio Negro (Oliveira et al., 2016). Em peixes teleósteos, a exposição à hipóxia é geralmente acompanhada por aumentos marcantes nas concentrações circulantes de cortisol, que desencadeiam alterações em diversos parâmetros do sangue, incluindo o eritrograma (Wendelaar Bonga, 1997). No entanto, estas respostas não são observadas na mesma frequência nas espécies de elasmobrânquios. A constatação de ausência de resposta nos parâmetros como o hematócrito, a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos, bem como dos índices hematimétricos obtidos em espécimes de *P. wallacei* expostas à hipóxia aguda neste ensaio corroboram os resultados prévios registrados para neonatos e juvenis da espécie submetidos à hipóxia progressiva por 48 e 72 horas, respectivamente (Pastório, 2014). Essa tendência também é observada em diversas espécies marinhas do grupo, como o tubarão epaulette (*H. ocellatum*) e a arraia-viola (*A. rostrata*), que não apresentaram mudanças no hematócrito, concentração de hemoglobina e no CHCM em

resposta à hipóxia progressiva (Speers-Roesch et al., 2012a). Routley et al. (2002) também constataram que o tubarão epaulette não altera o hematócrito em resposta à hipóxia. Speers-Roesch et al. (2012a) afirmam ainda que estudos anteriores com elasmobrânquios, também demonstraram a ausência de mudanças no hematócrito e na concentração de hemoglobina em situações de hipóxia progressiva.

Quando espécimes de *P. wallacei* (= *Potamotrygon* cf. *histrix*) foram confinados em caçapas e transportados durante 24 horas em barco na região de Barcelos, também não foram constatadas alterações nos parâmetros hematológicos (Brinn et al., 2012). Essa ausência de mudanças nas variáveis sanguíneas em resposta a diferentes estressores pode indicar que os elasmobrânquios não respondem da mesma forma a situações de estresse, como observado na maioria dos teleósteos, que aumentam os níveis circulantes de corticosteroides e catecolaminas, desencadeando eventos de hiperglicemia e aumento de lactato no sangue, além de distúrbios na osmorregulação e mudanças nos parâmetros hematológicos, em especial no hematócrito, no VCM e número de eritrócitos (Wendelaar Bonga, 1997). Diante disso, apesar dos parâmetros do eritrograma estarem relacionados com a capacidade de transporte de oxigênio no sangue em peixes e nos demais vertebrados (Schimdt-Nielsen, 2002), o ajuste destas variáveis no sangue em condições de hipóxia aguda, assim como em hipóxia progressiva (Pastório, 2014), não parece ser uma estratégia relevante para a manutenção da homeostase de *P. wallacei* frente às oscilações na disponibilidade de oxigênio que ocorrem no ambiente.

6.2.3. Metabólitos sanguíneos

Para a grande maioria das espécies de teleósteos, a exposição a determinados estressores como a hipóxia, levam a aumentos diretos nas concentrações circulantes de diversos metabólitos no sangue, em especial a glicose (Wendelaar Bonga, 1997; Routley et al., 2002). Essa resposta é consequência da ação direta do fator estressante sobre o eixo neuroendócrino hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) que desencadeia aumentos na concentração do hormônio cortisol, responsável pela quebra das reservas de glicogênio tecidual (muscular e hepático), que aumenta a disponibilidade de moléculas livres de glicose necessárias para manter um metabolismo incrementado, permitindo que o animal enfrente essa mudança na atividade metabólica durante a ação do agente estressor.

Contudo, no caso dos elasmobrânquios o cenário é diferente, já que as respostas ao estresse não seguem os padrões gerais documentados para os teleósteos e mamíferos (Ballantyne, 1997; Speer-Roesch e Ballantyne, 2006; Speers-Roesch e Treberg, 2010; Skomal e Mandelman, 2012). Para *P. wallacei*, a ausência de modificações nas concentrações de glicose no plasma entre os grupos normóxia e hipóxia aguda já era esperada, pois neonatos e juvenis da espécie previamente submetidos à hipóxia progressiva (Pastório, 2014) também registraram ausência de respostas glicêmicas. Esse padrão parece ser comum a outra espécie de arraia de água doce, *P. motoro*, também submetida a uma condição de hipóxia (Speer-Roesch et al., 2006), assim como em representantes marinhos, como a arraia-viola (Speers-Roesch et al., 2012b) e o tubarão epaulette (Routley et al., 2002; Speers-Roesch et al., 2012a).

Por outro lado, uma resposta hiperglicêmica foi observada em juvenis de *P. wallacei* submetidos a transporte de longa duração (32 horas, incluindo trecho por via aérea) sem a adição do óleo essencial de *Lippia alba*, um agente anestésico que evitou aumento nas concentrações de glicose no grupo de arraias transportadas com ele (Ariotti et al., 2021). No entanto, essa resposta hiperglicêmica foi revertida após 24 horas de recuperação no destino final. Tal estudo demonstra que situações mais extremas de estresse podem acionar o metabolismo dos carboidratos nos elasmobrânquios, de maneira similar ao registrado para os teleósteos, embora sob controle hormonal distinto (1 α -hidroxicorticosterona *versus* cortisol) nos dois grupos.

Recentemente, a ação glicocorticoide do 1 α -hidroxicorticosterona (1- α HO-B) foi proposta para uma espécie de tubarão marinho, *Scyliorhinus canícula* (Ruiz-Jarabo et al., 2019), que tiveram um quadro hiperglicêmico e aumentos proporcionais de 1- α HO-B no plasma ao serem expostos ao ar (asfixia), como agente estressor. Por outro lado, Brinn et al. (2012) sugeriram a utilização da corticosterona, outro esteroide produzido pelos elasmobrânquios, como indicador de estresse de ação mineralocorticoide para juvenis de *P. wallacei* em situação de estresse provocado pelo transporte fluvial, no qual as concentrações deste hormônio responderam proporcionalmente à quantidade de amônia presente na água em que as arraias foram mantidas. Isso demonstra que são necessários ainda muitos estudos para que possamos avançar no entendimento do papel destes hormônios na regulação das concentrações de glicose e de outros metabólitos que atuam na manutenção do metabolismo das espécies de elasmobrânquios frente a diferentes tipos de estressores. Nesse sentido, a hipóxia ambiental, fenômeno comum não somente nas

águas interiores como na Amazônia, mas também nos oceanos e zonas costeiras (Breitburg et al., 2018), se apresenta como um dos maiores desafios a serem enfrentados pelos organismos aquáticos, em função dos eventos de aquecimento global cada vez mais frequentes nestes ambientes.

Diferentemente da glicose, que parece ter um papel secundário na manutenção do metabolismo intermediário, os corpos cetônicos e aminoácidos têm sido apontados como combustíveis oxidativos preferenciais utilizados nas atividades rotineiras em diversas espécies de elasmobrânquios marinhos (Ballantyne, 1997; Speer-Roesch e Ballantyne, 2006; Speers-Roesch e Treberg, 2010). Esses combustíveis energéticos são importantes para os elasmobrânquios em condições de alimentação normal e, não somente em situações de inanição, como ocorre nos demais vertebrados, especialmente os mamíferos (Ballantyne, 1997). Elevadas concentrações de ureia promovem efeitos no catabolismo extra-hepático dos lipídeos, reduzindo o transporte de ácidos graxos não esterificados e aumentando a necessidade de dependência dos corpos cetônicos para a produção em tecidos como os músculos. Contudo, como as espécies de elasmobrânquios de água doce não acumulam ureia, já que são naturalmente hiperosmóticas, aparentemente não há a interferência deste composto no transporte de lipídeos para os tecidos extra-hepáticos e, com isso, a dependência por corpos cetônicos tende a ser menor. Isso nos leva a sugerir que as arraias amazônicas, em especial *P. wallacei* que possui baixas concentrações de ureia em seu sangue (0,11-0,68 mmol/L; Brinn et al., 2012), dependem em menor grau deste combustível oxidativo em comparação aos elasmobrânquios marinhos.

Além disso, informações disponíveis sobre os corpos cetônicos em elasmobrânquios submetidos a diferentes estressores são ainda limitadas. Dentro do conhecimento existente, não há evidências na literatura de mensuração de corpos cetônicos no sangue de elasmobrânquios de água doce, tendo como único registro, o estudo realizado por Pastório (2014), que submeteu juvenis de *P. wallacei* à hipóxia progressiva sem, no entanto, encontrar diferenças nas concentrações de β -hidroxibutirato (β -HB) entre estes animais e os mantidos em condições normóxicas. De forma comparativa, as concentrações de β -HB registrados para *P. wallacei* (0,35-1,4 mmol/L) no presente estudo estão condizentes com o intervalo observado nos juvenis da mesma espécie (0,6-3,3 mmol/L; Pastório, 2014), sendo superior aos registrados no tubarão epaulette (0,69-0,97 mmol/L) e na arraia-viola (0,12-0,23 mmol/L) em condições de pré-exposição à hipóxia (Speers-Roesch et al., 2012a,b), bem como na arraia do Atlântico,

Hypanus sabinus (0.24-0.29 mmol/L) estressada por exposição ao ar (Lambert et. al., 2018). Mais estudos, sobretudo em espécies de água doce, são necessários para entender a importância e os mecanismos envolvidos na utilização dos corpos cetônicos como combustíveis oxidativos em diferentes condições estressoras.

Como a exposição à hipóxia preconiza uma deficiência na oferta de oxigênio para o funcionamento dos tecidos, uma alternativa esperada seria uma possível mudança no metabolismo, com ativação da via anaeróbica, visando manter a oferta de ATP aos tecidos, mesmo que em menor rendimento. Normalmente a via anaeróbica leva a queima da glicose com formação de lactato, ao invés de CO₂ e água, como produtos finais. No entanto, essa possibilidade não foi observada no presente estudo, já que as concentrações de lactato plasmático não sofreram alterações pela exposição à hipóxia aguda nos espécimes de *P. wallacei*, mesmo com a concentração de O₂ atingindo uma condição de hipóxia profunda (~1,5 mg/L). Nesse caso, é possível sugerir que o tempo de exposição à hipóxia pode ser um fator determinante para o acionamento dessa resposta. Essa possibilidade se sustenta no fato de que juvenis da mesma espécie expostos à hipóxia progressiva por 72 horas apresentaram aumento nas concentrações de lactato, originado a partir da mobilização das reservas de glicogênio muscular, como produto da ativação do metabolismo anaeróbico, em função dos mesmos possuírem livre mobilidade nos aquários experimentais, com acesso à superfície da coluna d'água (Pastório, 2014). No tubarão epaulette também ocorreu o aumento na concentração de lactato, a partir do momento em que as concentrações de O₂ na água decaíram para 2,2 e 1,7 mg/L (Routley et al., 2002; Speers-Roesch et al., 2012a), assim como na arraia-viola, com concentrações de O₂ em torno de 3,6 mg/L (Speers-Roesch et al., 2012a). Por outro lado, neonatos de *P. wallacei* expostos a hipóxia progressiva (Pastório, 2014) não manifestaram aumento nas concentrações de lactato, nem mobilização de glicogênio muscular, indicando o uso de estratégias diferentes nessa fase inicial de vida para lidar com situações diárias de hipóxia ambiental. Outro fator que pode contribuir para diferenças na concentração de lactato no sangue é a sensibilidade de cada espécie a um determinado agente estressor. Nesse sentido, Frick et al. (2010) demonstraram para duas espécies de tubarões, *Heterodontus portusjacksoni* e *Mustelus antarcticus*, que o exercício intenso causado pela captura com rede de arrasto provocou aumentos diferenciados nas concentrações de lactato, em especial na segunda espécie. Isso demonstra que a resposta do metabolismo frente a um estressor depende da sensibilidade de cada espécie. No caso de *P. wallacei*, sendo uma

espécie naturalmente resistente à hipóxia e vivendo nas florestas de igapó, é possível que a mesma responda de forma mais branda a esse tipo de estressor ambiental do que outras espécies de potamotrigonídeos.

Do ponto de vista comparativo, as concentrações de lactato presentes no plasma dos espécimes adultos de *P. wallacei* expostos à normóxia e hipóxia aguda estão dentro do intervalo de variação observada para espécie (Pastório, 2014; Lima et al., 2021), bem como para uma variedade de espécies de elasmobrânquios marinhos minimamente estressados (condição basal e/ou controle), ou em recuperação após serem submetidos a uma condição aguda por diferentes tipos de estressores (Cliff e Thurman, 1984; Wise et al., 1998; Frick et al., 2009, 2012; Ruiz-Jarabo et al. 2019; Scarponi et al., 2021). Em geral, nestas condições, as concentrações de lactato não ultrapassam valores acima de 1,0 mmol/L no plasma.

7. Conclusões

Apesar de não ter sido possível mensurar a participação da RSA na capacidade de obtenção do oxigênio, pela ausência de repostas comportamentais nos espécimes aclimatados por 30 dias e submetidos à hipóxia aguda, o presente estudo demonstrou que *P. wallacei* expressa esse comportamento em condições hipóxicas. Isso nos permite sugerir que essa estratégia deve ser utilizada pelos animais quando expostos a situações transitórias de hipóxia (principalmente no período noturno) em seus ambientes naturais.

Potamotrygon wallacei parece se utilizar da hiperventilação como o principal mecanismo fisiológico para se ajustar à condição de hipóxia aguda estabelecida ao longo das 16 horas de exposição. Por outro lado, a ausência de respostas no eritrograma (que reflete a capacidade de transporte de O₂ no sangue) e no metabolismo, como o uso dos corpos cetônicos e de glicose, com formação de lactato por via anaeróbica, indica que o tempo de exposição à hipóxia aguda não ter sido suficiente para acionar estes mecanismos de compensação energética.

Sendo uma espécie de arraia que habita um ambiente caracteristicamente hipóxico e possuindo espiráculos proporcionalmente grandes quando relacionado ao corpo, estes animais parecem já estar habituados a responder a situações de hipóxia ambiental com a hiperventilação por mais de 12 horas, evitando a utilização de estoques de energias de tecidos e ativação do metabolismo anaeróbico.

8. Referências

- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; HOCHACKA, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an underexplored biological “goldmine”. In: *Surviving Hypoxia: mechanisms of control and adaptation* (ed. Hochachka, P. W., Lutz, P.L., Sick, T., Rosenthal, M., Thillart, G. van den). CRC Press, Boca Raton, pp. 435-445
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; HOCHACKA, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: *Environmental and Ecological Biochemistry* (ed. Hochachka, P.W. and Mommsen, T.). Elsevier Science, Amsterdam, pp 45-55.
- ANDERSON, W.G. 2012. The endocrinology of 1 α -hydroxycorticosterone in elasmobranch fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 162: 73-80.
- 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.
- ARIOTTI, K.; MARCON, J.L.; FINAMOR, I.A.; BRESSAN, C.A.; LIMA, C.L.; SOUZA, C.F.; CARON, B.O.; HEIZMANN, B.M; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. 2021. *Lippia alba* essential oil improves water quality during transport and accelerates the recovery of *Potamotrygon wallacei* from the transport-induced stress. *Aquaculture*, 545: 737176.
- BAERENDS, G.P. 1971. The ethological analysis of fish behavior. In: *Fish Physiology* (ed. Hoar, W.S. and Randall, D.J.). Academic Press, New York, 6: 279-370.
- BALLANTYNE, J.S. 1997. Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part 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.

BARTON, B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: Fish Stress and Health in Aquaculture. (ed. Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., and Schreck, C.B.). Society for Experimental Biology, Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, pp. 1-33.

BICUDO, J.E.P.W.; JOHANSEN, K. 1979. Respiratory gas exchange in the air-breathing fish, *Synbranchus marmoratus*. Environmental Biology of Fishes, 4: 55-64.

BRAUNER, C.J.; BALLANTYNE, C.L.; RANDALL, D.J.; VAL, A.L. 1995. Air breathing in the armored catfish (*Hoplosternum littorale*) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulfide rich waters. Canadian Journal of Zoology, 73: 739-744.

BREITBURG, D.; LEVIN, L.A.; OSCHLIES, A.; GRÉGOIRE, M.; CHAVEZ, F.P.; CONLEY, D.J.; GARSON, V.; GILBERT, D.; GUTIÉRREZ, D.; ISENSEE, K.; JACINTO, G.S.; LIMBURG, K.E.; MONTES, I.; NAQVI, S.W.A; PITCHER, G.C.; RABALAIS, N.N; ROMAN, M.R.; SEIBEL, B.A.; TELSZEWSKI, M.; YASUHARA, M.; ZHANG, J. 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. Science, 359, 7240.

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 Physiology Part A, 162: 139-145.

CARVALHO, M.R.; LOBODA, T.S.; DA SILVA, J.P.C.B. 2016a. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, *Styracura*, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941) (Chondrichthyes: Myliobatiformes). Zootaxa, 4175 (3): 201-221.

CARVALHO, M.R.; ROSA R.S.; ARAÚJO, M.L.G. 2016b. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of *Potamotrygon*. Zootaxa, 4107 (4): 566-586.

CATLING, D.C.; ZAHNLE, K.J.; MCKAY, C.P. 2001. Biogenic methane, hydrogen escape, and the irreversible oxidation of early Earth, Science, 293: 839-843.

CHAPMAN, L.J.; LIEM, K.F. 1995. Papyrus swamps and the respiratory ecology of *Barbus neumayeri*. Environmental Biology of Fishes, 44: 183-197.

CHAPMAN, L.J.; MCKENZIE, D.J. 2009. Chapter 2 - Behavioral Responses and Ecological Consequences. Fish Physiology, 27: 25-77

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 and Biochemistry* 37: 387–399.

CHIPPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; LOPES, N.P.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry Physiology* 141: 347–355.

CLIFF, J.; THURMAN, G.D. 1984. Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 78: 167–173.

CRAIG, J.K.; GILLIKIN, P.C.; MAGELNICKI, M.A.; MAY, L.N. 2010. Habitat use of cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in a highly productive, hypoxic continental shelf ecosystem. *Fisheries Oceanography*. 19:4, 301–317.

LIMA, C.L.; MORALES-GAMBA, R.D.; MALCHER N.T.S.; BARCELLOS, J.F.M.; HEINZMANN, B. M.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B.; MARCON, J.L. 2021. Eugenol and *Lippia alba* essential oils as effective anesthetics for the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon wallacei* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*. 47: 2101-2120.

DIAZ, R.J.; BREITBURG, D.L. 2009. The hypoxic environment. In *Hypoxia* (ed. J. G. Richards A. P. Farrell and C. J. Brauner). Elsevier Science, San Diego, pp. 1-23.

DUNCAN, W.P.; FERNANDES, M.N. 2010. 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), 454–464.

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

ESTEVEES, F.A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Interciência, 2ª Edição. Rio de Janeiro. pp. 226.

FRICK L.H.; WALKER T.I.; REINA R.D. 2009. The physiological response of Port Jackson sharks and Australian swellsharks to sedation, gillnet capture, and repeated sampling in captivity. *N Am J Fish Manag* 29:127–139.

FRICK L.H.; WALKER T.I.; REINA R.D. 2010. Trawl capture of Port Jackson sharks, *Heterodontus portusjacksoni*, and gummy sharks, *Mustelus antarcticus*, in a controlled

setting: Effects of tow duration, air exposure and crowding. *Fisheries Research*, 106: 344–350.

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

GRAHAM, J.B. 1997. *Air Breathing Fishes: Evolution, Diversity, and Adaptation*. Academic Press, San Diego.

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.

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.

GOULDING, M. 1980. *The Fishes and the Forest. Explorations in the Amazonian Natural History*. University of California Press, Oakland.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. 2002. Cellular metabolism, regulation, and homeostasis. In “Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution” Oxford University Press, New York. pp. 20–100.

HUGHES, G.M.; JOHNSTON, I.A. 1978. Some responses of the electric ray (*Torpedo marmorata*) to low ambient oxygen tensions. *Journal of Experimental Biology*. 73: 107–117.

HUGHES, G.M. 1984. Measurement of gill area in fishes: Practices and problems. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 64: 637–655.

IDLER, D.R., TRUSCOTT, B. 1966. 1 α -Hydroxycorticosterone from cartilaginous fish: a new adrenal steroid in blood. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 23: 615–61

IDLER, D.R., TRUSCOTT, B., 1967. 1 α -Hydroxycorticosterone: synthesis in vitro and properties of an interrenal steroid in the blood of cartilaginous fish (Genus *Raja*). *Steroids*. 9: 457–477.

JENSEN, F.B.; NIKINMAA, M.; WEBER, R.E. 1994. Perturbações ambientais do transporte de oxigênio em teleósteos peixes: causas, consequências e compensações. In: Rankin, JC, Jensen, FB (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman e Hall, New York, NY, pp. 161-175.

JUNK, W.J.; SOARES, G.M.; CARVALHO, F.M. 1983. Distribution of fish in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7: 97-431.

JUNK, W.J.; BAYLEY, P.B. & SPARKS, R.E. 1989. The flood pulse concept in River Foodplains Systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 106: 110-127.

JUNK, W.J. 1997. *The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. Ecological Studies. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. pp.536.

KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. 1964. Standardization of haemoglobinometry. In: Boroviczény, C. G. *Erythrocytometric Methods and their standardization* (ed.). *Bibliotheca Haematology*. 18: 68-72.

KRAMER, D.L.; LINDSEY C.C.; MOODIE, G. E. E.; STEVENS, E.D. 1978. The fishes the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns, *Canadian Journal of Zoology*. 56: 717.

KRAMER, D.L.; MCCLURE, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environmental Biology of Fishes*. 7: 47-55.

KRAMER, D. L. 1983. The evolutionary ecology of respiratory mode in fishes: An analysis based on the costs of breathing. *Environmental Biology of Fishes*. 9: 145-158.

KRAMER, D.L. 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes*, 18: 81-92.

LAMBERT, F.N.; TREBERG, J.R.; ANDERSON, W.G.; BRANDT, C.; EVANS, A.N. 2018. The physiological stress response of the Atlantic stingray (*Hypanus sabinus*) to aerial exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 219-220: 38-43.

LEWIS, W.M.JR. 1970. Morphological adaptations of cyprinodontoids for inhabiting oxygen deficient waters. *Copeia*, 319-326.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, pp. 49-76.

MCKENZIE, D. J.; PIRACCINI, G.; PICCOLELLA, M.; STEFFENSEN, J. F.; BOLIS, C.L.; TAYLOR, E.W. 2000. Effects of dietary fatty acid composition on metabolic rate and responses to hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 22: 281-296.

METCALFE, J.D. E 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.; ALTRAN, A.E.; AVILEZ, I.M.; BARBOSA, C.C.; BIDINOTTO, P.M. 2005. Metabolic adjustments during semi-aestivation of the marble swamp eel (*Synbranchus Marmoratus*, Bloch 1795) – a facultative air breathing fish. Brazilian Journal of Biology. 65(2):305-312

MORASH, A.J.; LYLE, J.M.; CURRIE, S.; BELL, J.D.; STEHFEST, K.M.; SEMMENS, J.M. 2020. The endemic and endangered Maugean skate (*Zearaja maugeana*) exhibits short-term severe hypoxia tolerance. Conservation Physiology 8(1): 105.

MUUSZE, B.; MARCON, J.; VAN DEN THILLART, G.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1998. Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 120: 151-156.

NILSSON, G.E.; OSTLUND-NILSSON S.; MUNDAY P.L. 2010. Effects of elevated temperature on coral reef fishes: loss of hypoxia tolerance and inability to acclimate. Comparative Biochemistry and Physiology. 156(4):389-93.

OLIVEIRA, A.T.; ARAÚJO, M.L.G.; LEMOS, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C.; PANTOJA-LIMA, J.; ARIDE, P.H.R.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. 2017. Ecophysiological interactions and water-related physicochemical parameters among freshwater stingrays. Brazilian Journal of Biology, 77(3): 616-621.

OLIVEIRA, A.T.; SANTOS, M.Q.C.; ARAÚJO, M.L.G.; LEMOS, J.R.G.; SALES, R.S.A.; ARIDE, P.H.R.; PANTOJA-LIMA, J.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. 2016. Hematological parameters of three freshwater stingray species (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the middle Rio Negro, Amazonas state. Biochemical Systematics and Ecology 69: 33-40.

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. Macapá: Embrapa Amapá, pp.18.

OLIVEIRA, E.F.; LUIZ, E.A.; AGOSTINHO, A.A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. 2001. Fish assemblages in littoral areas of the upper Paraná river floodplain, Brazil. Acta Scientiarum, 23(2):369-376.

PASTÓRIO, P.C.C. 2014. Respostas fisiológicas à hipóxia gradual em neonatos e juvenis da arraia cururu *Potamotrygon* cf. *histris*. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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.

ROUTLEY M.H.; NILSSON G.E.; RENSHAW G.M. 2002. Exposure to hypoxia primes the respiratory and metabolic responses of the epaulette shark to progressive hypoxia. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A* 131: 313–321.

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

SALVO-SOUZA, R. H.; VAL, A. L. 1990. O gigante das águas doces. *Ciência Hoje*, 11:9-12.

SAWAYA, P. 1946. Sobre a biologia de alguns peixes de respiração aérea (*Lepidosiren paradoxa* Fitzinger e *Arapaima gigas* Cuvier). *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Zoologia. Universidade de São Paulo*. 11: 255-285.

SCARPONI, V.; GENNARI, E.; HUGHES, W. 2021. Physiological response to capture stress in endemic Southern African catsharks (family Scyliorhinidae) *Journal of Fish Biology*. 99: 186-196.

SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. 5^a edição. Editora Santos. São Paulo. 620p.

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 Part A*, 162:146-155.

SIOLI, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: *The Amazon. Monographia e Biologicae* (ed. H. Sioli). Dordrecht: Springer. pp. 127-165.

SOARES, M.G.M.; JUNK, W.J. 2000. Respiratory adaptations of five curimatid species (Teleostei, *Curimatidae*) to oxygen depletion in an Amazonian floodplain lake. *Proceedings of the International Association of Theoretical and Applied Limnology* 27: 1063–1069.

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.

SPEER-ROESCH, B.; IP, Y.K.; BALLANTYNE, J.S. 2006. Metabolic organization of freshwater, euryhaline, and marine elasmobranchs: implications for the evolution of energy metabolism in sharks and rays. *Journal of Experimental Biology*. 206: 2495–2508.

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.; RENSHAW, 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.; RENSHAW, 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.

THOMAS, Y.; FLYE-SAINTE-MARIE J.; CHABOT D.; AGUIRRE-VELARDE A; MARQUES GM; PECQUERIE L. 2018. Effects of hypoxia on metabolic functions in marine organisms: Observed patterns and modelling assumptions within the context of Dynamic Energy Budget (DEB) theory. *Journal of Sea Research* 143:231–42.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment: Physiological and Biochemical Aspects*. Springer-Verlag, Berlin.

VAN GINNEKEN V.J.T.; VANDERSCHOOT J.; ADDINK A.D.F.; VAN DEN THILLART G. 1995. Direct calorimetry of aquatic animals: dynamic response of biological processes. *Thermochimica Acta* 249:143–59.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 1041–1045.

WENDELAAR BONGA S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Review*, 77: 591-625.

WINTROBE, M.M. 1933. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.

WISE, G.; MULVEY, J.M.; RENSHAW, G.M.C. 1998. Hypoxia Tolerance in the Epaulette Shark (*Hemiscyllium ocellatum*). Journal of Experimental Zoology. 281: 1-5.