

NATASCHA WOSNICK

EURIHALINIDADE EM *Zapteryx brevirostris* (RAIA-VIOLA-DE-FOCINHO-CURTO),  
ESPÉCIE AMEAÇADA DE ELASMOBRÂNQUIO DA COSTA SUL-AMERICANA.

CURITIBA

2012

NATASCHA WOSNICK

Eurialinidade em *Zapteryx brevirostris* (raia-viola-de-focinho-curto), espécie ameaçada de elasmobrânquio da costa atlântica sul-americana.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA  
2012



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

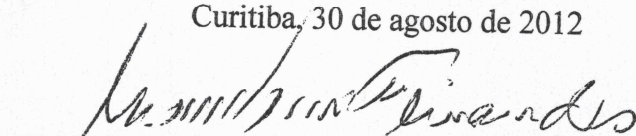


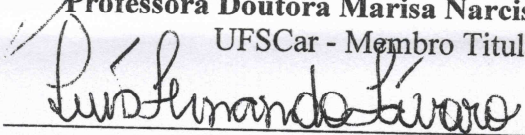
## PARECER

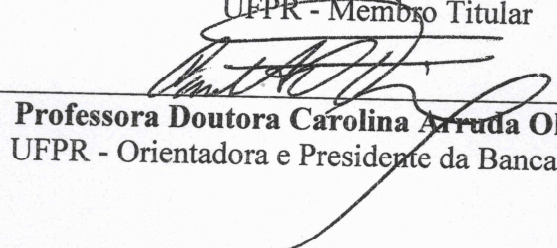
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **NATASCHA WOSNICK** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de agosto de 2012

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Marisa Narciso Fernandes**  
UFSCar - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Doutor Luís Fernando Fávaro**  
UFPR - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Carolina Arruda Oliveira Freire**  
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Para Marilene Wosnick.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda de Oliveira Freire, minha mentora e orientadora por todo o apoio, aprendizado e crescimento profissional e pessoal e por não desistir de mim.

O CNPq pelo financiamento do projeto através da bolsa de estudos durante todo o período do Mestrado.

O Departamento de Fisiologia e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade e vaga no programa.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enelise Amado e a Dr<sup>a</sup>. Luciana Souza Bastos por todos os ensinamentos e ajuda durante meu Mestrado em diversas situações.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erica Vidal por permitir o uso de espaço e tanques no seu laboratório de Biologia de Cefalópodes no CEM/UFPR em Praia de Leste.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Prodocimo, ao Dr. Hugo Bornatowski pelos ensinamentos, empréstimo de tempo e idéias, e momentos de debate.

O Sr. José, pescador que me ajudou durante todo o período de coleta ao disponibilizar os animais utilizados nos experimentos.

Meus colegas de laboratório Anieli, Giovanna, Juliane, Marcos, Silvia e Victor Hugo por todos os debates, ajuda e ensinamentos nestes três anos de trabalho no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

A minha mãe, por todo o apoio, amor e torcida.

“Não existe um caminho para a felicidade,  
a felicidade é o caminho” (Mahatma Gandhi).

## RESUMO

Elasmobrânquios são essencialmente marinhos, porém algumas poucas espécies são eurihalinas, podendo entrar em estuários. Com a diminuição na salinidade é observada redução na concentração de uréia, íons e osmolalidade plasmáticos, e redução da função da glândula retal, principal estrutura osmorregulatória em elasmobrânquios. *Zapteryx brevirostris* é uma raia que habita a costa sulamericana. Devido a relatos verbais de sua presença em estuários, sua condição de espécie nativa ameaçada, e carência de dados fisiológicos sobre esta espécie, este estudo teve como objetivo analisar a eurihalidade de *Z. brevirostris* por exposição aguda a redução de salinidade, como poderia ocorrer em ocupação transiente de estuários. Os animais foram coletados no descarte da pesca artesanal no Balneário de Shangrilá, litoral paranaense. Foi feita redução abrupta de salinidade a partir da água do mar (35‰, controle) para 25, 15 e 5‰, por 6 e 12 horas em cada salinidade. Quatro salinidades e 2 tempos geraram 8 grupos, com n de 6 animais para cada grupo, total de 48 animais. As raias foram anestesiadas com eugenol 100%, diluição 1:10 (6ml/L). Os animais foram sacrificados com secção da coluna vertebral. Foi então realizada coleta de sangue diretamente do coração, e foram retirados fragmentos dos tecidos: músculo abdominal, rim direito, brânquia e glândula retal. As concentrações plasmáticas de sódio e potássio foram determinadas por fotometria de chama, as concentrações de cloreto, magnésio e uréia foram avaliadas com colorimetria e a osmolalidade com micro-osmômetro de pressão de vapor. O teor hídrico muscular foi quantificado por desidratação (24 h a 60°C). A atividade da anidrase carbônica (AC) renal e branquial foi determinada por método de redução do pH com adição de água saturada de CO<sub>2</sub>, e a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) renal, branquial e da glândula retal por oxidação do NADH, em ensaio acoplado. Foi observada redução nos valores de sódio, potássio, magnésio, uréia e osmolalidade plasmáticos diante da redução de salinidade, essencialmente a 5‰. A atividade da AC renal diminuiu perante redução de salinidade. O tempo de exposição foi relevante, e as diferenças em geral se acentuaram após 12 horas. NKA renal aumentou e a NKA da glândula retal diminuiu com a redução de salinidade. Não houve mortalidade perante a redução de salinidade testada, e a eurihalidade e capacidade de homeostasia observadas foram semelhantes ao encontrado para outras espécies de elasmobrânquios eurihalinos. Os dados comprovaram a capacidade desta espécie de ocupar pelo menos transientemente os estuários e assim fazer parte de novas cadeias tróficas e interações ecológicas nestes ambientes costeiros. (Financiamento: CNPq)

Palavras-chave: Elasmobrânquio, Osmorregulação, Eurihalidade.

## ABSTRACT

Elasmobranchs are essentially marine. Some species of rays and sharks tolerate lower salinities and can live in estuaries, rivers and lakes. With the decrease in salinity there is a decrease in the osmolality, concentration of urea, ions, and reduction in the function of the rectal gland, the main structure of salt secretion in elasmobranchs. *Zapteryx brevirostris* is a stingray which inhabits the South American coast. Due to the verbal reports of their presence in estuaries, the condition of threatened native species, and lack of physiological data for this species, this study aimed to analyze the euryhalinity *Z. brevirostris* in the face of acute exposure to reduced salinity, as might occur in transient occupation of estuaries. The animals were collected in the disposal of fishing in the Balneário de Shangrilá, Paraná coast. The animals were exposed to abrupt reduction in salinity from the sea water (35‰ control) for 25, 15 and 5 ‰, 6 and 12 hours for each salinity. Four salinities and two exposure times resulted in 8 groups, with n of 6 animals for each group in a total of 48 animals. Stingrays were anesthetized with eugenol 100%, 1:10 dilution (6 ml / L). The animals were sacrificed by section of the spine. Blood was collected from the heart, and fragments were removed from the abdominal muscle, right kidney, gill and rectal gland. Sodium and potassium plasma concentrations were determined by flame photometry. Chloride, magnesium and urea concentrations were evaluated by colorimetric methods and osmolality by micro-vapor pressure osmometer. The muscle water content was quantified by dehydration (24 h at 60 ° C). The activity of carbonic anhydrase (CA) in the kidney and the gills was determined by the method of reduction of pH with addition of water saturated with CO<sub>2</sub>, and the activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) in the kidney, the gills and the rectal gland via oxidation of NADH in coupled assay. There was a reduction of sodium, potassium, magnesium, urea and osmolality, essentially on 5‰. The activity of renal carbonic anhydrase decreased towards reducing salinity. The exposure time was relevant, and in general the differences became more pronounced after 12 hours. The activity of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase renal activity was higher and the activity of the rectal gland was lower with the reduction of salinity. There was no mortality with the reduction of salinity tested, and the regulation and homeostasis observed were similar to that found for other species of euryhaline elasmobranchs. The data proved the ability of this species to occupy at least transiently estuaries and thus be part of new food webs and ecological interactions in estuaries and possibly rivers and lakes.

Keywords: Osmoregulation, Elasmobranch, Euryhalinity.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Clásper de elasmobrânquio macho	10
Figura 2- Osmorregulação em elasmobrânquios marinhos	12
Figura 3- Osmorregulação em elasmobrânquios em água doce	14
Figura 4- Localização da glândula retal	15
Figura 5- Corte histológico da glândula retal	15
Figura 6- Transportadores iônicos da glândula retal	16
Figura 7- Anatomia do rim de elasmobrânquios	17
Figura 8- Transportadores iônicos do rim de elasmobrânquios em ambiente marinho	18
Figura 9- Transportadores iônicos do rim de elasmobrânquios em água doce	19
Figura 10- Transportadores iônicos das brânquias	20
Figura 11- Exemplar de <i>Zapteryx brevirostris</i>	23
Figura 12- Local de obtenção dos animais	26
Figura 13- Transporte dos animais até o laboratório	27
Figura 14- Caixas de estoque	27
Figura 15- Recipientes nos quais os experimentos foram realizados	28
Figura 16- Animal em anestésico dissolvido	29
Figura 17- Corte para secção da coluna	29
Figura 18- Corte para retirada de material	30
Figura 19- Osmolalidade e uréia plasmáticas e teor hídrico muscular	34
Figura 20- Sódio e Cloreto plasmáticos	35
Figura 21- Potássio e Magnésio plasmáticos	37
Figura 22- Atividade da Anidrase Carbônica Renal e Branquial	38
Figura 23- Atividade $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase da glândula retal, rim e brânquia	39
Tabela 1- Dados de Osmolalidade plasmática em elasmobrânquios	41
Tabela 2- Dados de Uréia plasmática em elasmobrânquios	42
Tabela 3- Dados de íons plasmáticos em elasmobrânquios	45

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	10
1.1 Características gerais do grupo	10
1.2 Distribuição e características de osmorregulação em elasmobrânquios	11
1.2.1 Glândula Retal	14
1.2.2 Rins	16
1.2.3 Brânquias	19
1.3 Caracterização da espécie	22
<b>2. Objetivos</b>	24
2.1 Gerais	24
2.2 Específicos	24
<b>3. Justificativa</b>	25
<b>4. Metodologia</b>	26
4.1 Obtenção dos animais	26
4.2 Transporte dos animais	26
4.3 Aclimatação e manutenção do estoque	27
4.4 Experimentos de redução de salinidade	28
4.5 Anestesia e sacrifício dos animais	28
4.6 Dosagens plasmáticas	30
4.7 Teor hídrico muscular	31
4.8 Ensaio enzimáticos	31
4.8.1 Anidrase Carbônica	31
4.8.2 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	31
4.8.3 Proteínas Totais	32
4.9 Estatística	32
<b>5. Resultados</b>	33
<b>6. Discussão</b>	39
<b>7. Considerações finais</b>	49
<b>8. Referências</b>	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ELASMOBRÂNQUIOS

A classe dos Chondrichthyes é provavelmente a mais bem sucedida dentre todos os peixes, visto que mesmo perante a pressão de extinção em massa que ocorreu há 400 milhões de anos, é um dos poucos grupos primitivos que apresenta espécies viventes (Lund & Grogan, 2004). O grupo é classificado como monofilético (Lund & Grogan, 1997), sendo característico de todas as espécies que o compõem a presença de esqueleto cartilaginoso superficialmente mineralizado (Lund & Grogan, 1997) e em machos a presença de cláspes, com função de fecundação interna (Lund & Grogan, 1997) (Figura 1).

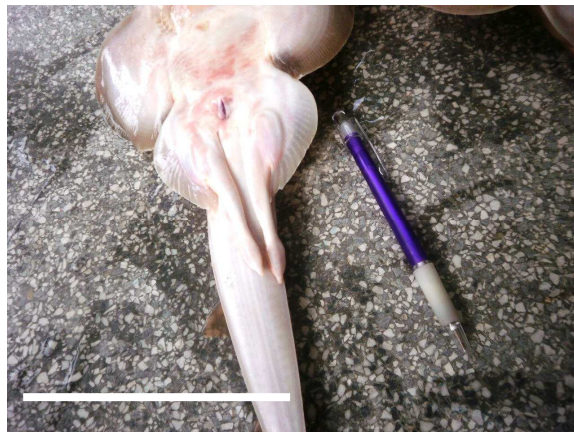


Figura 1 – Cláspes presentes em elasmobrânquios machos (barra de escala: 10,5cm).

A classe é dividida em duas diferentes subclasses, Elasmobranchii e Holocephalii, ambas representadas atualmente por espécies derivadas de ancestrais viventes no Mesozóico (Rondina, 2002). A subclasse Elasmobranchii tem como representantes as raias e os tubarões enquanto a subclasse Holocephalii é composta pelas quimeras. Os tubarões pertencem a superordem Selachimorpha, divididos em oito ordens com aproximadamente 394 espécies. As raias compõem a superordem Bathoidea e são divididas em quatro ordens, totalizando aproximadamente 525 espécies (Compagno, 1977). As quimeras pertencem a uma única ordem, Chimaeriformes, com aproximadamente 30 espécies viventes. Dentes e escamas constituem os vestígios fósseis, dada a ausência de esqueleto ósseo

nestes animais (Orvig, 1951). Outra característica peculiar dos elasmobrânquios é o seu sistema sensorial, considerado altamente eficiente e bastante desenvolvido. Não apenas a visão (Hueter & Cohen, 1991) e o olfato são extremamente eficientes, mas também a audição (Myrberg, 2001), percepção mecânica (Coombs & Montgomery, 1999) e a capacidade de detectar impulsos elétricos gerados pela contração muscular de possíveis presas, predadores e co-específicos (Tricas & New, 1998), através de eletrorreceptores subdermais denominados ampolas de Lorenzini (Lorenzini, 1678). Estes receptores ficam localizados na porção ventral do corpo em raias, tubarões e quimeras, e são sensíveis à salinidade, temperatura e pressão da água (Tricas & New, 1998).

Elasmobrânquios são classificados como predadores de topo ou mesopredadores de cadeia alimentar. Alimentam-se de um vasto número de espécies de crustáceos, moluscos, peixes e mamíferos, além de plâncton e zooplâncton (Motta & Wilga, 2001). Raias e tubarões apresentam grande importância nas teias alimentares marinhas. Desequilíbrios que levam a redução ou aumento na abundância destes animais podem gerar problemas de grande escala em ambientes aquáticos que são habitados por este grupo. Por exemplo, o desaparecimento das lagostas na Tailândia causado pelo aumento da população de lulas, e este aumento nas lulas conseqüente da redução drástica da população de tubarões.

## 1.2 DISTRIBUIÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE OSMORREGULAÇÃO DOS ELASMOBRÂNQUIOS

Elasmobrânquios são animais primariamente marinhos, mas algumas espécies possuem o hábito e a capacidade de entrar em estuários e chegar até a água doce a partir do mar, ou de pelo menos tolerar certa redução de salinidade de forma experimental. Em caso excepcional no grupo como um todo, encontram-se as raias da família Potamotrygonidae, da América do Sul, que são exclusivamente dulcícolas. Cerca de 95% das espécies de elasmobrânquios são exclusivamente marinhas. Apenas 5% das espécies possuem adaptações fisiológicas para adentrar em ambientes mais diluídos (Helfman *et al.*, 1997), e menos de 1/10 dessas espécies apresentam adaptações para viver exclusivamente em ambientes

dulcícolas (Martin, 2005). Evolutivamente os elasmobrânquios apresentam três estágios de colonização para ambientes mais diluídos (Ballantyne & Robinson, 2010): 1) As espécies marinhas que entram ocasionalmente em água doce, 2) espécies que vivem em água doce e toleram aumento de salinidade, e 3) espécies que vivem exclusivamente em água doce, perdendo a tolerância ao aumento de salinidade. A função osmorregulatória em elasmobrânquios é realizada pela glândula retal, pelos rins, pelas brânquias, e recentemente tem sido também avaliada a participação do trato gastro-intestinal (Janech et al. 2006; Anderson et al., 2007; Hazon et al., 2007; Pillans et al., 2008; Hazon, 2009; Ballantyne & Robinson, 2010).

Os elasmobrânquios mantêm sua homeostasia interna em ambiente marinho com comportamento dito “*ureo-osmorregulador*”: a síntese de uréia é realizada pelo fígado e este composto é acumulado nos fluidos através da baixa permeabilidade das brânquias e reabsorção ativa dos rins (Boylan, 1963), de forma a alcançarem concentração osmótica ligeiramente superior à água-do-mar (hiperosmóticos), assegurando desta forma entrada osmótica de água. A água em excesso é filtrada pelos glomérulos renais e convertida em significativo volume urinário, este isosmótico em relação ao líquido extracelular. O sistema de contra-corrente renal assegura a manutenção interna das altas concentrações de uréia, enquanto a característica glândula retal e secundariamente as brânquias secretam o excesso de NaCl que entra por difusão passiva (Hazon et al., 2007; Ballantyne & Robinson, 2010) (Figura 2).

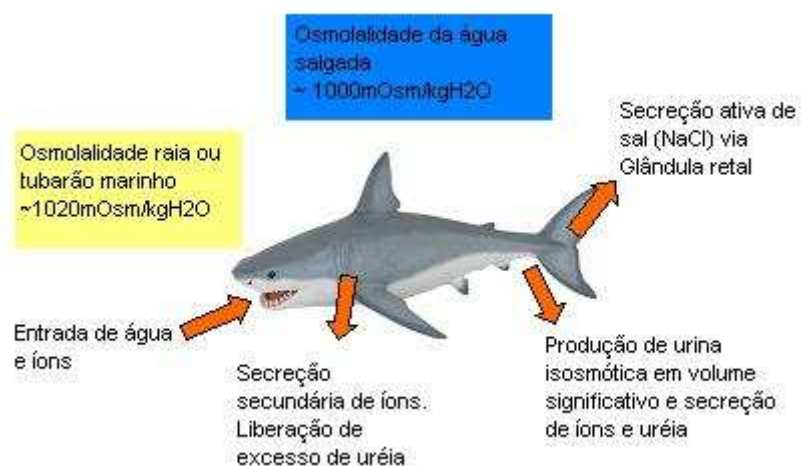


Figura 2 – Ilustração do esquema de osmorregulação em elasmobrânquios marinhos. Ocorre Influxo de água e íons. A água em excesso é excretada pelos rins na forma de urina diluída. O excesso de

íons é secretado pela glândula retal, com papel secundário das brânquias. Parte da uréia produzida pelo fígado também é secretada via branquial.

Em elasmobrânquios marinhos a alta osmolalidade é mantida também pela alta concentração de TMAO (Cohen *et al.*, 1958), molécula orgânica responsável por neutralizar os efeitos deletérios da uréia, como alterações nas funções enzimáticas e desestruturação de membranas (Cohen *et. al.*, 1958; Yancey & Somero, 1979). Em raias e tubarões a importância do NaCl é menor quando comparada aos teleósteos, sendo este hiporregulado. A diminuição da importância ocorre devido à presença dos osmólitos orgânicos (uréia e TMAO) e sua importância na manutenção da osmolalidade do líquido extracelular.

Quando elasmobrânquios entram em ambientes mais diluídos, observa-se redução na uréia e TMAO plasmáticos, redução na função da glândula retal, e redução do NaCl extracelular (Anderson *et al.*, 2007; Pillans *et al.*, 2008; Ballantyne & Robinson, 2010; Dowd *et al.*, 2010). O acúmulo de uréia é tão importante para a estratégia osmorregulatória deste grupo predominantemente marinho, que a manutenção de valores basais (< 1mM) deste osmólito pode ser considerada o fator evolutivo determinante para o sucesso da colonização do ambiente de água doce, além da capacidade de sobrevivência de espermatozóides e formas jovens em salinidades mais baixas (Ballantyne & Robinson, 2010). O influxo de água e efluxo de íons e da uréia em excesso também são observados, sendo necessária a reabsorção de íons de forma ativa pelas brânquias e rins. A urina produzida é bastante diluída de forma a secretar o excesso de água que entra no corpo do animal (Figura 3).

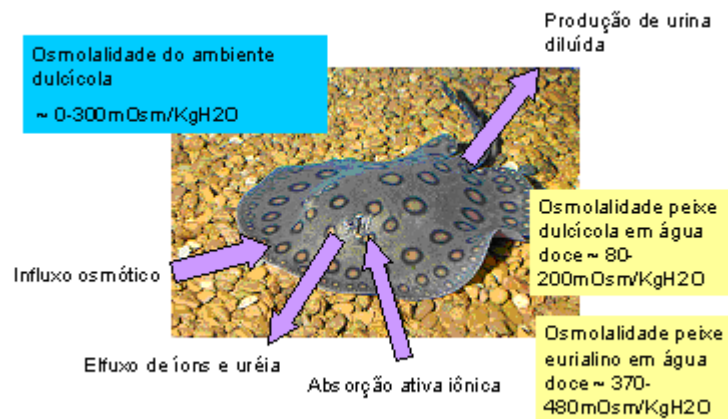


Figura 3 – Desenho ilustrativo representando o esquema geral de osmorregulação em elasmobrânquios que ocupam ambientes diluídos. Ocorre influxo de água e efluxo de íons e uréia. A água em excesso é excretada pelos rins na forma de urina bastante diluída. As brânquias tornam-se importantes na captação iônica, além do equilíbrio ácido-base.

### 1.2.1 Glândula Retal

A glândula retal é característica de elasmobrânquios, sendo essencial para a regulação iônica, dada sua função secretora de NaCl. Localizada em anexo ao fim do intestino nestes animais, a glândula pode ser facilmente localizada (Figura 4). A estrutura apresenta grande importância em ambiente marinho devido à necessidade de secretar íons, porém sua importância diminui em ambientes com baixa concentração iônica devido à necessidade em reabsorver íons e não secretá-los. (Ballantyne & Robinson, 2010). Elasmobrânquios de água doce apresentam redução no tamanho e na funcionalidade desta estrutura (Oguri, 1964; Piermarini & Evans 1988).

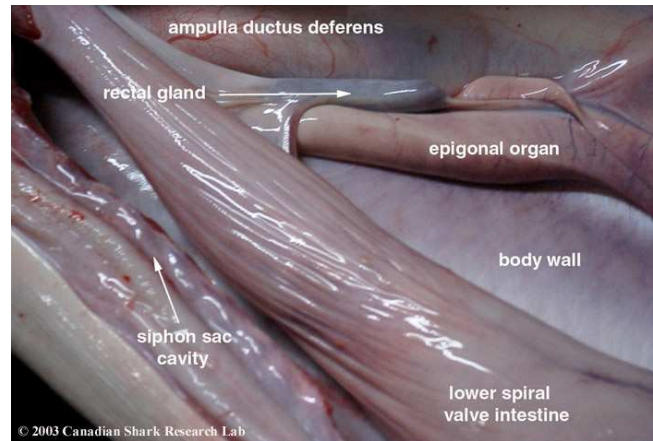


Figura 4 – Localização da glândula retal (rectal gland) em elasmobrânquios. A glândula encontra-se ligada a porção final do intestino em raias e tubarões. (Figura retirada de <http://www.marinebiodiversity.ca>– Canadian Shark Research Lab).

Anatomicamente a glândula é rodeada por uma cápsula composta por tecido conjuntivo repleto de pequenos vasos sanguíneos e fibras nervosas em sua face externa. Internamente a cápsula apresenta uma fina camada de tecido muscular (Piermarini & Evans, 2001). No interior da glândula são observados milhares de túbulos secretores que levam a um lúmen central, este ligado ao trato digestivo, onde ocorre a eliminação do fluido. Os túbulos secretores são compostos por um epitélio constituído por células de cloreto dispostas em circunferência (Ernst et. al., 1981), estas com extensas invaginações na membrana basolateral de forma a aumentar a área da superfície e maximizar a inserção bem como a atividade de proteínas de transporte iônico (Ernst et. al, 1981) (Figura 5).

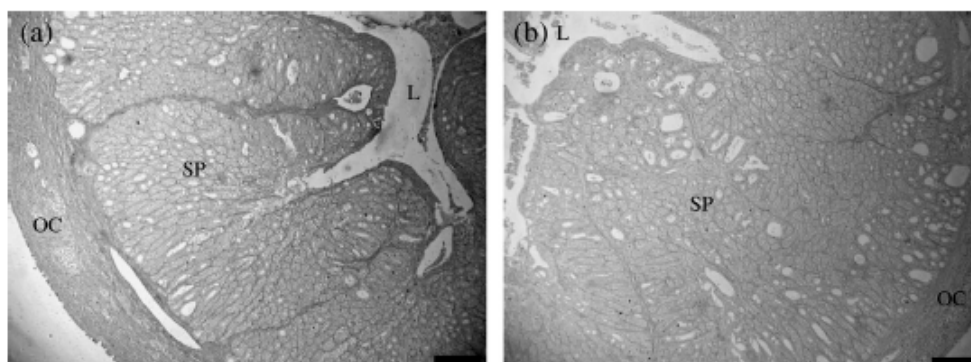


Figura 5 – Corte histológico da glândula retal de *Carcharhinus leucas* (tubarão cabeça-chata), aclimatado em água doce (a) e em água salgada (b). (L) representa o lúmen da glândula retal, onde o NaCl a ser secretado é armazenado, (SP) é o parênquima secretor, onde estão localizados os túbulos secretores responsável por secretar o NaCl no lúmen e (OC) representa a cápsula que envolve a glândula retal. (Figura retirada de Pillans et. al., 2008).



A glândula retal secreta no seu lúmen, fluido contendo NaCl isomótico ao plasma, que é transportado pelo reto para eliminação, com participação fundamental da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA) e do co-transportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (NKCC - isoforma secretora) (Pillans et al., 2008). O mecanismo de secreção de sal pela glândula retal se dá pela ativação do NKCC basolateral que transporta  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para dentro das células da glândula retal movido pelo gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  criado anteriormente pela NKA basolateral, que transporta  $\text{Na}^+$  para o líquido extracelular (LEC). O potássio também é transportado novamente para o LEC via canal basolateral de  $\text{K}^+$ . O  $\text{Cl}^-$  é secretado para o lúmen via canal de cloreto (CFTR) localizado na membrana apical das células do epitélio da glândula. O gradiente eletroquímico negativo gerado pelo excesso de  $\text{Cl}^-$  no lúmen juntamente com o gradiente positivo criado pelo excesso de  $\text{K}^+$  no LEC, facilita a passagem de  $\text{Na}^+$  via paracelular para o lúmen da glândula, formando NaCl para ser excretado (Figura 6).

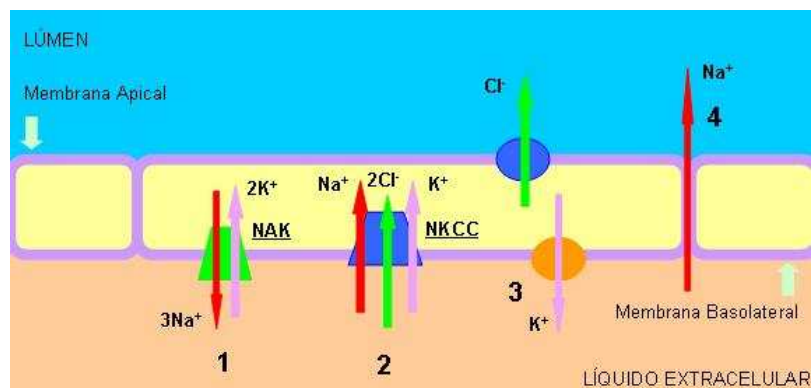


Figura 6 - Inserção e funcionamento dos transportadores iônicos nas células epiteliais da Glândula Retal em elasmobrânquios. (1) – A bomba  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ , ATPase (NKA) transporta  $2\text{K}^+$  para dentro da célula e  $3\text{Na}^+$  para o líquido extracelular (LEC). (2) O  $\text{Na}^+$  presente no LEC ativa o co-transportador  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  (NKCC), que transporta um  $\text{Na}^+$ , um  $\text{K}^+$  e dois  $\text{Cl}^-$  para o interior celular. (3) Canais de cloreto (CFTR) da membrana apical na célula epitelial transportam o  $\text{Cl}^-$  para o lúmen, e o  $\text{K}^+$  transportado também pelo NKCC para dentro da célula é transportado novamente para o LEC via canais de  $\text{K}^+$ . (4) o lado basolateral fica mais positivo pela saída do  $\text{K}^+$ , e junto com a negatividade do lado apical pela saída do  $\text{Cl}^-$  geram gradiente elétrico que favorece o transporte de  $\text{Na}^+$  via paracelular, formando assim o NaCl que será excretado pela glândula retal. (Figura modificada de [www.d.umn.edu](http://www.d.umn.edu)). Lúmen (azul), Líquido Extracelular – LEC (Laranja).

### 1.2.2 Rins

Os rins dos elasmobrânquios são bastante complexos quando comparados a outros vertebrados (teleósteos, répteis, aves e mamíferos) (Evans *et al.*, 2005), sendo constituído por um glomérulo, uma porção tubular ciliada, primeiro e segundo

segmentos do túbulo proximal, porções anterior e posterior do túbulo distal e um ducto coletor (Figura 7) (Althoff *et al.*, 2005).

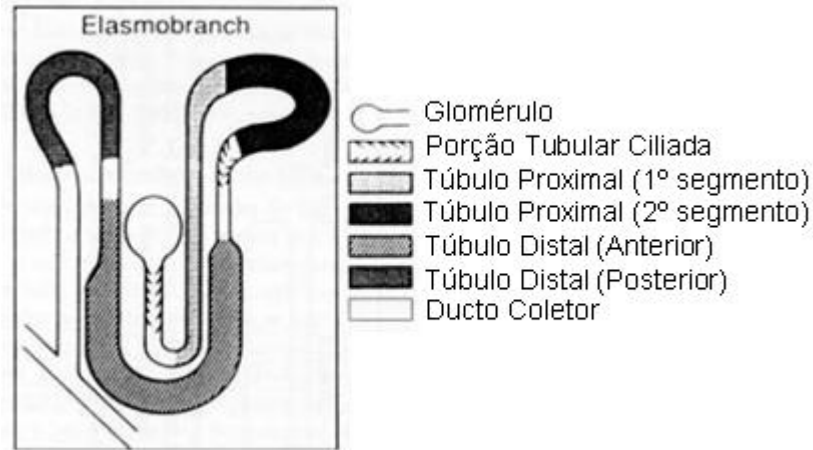


Figura 7 – Ilustração da anatomia dos rins de elasmobrânquios (Figura: retirada de Althoff *et al.*, 2005).

Em animais marinhos, os rins têm como principal função a reabsorção de uréia e TMAO e produção de significativo volume urinário (Ballantyne & Robinson, 2010). A reabsorção é importante para espécies de elasmobrânquios marinhos e raias e tubarões eurihalinos que precisam manter o significativo nível destas moléculas (Chew *et al.*, 2006). Os néfrons dos elasmobrânquios são os mais complexos dentre todos os vertebrados e tal especialização parece estar relacionada com a necessidade e capacidade desta estrutura em reabsorver de 70-99% de toda a uréia filtrada (Boylan, 1963), via sistema contra-corrente na segunda porção do túbulo proximal. A reabsorção é bastante específica, visto que análogos da uréia são reabsorvidos em bem menor quantidade, cerca de 35% (Boylan, 1963). Estudos apontam a presença de mecanismos de captação ativa de uréia acoplada à secreção de  $\text{Na}^+$  (Stolte *e. al.*, 1977). Recentemente descobriu-se que a reabsorção de uréia é feita também com o auxílio de transportadores de uréia (“UTs”) presentes nos néfrons, estes análogos aos transportadores encontrados nos rins de mamíferos (Smith & Wright, 1999).

Em animais marinhos ou eurihalinos em água salgada, é observada a produção de volume urinário relativamente alto, ao menos comparado aos teleósteos em mesma condição. A necessidade de produção de urina em volume relativamente alto ocorre devido à característica hiperosmótica do líquido

extracelular dos elasmobrânquios (Anderson *et al.*, 2007). Ocorre também secreção ativa de íons mono e divalentes. O processo de secreção nos rins de animais marinhos ocorre de forma semelhante ao observado nas células secretoras da glândula retal (Evans *et al.*, 2005; Ballantyne & Robinson, 2010). A secreção renal de sal se dá pela atividade das NKA localizadas na membrana basolateral das células de cloreto, responsáveis por criar um gradiente de  $\text{Na}^+$  (1), este que irá ativar os co-transportadores NKCC (2). Com a atividade do NKCC, o  $\text{Cl}^-$  é transportado para o lúmen via canais de cloreto (3) e o  $\text{K}^+$  transportado para o LEC via canais de potássio, os gradientes criados pelo  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  facilitam o transporte paracelular de  $\text{Na}^+$  (4) (Figura 8).

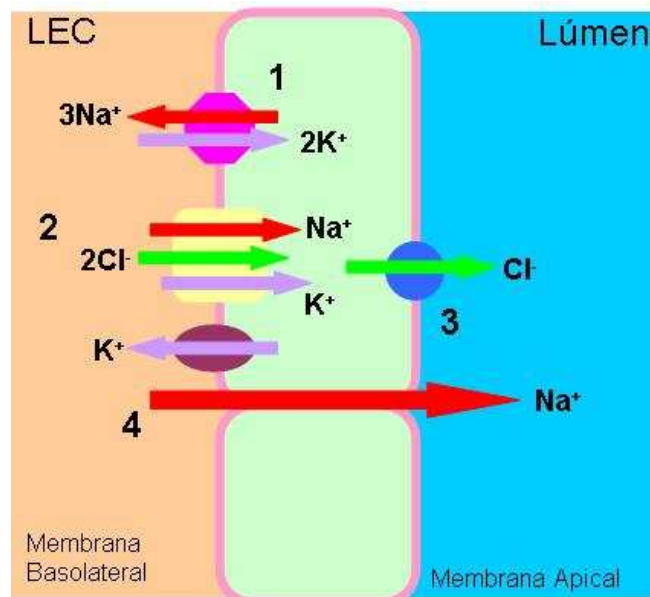


Figura 8 – Inserção e função dos transportadores iônicos renais em elasmobrânquios marinhos (secreção iônica). Lúmen (azul), Líquido Extracelular – LEC (laranja). (1) ativação da NKA basolateral, com transporte de íons  $\text{Na}^+$  para o LEC e íons potássio para o epitélio das células renais. (2) Ativação do co-transportador NKCC, com transporte dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para o epitélio das células de cloreto renais. (3) Ativação dos canais de cloreto (apicais) e potássio (basolaterais), com transporte de  $\text{Cl}^-$  para o lúmen renal e de  $\text{K}^+$  para o LEC. (4) os gradientes iônicos gerados pela concentração de  $\text{K}^+$  no LEC e  $\text{Cl}^-$  no lúmen estimulam o transporte paracelular de  $\text{Na}^+$ , com formação de  $\text{NaCl}$  no lúmen renal, para secreção.

Os rins das espécies de água doce ou espécies eurihalinas em ambiente muito diluído realizam intensa filtração. A principal função renal é agora a secreção de água e excretas e reabsorção de íons. Estes animais apresentam volume urinário elevado, podendo ser 10 vezes maior que o volume produzido por teleósteos na

mesma condição (Anderson et al., 2007). A absorção ativa de íons mono e divalentes tornam-se necessária devido à perda de osmólitos para o meio. Em animais eurihalinos a reabsorção de uréia ainda é necessária, porém em raias exclusivamente dulcícolas, tal composto passa a ser secretado de forma a manter os valores basais característicos ( $< 1\text{mM}$ ) (Ballantyne & Robinson, 2010). O processo de reabsorção iônica pelos rins se dá a partir da ativação de co-transportadores NKCC (isoforma absorptiva) localizados na região apical das células de cloreto. A ativação permite a captação dos íons  $\text{Cl}^-$  do meio. O gradiente negativo criado pelo  $\text{Cl}^-$  no lúmen ativa canais de cloreto na membrana basolateral responsáveis pela reabsorção de  $\text{Cl}^-$ . O gradiente também irá ativar a reabsorção de  $\text{Na}^+$  via paracelular (Figura 9).

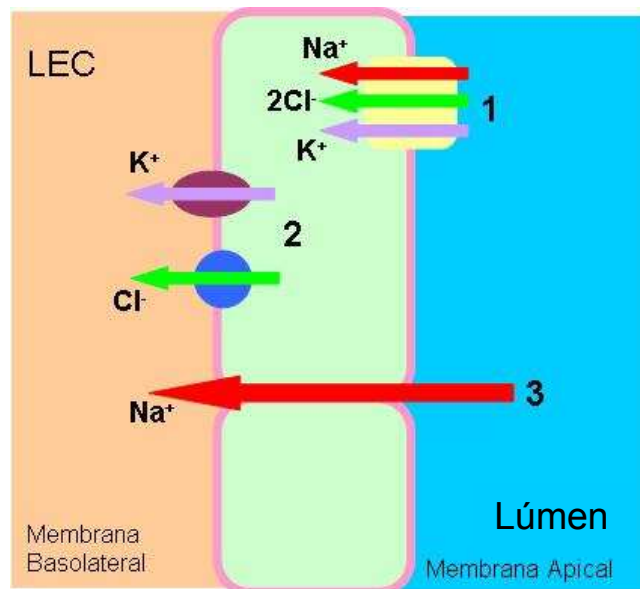


Figura 9 – Inserção e funcionamento de transportadores iônicos no rim de elasmobrânquios de água doce ou eurihalinos em ambientes diluídos (Reabsorção iônica). Lúmen (azul), Líquido Extracelular – LEC (laranja). (1) Ativação do co-transportador NKCC na membrana apical de células de cloreto renais, com transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  para o epitélio celular. (2) A alta concentração dos íons no epitélio estimula a ativação dos canais de cloreto e potássio na membrana basolateral, responsáveis pelo transporte de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  para o LEC. (3) O gradiente gerado pelo  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ , levam ao estímulo do transporte paracelular do  $\text{Na}^+$ .

### 1.2.3 Brânquias

As brânquias de elasmobrânquios marinhos e a função de secreção iônica apresentam importância osmorregulatória secundária, sendo mais importantes nos processos para o equilíbrio ácido-base (Shuttleworth, 1988) tanto em ambiente

marinho quanto em ambientes diluídos. Porém quando ocorre a diminuição ou extinção da função de excreção pela glândula retal, as brânquias tendem a assumir o papel secretor (Evans *et. al.*, 2005).

Elasmobrânquios possuem dois tipos de células de cloreto nas suas brânquias. O primeiro tipo possui  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na membrana basolateral e um trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical; o segundo tipo possui  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar basolateral e um trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  apical (Piermarini & Evans, 2001) (Figura 10).

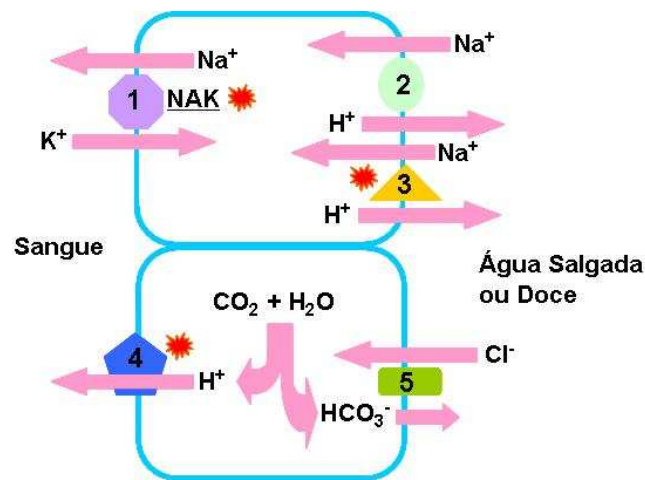


Figura 10 – Esquema de transportadores localizado nas células epiteliais das brânquias, com função principal de equilíbrio ácido-base. As proteínas transportadoras com função de equilíbrio agem de maneira secundária na secreção de pequena quantidade de íons em água salgada e absorção em água diluída. (Figura adaptada de Evans *et al.*, 2005).

O mecanismo de regulação ácido-base está ligado diretamente à regulação iônica, pois a absorção de  $\text{Cl}^-$  pode estar acoplada à liberação de  $\text{HCO}_3^-$  via trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , e a absorção de  $\text{Na}^+$  pode estar acoplada à liberação de  $\text{H}^+$  pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Evans, 1984). As brânquias estão também relacionadas com a entrada e saída de água, devido ao fluxo constante deste solvente por este epitélio. Por fim, as brânquias são importantes sítios de retenção de uréia, devido a sua impermeabilidade a esta molécula (Evans *et. al.*, 2005). A presença de colesterol na membrana basolateral das células das brânquias parece estar relacionada a esta impermeabilidade (Fines *et. al.*, 2001), bem como a presença de um transportador de uréia dependente de  $\text{Na}^+$  na membrana basolateral que evita a saída deste composto nitrogenado e o leva novamente à circulação do animal (Fines *et. al.*,

2001). A temperatura parece estar envolvida, já que acima de 15°C, a permeabilidade parece diminuir ainda mais (Boylan *et. al.*, 1967).

Em animais de água doce as brânquias apresentam maior importância na osmorregulação, com participação na absorção de íons (Ballantyne & Robinson, 2010). A importância das brânquias na regulação ácido-base e na respiração e ventilação é também maior em animais de água doce, devido ao pH mais baixo da água doce em relação à água do mar, e também maior chance de hipóxia em água doce do que em água do mar.

Enfim, está bem demonstrado na literatura que a secreção de sal em raias e tubarões marinhos é dependente do funcionamento da glândula retal. Tal importância diminui em água doce, devido à necessidade em reabsorver e não mais secretar íons, porém sua importância é mantida em animais eurihalinos. Os rins por sua vez, são importantes tanto em ambiente marinho quanto em ambientes diluídos, visto que elasmobrânquios geralmente são hiperosmóticos em relação ao meio, sendo necessária produção de grande volume urinário especialmente em ambientes diluídos. A importância dos rins é observada também na manutenção das concentrações de uréia e TMAO, além de sua crescente importância em ambientes diluídos, dada a necessidade de reabsorção de íons mono e divalentes. As brânquias em raias e tubarões parecem ter importância secundária em processos de secreção iônica quando comparados aos teleósteos, porém sua importância em ambientes mais diluídos torna-se bastante significativa, não apenas em processos de regulação ácido-base, mas também na captação de íons em ambientes onde estes se encontram em baixa concentração. Como citado anteriormente, o trato gastro-intestinal parece desenvolver um importante papel nos processos osmorregulatórios, estando ligado à reabsorção iônica e de uréia, além de reabsorção de água quando o animal se encontra em desafio hiposmótico.

A literatura disponível sobre a osmorregulação em elasmobrânquios é muito menos numerosa do que a literatura disponível sobre teleósteos. Obviamente parte da explicação está na muito maior diversidade de espécies de peixes ósseos, e diversidade de ambientes ocupados pelos mesmos, especialmente em água doce. Contudo, mesmo considerando esta discrepância em diversidade, o número de espécies de peixes cartilaginosos estudados ainda é muito baixo, e os dados bastante recentes, a respeito de poucas espécies (e.g., Anderson *et al.*, 2007;

Pillans *et al.*, 2008). Em termos de espécies brasileiras, o maior interesse fisiológico tem sido sobre espécies de raias de água doce (eg, Duncan *et al.*, 2009; Duncan, & Fernandes, 2010; Duncan *et al.*, 2010; Duncan & Fernandes, 2011), e o estudo de raias e tubarões eurihalinos, é muito escasso (e.g., Holmes & Donaldson, 1969; Cain *et al.*, 2004; Treberg *et al.*, 2006; Pillans & Franklin, 2004; Piermarini & Evans, 1998).

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

Raias são representantes dos elasmobrânquios com características bastante peculiares. Apresentam corpo achatado dorso-ventralmente, nadadeiras pélvicas modificadas em forma de disco, cinco pares de fendas branquiais na porção ventral do corpo juntamente com a boca. Compõem a superordem Bathoidea, sendo divididas em quatro ordens: Rajiformes, as ditas verdadeiras raias, Myliobatiformes, composta pelas jamantas, Pristiformes, ordem representada pelas raias-de-serra e Torpediniformes, composta pelas raias elétricas, totalizando 525 espécies. A ordem Rajiformes abriga a família Rhinobatidae, esta composta por sete gêneros, *Aptychotrema*, *Platyrrhina*, *Platyrrhinoidis*, *Rhinobatos*, *Trigonorrhina*, *Zanobattus* e *Zapteryx* (Nelson, 1994). Dentre estes sete gêneros, apenas *Rhinobatos* e *Zapteryx* são encontrados no litoral brasileiro. O gênero *Zapteryx* é composto por três espécies, *Zapteryx xyster*, *Z. exasperata* e *Z. brevirostris*.

*Zapteryx brevirostris* é popularmente conhecida como “raia-viola-de-focinho-curto” e pode alcançar 66,0 cm de comprimento e 1,9 kg em fase adulta. Apresenta focinho obtuso, coloração que varia do verde-oliva ao marrom (Fishbase, 2011), cauda e dorso com coloração mais escura que o resto do corpo, margens da nadadeira peitoral e barbatanas da cauda com coloração pálida e ventre de coloração bege, cinza ou amarela (Fishbase, 2011) (Figura 11).

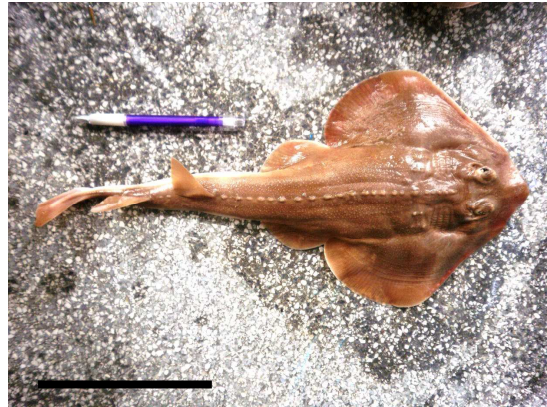


Figura 11 – Exemplar de *Zapteryx brevirostris* (barra de escala: 10,5 cm).

As raias são vivíparas aplacentárias dependentes de vitelo (Batista, 1987), com claro dimorfismo sexual e nascimento de em média seis filhotes por ciclo reprodutivo (Gonzalez, 2004), podendo variar de 4 a 11 filhotes. Cada ciclo reprodutivo dura em média 12 meses (Gonzalez, 2004). Habitam águas costeiras, podendo ser encontrados em até 60m de profundidade (Figueiredo, 1977). São animais classificados como marinhos (Fishbase, 2011), porém existem relatos de sua ocorrência em estuários (Bornatowski, 2010 – comunicação pessoal). Sua distribuição se dá por toda a costa atlântica sul-americana, desde a região de Fernando de Noronha até Mar del Plata, Argentina (Castello, 1971). Raias desta espécie são carnívoras e sua dieta é composta predominantemente por crustáceos, anelídeos poliquetos e ocasionalmente pequenos peixes, cefalópodes e sipunculídeos (Marion, 2009). É observada dieta similar entre machos e fêmeas, porém o conteúdo da dieta muda quando se comparam exemplares juvenis, que se alimentam de poliquetos, com adultos, que apresentam preferência por camarões e anfípodes (Marion *et al.*, 2011). É sugerido que estes animais tendem a permanecer em ambientes com menor transparência e maior presença de sedimento, já que estes ambientes permitem maior proteção e maior disponibilidade de nutrientes (Santos *et al.*, 2006). Acredita-se que o período reprodutivo nesta espécie ocorra entre agosto e novembro, com pico reprodutivo em setembro e outubro (Gonzalez, 2004). Raias-viola tendem a viver em grupos, de aproximadamente um macho para cada dezessete fêmeas (Santos *et al.*, 2006). Os grupos parecem ser formados e mantidos durante todo o período de reprodução. É observada também presença quase absoluta de indivíduos adultos, sugerindo desta forma a permanência de filhotes e juvenis em outras áreas. A segregação por sexo bem como por idade é



clara nesta espécie. Tal estratégia é de grande importância e é vista como organização social desenvolvida (Springer, 1967), já que a partir da segregação a competição de fêmeas juvenis com fêmeas maduras diminui, aumentando as chances de sobrevivência das fêmeas jovens e perpetuação da espécie. Tal organização é de grande importância em estrategistas K como as raias, caracterizados pelo desenvolvimento lento, poucas limitações de recursos, reprodução tardia, baixa fecundidade, corpo grande e ciclo de vida longo.

Visto que a reprodução, bem como o nascimento dos filhotes se dá em ambiente marinho (Santos et. al., 2006; Gonzalez, 2004; Martins-Ingletto & Schwingel, 2011) é importante determinar a suposta tolerância a menores salinidades de forma a inferir quais as possíveis interações ecológicas, diferentes das citadas acima, que podem estar ocorrendo em ambientes de menor salinidade. No litoral do Paraná, *Z. brevirostris* não apresenta importância comercial. No entanto, a espécie é bastante afetada por fazer parte do descarte produzido pela atividade de pesca com arrasto de camarão (Batista, 1987).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

- Analisar o grau de tolerância de adultos desta espécie a redução de salinidade.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Determinar a osmolalidade e concentração de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) e uréia do plasma, e o teor de hidratação muscular.
- Determinar as atividades específicas das enzimas Anidrase Carbônica nos rins e brânquias, e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  na glândula retal, rins e brânquias da raia-viola-do-focinho-curto.

### 3. JUSTIFICATIVA

A espécie estudada é classificada como marinha, porém sabe-se por relatos de pescadores e pesquisadores (Bornatowski, 2010 – comunicação pessoal) que freqüentemente a raia-viola-de-focinho-curto pode ser encontrada no complexo estuarino de Paranaguá (PR), ambiente que apresenta constante variação de salinidade. Contudo, os relatos são apenas verbais, e não há literatura relatando a sua presença em estuários. Os motivos mais comuns para teleósteos ou invertebrados ocuparem estuários geralmente se relacionam com hábitos reprodutivos ou alimentares. Quando se fala em elasmobrânquios, devido à dificuldade em estudar este grupo, o entendimento torna-se difícil, porém defende-se que tal transição esteja provavelmente ligada aos mesmos motivos apresentados por outros animais aquáticos, como reprodução e alimentação. O relato de nascimento em cativeiro da espécie mostra que os filhotes são adaptados a salinidades altas (33-35‰), dificultando o entendimento relacionado a processos reprodutivos e papel de berçário destes ambientes (Gonzalez, 2004). A espécie em questão faz parte do descarte de pesca de arrasto e emalhe de camarão. Nos períodos de reprodução e conseqüente agregação destes animais, são relatados descartes com centenas de exemplares (Sr José, pescador do Balneário de Shangrilá, PR – comunicação pessoal, 2011). Segundo a lista da IUCN, a raia-viola encontra-se com status de “vulnerável” na lista de animais ameaçados, sendo assim necessária a implantação de medidas imediatas de preservação. Para isso torna-se necessário aumentar o conhecimento da espécie, locais de reprodução, rotas migratórias e locais de nascimento e permanência dos filhotes.

Nada se sabe a respeito da tolerância fisiológica deste animal, mas têm-se relatos de sua ocorrência em ambientes mais diluídos. Neste trabalho submetemos exemplares coletados vivos em meio ao descarte a protocolo de redução de salinidade em diferentes tempos. O objetivo foi relatar não apenas a sobrevivência, mas também a capacidade de regulação da homeostasia apresentada por estes animais. Tais resultados serão importantes para iniciar uma discussão a respeito não apenas da distribuição da espécie, mas também de seus hábitos migratórios, possíveis locais de forrageio e reprodução, além de fatores evolutivos possivelmente relacionados ao grupo de forma geral e sua possível ancestralidade em ambientes diluídos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção dos animais

As raias utilizadas nos experimentos foram coletadas com redes de espera no Balneário de Shangrilá – Ponta do Paraná. As coletas foram realizadas nos meses de Maio, Junho e Julho de 2011, sendo obtidos, respectivamente, doze, doze e vinte e quatro indivíduos de ambos os sexos, totalizando 48 animais, 23 machos e 25 fêmeas. Os animais selecionados para o experimentos foram indivíduos adultos e em boas condições físicas, não sendo utilizados animais com ferimentos ou pouco reflexo.



Figura 12 – Mercado de peixe em Shangrilá – Local onde as raias foram coletadas junto ao descarte (Litoral do Paraná). Foto: Wanessa do Carmo.

### 4.2 Transporte dos animais

Após a coleta, os animais foram transferidos para recipientes de 50 litros, contendo água do local da coleta e aeradores à pilha, de forma a evitar morte por hipóxia (Figura 13). Posteriormente, os exemplares foram transportados ao Laboratório de Biologia de Cefalópodes para aclimação, localizado no Centro de Estudos do Mar (CEM/UFPR) em Praia de Leste.



Figura 13 – Animais em caixa de transporte (barra de escala: 30 cm).

### 4.3 Aclimação e manutenção do estoque

Chegando ao laboratório, os animais foram transferidos para caixas d'água de 500 litros, onde a aclimação no período de um dia foi realizada. Duas caixas d'água foram utilizadas, tendo sido previamente preparadas para receber os animais (Figura 14) e estas caixas foram mantidas cheias até o fim dos experimentos. A manutenção das condições da água utilizada foi realizada pela utilização de filtros externos, além do monitoramento constante de salinidade (35‰) e temperatura (20°C) da água. Coleta de sedimento (areia) também foi realizada de forma a manter as condições do estoque mais próximas possíveis das condições encontradas no ambiente natural dos animais. Cada caixa recebeu seis animais por etapa de experimento, de forma a manter a situação de agregação apresentada pela espécie no período reprodutivo (jun/ago), porém sem tornar o ambiente super povoado, situação que pode levar à agressividade.



Figura 14 – Caixa d'água onde os animais foram armazenados e aclimatados.

#### 4.4 Experimentos de redução de salinidade

De forma a avaliar a capacidade da espécie em tolerar diferentes salinidades, o protocolo de redução foi baseado em condições e variações observadas em diferentes setores de ambiente estuarino. Foram testadas as salinidades de 35‰ (controle), 25, 15 e 5‰, por 6 e 12 horas. Os animais foram retirados do tanque de aclimatação e transferidos para recipientes com capacidade de 50 litros, contendo ~30 litros de água controle ou experimental. Cada recipiente recebeu um único animal, o qual foi mantido durante o período experimental (6 ou 12 horas) com aeração constante. Sendo 4 salinidades e 2 tempos de exposição, houve 8 grupos experimentais, com um n de 6 animais para cada grupo, totalizando 48 animais amostrados (Figura 15).

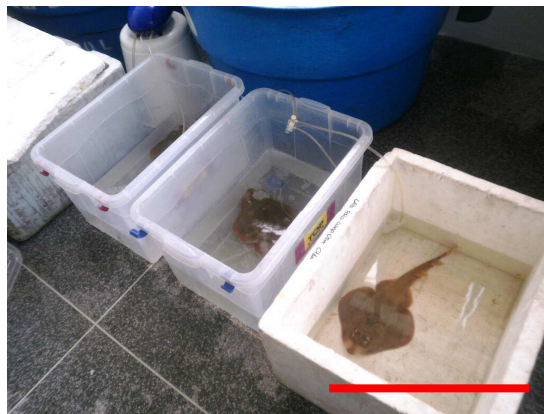


Figura 15 – Recipientes nos quais os experimentos de redução de salinidade foram realizados (barra de escala: 50 cm).

#### 4.5 Anestesia e sacrifício dos animais

Após o tempo de experimentação, os animais foram anestesiados com eugenol (óleo de cravo) 100% em diluição 1:10 em álcool 90% de forma a torná-lo solúvel em água, segundo protocolo proposto por Neiffer & Stamper (2009). O eugenol foi testado como alternativa de menor custo ao anestésico comumente utilizado para elasmobrânquios, o MS-222. A benzocaína foi rapidamente descartada por ser pouco eficiente em raias e tubarões. Após consulta de bibliografia, uma concentração de 6 ml da solução diluída para cada litro de água do

mar foi estabelecida (Neiffer & Stamper, 2009). Parâmetros como mobilidade, resposta ao estímulo na cauda e movimentação dos espiráculos foram observados para definir o estado de anestesia nas raias (Figura 16).



Figura 16 - Animal em caixa plástica com eugenol dissolvido em água do experimento para anestesia (barra de escala: 15 cm).

Após verificação do estado de anestesia dos animais, um corte com bisturi foi feito entre os espiráculos e uma tesoura cirúrgica foi inserida para secção da coluna vertebral da forma mais rápida possível (Figura 17). Após sacrifício, os animais foram medidos com fita métrica da ponta do focinho até o fim da cauda (~ 52,8 cm) e de uma ponta da nadadeira a outra (largura do disco ~ 20,3 cm ) e pesados (balança analítica – limite de 3kg) (~ 640 g).



Figura 17– Corte feito entre os espiráculos para facilitar a secção da coluna no sacrifício dos animais (barra de escala: 5 cm).

Com o animal morto um corte circular foi feito na parede de seu abdômen para retirada de sangue diretamente do coração seguida de retirada de fragmento de músculo abdominal, fragmento superior do rim direito, bem como a glândula retal e o terceiro arco branquial direito (Figura 18). O sangue retirado foi rapidamente centrifugado, o plasma foi separado e congelado em freezer - 20°C. As amostras de músculo, rim, brânquia e glândula retal foram rapidamente colocadas em tubos criogênicos e congeladas em nitrogênio líquido, para transporte até Curitiba (~2 horas). Posteriormente, as amostras de plasma foram colocadas em freezer (- 20°C), e as de tecido em ultra-freezer (- 80°C).

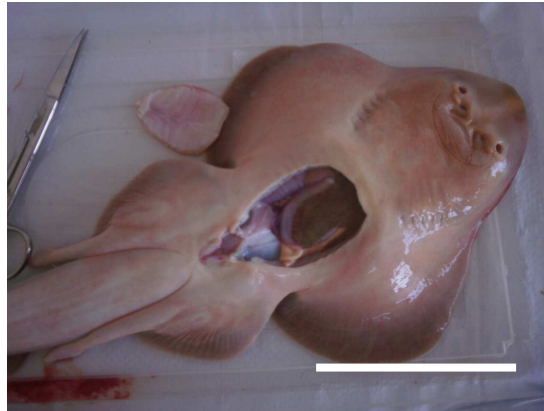


Figura 18 – Corte no abdômen para retirada de sangue e tecidos do animal (barra de escala: 10 cm).

#### 4.6 Dosagens plasmáticas

A osmolalidade do plasma foi determinada utilizando o micro-osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor, USA), usando amostras não diluídas. As concentrações de sódio e potássio foram determinadas em amostras diluídas (1:200) de forma a situarem-se na faixa de leitura (padrão com 150 mM de Na<sup>+</sup> e 5 mM de K<sup>+</sup>) dos métodos por fotometria de chama (Fotômetro de Chama CELM FC-180). As concentrações de cloreto (1:2), magnésio (1:15) e uréia (1:50) foram determinadas por colorimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech) utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil), com leitura de absorbância em 470 nm, 505 nm e 600 nm, respectivamente.

## 4.7 Teor hídrico muscular

As amostras de músculos retiradas foram mantidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até a sua avaliação. Os tecidos foram descongelados em temperatura ambiente, e após a pesagem do tecido úmido, os tecidos foram secos por 24 horas em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ , para desidratação e determinação do peso seco após secagem. O cálculo para determinação da porcentagem de água do tecido (Th) foi calculado pela fórmula:  $\text{Th} (\%) = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$ , onde Pu é o peso úmido tecidual inicial, e Ps seu peso seco.

## 4.8 Ensaio enzimáticos

### 4.8.1 Anidrase Carbônica

A atividade da anidrase carbônica foi determinada segundo o método estabelecido por Vitale *et al.* (1999). A homogeneização foi feita em tampão contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM e tris-fosfato 10 mM (pH 7,4) em uma proporção de 1:10 para para tecido branquial e renal. O sobrenadante foi retirado após centrifugação do homogenizado por 5 minutos a 110476.8 g em temperatura  $5^{\circ}\text{C}$ .

Para determinação da taxa de reação não catalisada (TNC), acrescentou-se 1 ml de água deionizada saturada com gás carbônico a 7,5 ml do tampão. O ensaio é mantido em gelo, a  $4^{\circ}\text{C}$ . A partir da adição da água saturada observou-se a queda do pH a cada 4 seg, durante 20 seg através do pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW, obtendo uma reta de regressão linear pH x tempo. A taxa catalisada (TC) foi avaliada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do homogeneizado tecidual. Para calcular a atividade da anidrase carbônica (AAC) utiliza-se a fórmula:  $\text{AAC} = [(TC/TNC)-1]/\text{mg proteína total}$ .

### 4.8.2 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

A atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (NKA) foi determinada segundo McCormick (1993), acoplado a hidrólise de ATP (ATPase sensível a ouabaína) com a oxidação de NADH pela piruvato quinase e lactato desidrogenase, em placas de 96 poços.



Para a homogeneização, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do tampão SEI (sacarose 250 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10mM e imidazol 50mM) à 100  $\mu\text{L}$  de 0.3% SEID (deoxicolato de sódio diluído no mesmo tampão), seguido de centrifugação a 110476.8 g, durante 8 minutos a 4°C. No ensaio cinético, as amostras foram adicionadas a 50  $\mu\text{L}$  de solução salina (Imidazol – 1,702g; NaCl - 5,52g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 1,07g; KCl – 1,57g, 500ml de solução) e então em duplicatas a 150  $\mu\text{L}$  da mistura de reação sem o inibidor ouabaína, e também em duplicatas à mistura de reação contendo ouabaína (0,5 mM/l). Antes da leitura das amostras, foram elaboradas as curvas padrão do NADH e ADP, para verificação dos reagentes e para permitir o cálculo da atividade da NKA. A inclinação da reta de calibração do ADP permite o cálculo da atividade. A absorbância foi lida a 340 nm por 10 minutos (TECAN Infinite M200, Áustria). A atividade da enzima foi medida pela diferença entre a inclinação da reta de queda da absorbância na ausência da ouabaína e a inclinação da reta na presença da ouabaína. A diferença foi dividida pela inclinação da reta de calibração do ATP. Em seguida o valor da divisão é multiplicado pela concentração de proteínas ( $\mu\text{g}$  ptn/min), por fim o valor da multiplicação foi novamente multiplicado por 60, de forma a estabelecer a atividade por em  $\text{mmol ADP}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}\cdot\text{h}^{-1}$ .

#### 4.8.3 Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados de tecidos para determinação das atividades específicas das enzimas foram dosadas utilizando-se o protocolo descrito por Bradford (1976), com microplacas eleitura em leitor de Elisa. O método foi baseado na ligação de grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, com leitura feita a 595nm (Miwa et al., 2008).

#### 4.9 Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através de análise de variância de duas vias (salinidade, 4 níveis: 35, 25, 15, 5; e tempo, 2 níveis: 6 e 12 horas). Os dados foram testados para normalidade e homogeneidade de variâncias, quando um destes dois requisitos não foi alcançado, o teste de Shapiro-Wilk foi

realizado. A ANOVA foi seguida por teste *post hoc* de Holm-Sidak, para localização de diferenças. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SigmaStat 2.3®. Para todos os resultados obtidos o nível de significância foi de 0,05. Foi realizado Mann-Whitney rank sum test ( $P = <0,001$ ) com os dados obtidos de atividade da NKA entre a glândula retal, rim e brânquia, de forma a detectar possíveis diferenças entre os valores de atividade.

## 5. RESULTADOS

A osmolalidade plasmática reduziu diante da diluição da água do mar, de ~980-985 mOsm/kgH<sub>2</sub>O em 35, para 713-825 mOsm/kgH<sub>2</sub>O em 5‰ após 12 ou 6 horas, respectivamente. O maior tempo de exposição levou a maior diluição plasmática, nas duas salinidades mais baixas. As raias *Z. brevirostris* são hiposmóticas em relação ao meio, em água do mar 35. Após redução de salinidade os animais passam a ser hiperosmóticos (25, 15 e 5‰) (Figura 19 A). A uréia plasmática reduziu-se apenas em 12 horas de exposição. De 406 mM em 35 para 266 mM em 5‰, uma redução de 65,51%. O maior tempo de exposição levou a maior diluição plasmática em salinidade 5‰ (Figura 19 B). A taxa de hidratação muscular foi mantida constante entre os grupos experimentais e controles (Figura 19 C).

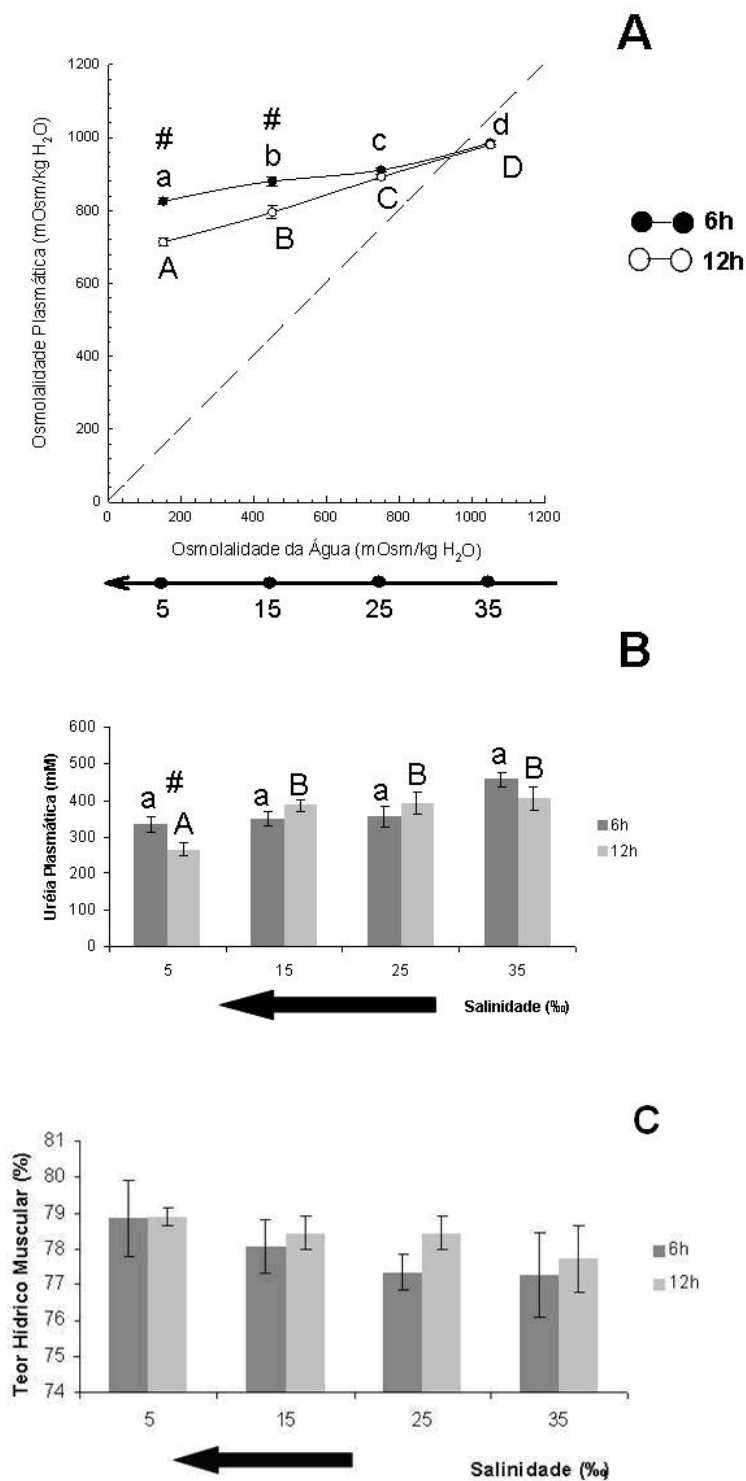


Figura 19 – Osmolalidade (A) e uréia plasmática (B) e teor hídrico muscular (C). (A) – Círculos pretos representam os valores obtidos após 6 horas de exposição. Círculos brancos representam os valores após 12 horas de exposição. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades após 6 horas. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades após 12 horas; (B) – Colunas escuras representam valores obtidos após 6 horas. Colunas claras representam valores após 12 horas. # indica que os valores obtidos em uma mesma salinidade foram diferentes após 6 e 12 horas. Os valores de osmolalidade na água foram calculados com base na relação: 1 ‰ corresponde a 30 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. A seta indica o sentido do tratamento experimental, de diluição da água do mar.

Seis horas de exposição a diluição da água do mar não foram suficientes para causar redução no sódio plasmático. Com o tempo maior de exposição, houve redução no sódio plasmático de 227 mM para 195 mM em 25‰ e daí para 168 mM em salinidade 5‰ (redução de 26% em relação ao controle) (Figura 20 A). A concentração de cloreto não foi diferente entre os grupos experimentais (salinidade e tempo) (Figura 20 B). Houve hipo-regulação de sódio e cloreto em 35 e 25‰, as raias foram aproximadamente iso-iônicas para sódio e cloreto em 10-15‰, e hiper-regularam estes íons em 5‰.

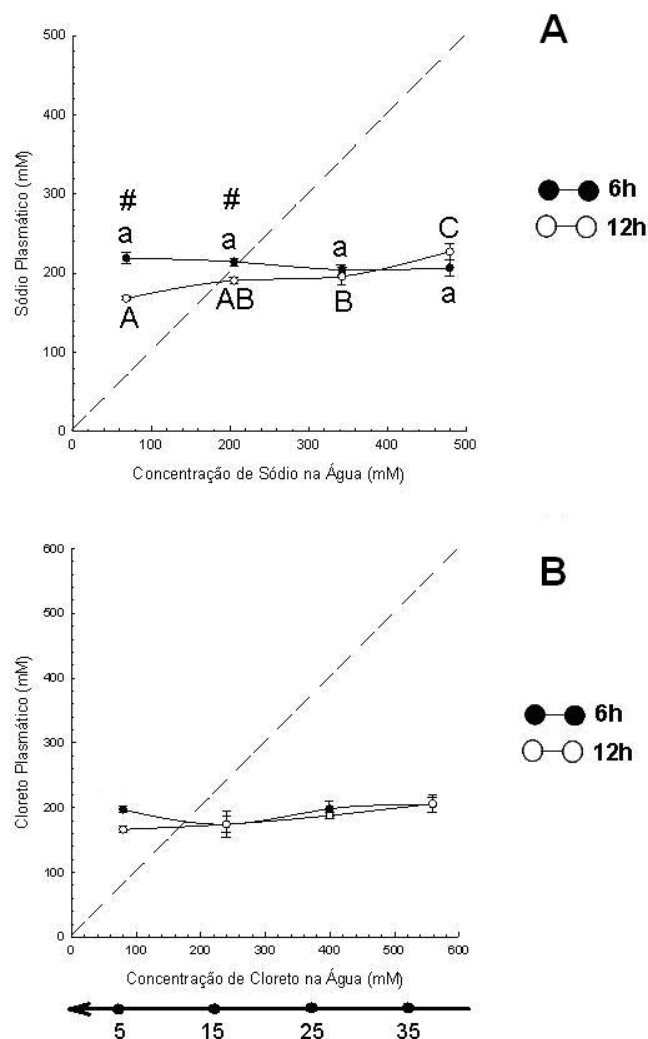


Figura 20 – Sódio (A) e Cloreto (B) plasmáticos. (A) (B) – Círculos pretos representam os valores obtidos após 6 horas de exposição. Círculos brancos representam os valores após 12 horas de exposição. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades experimentais após 12 horas; # indica que os valores obtidos em uma mesma salinidade foram diferentes após 6 e 12 horas. Não houve diferenças estatísticas entre os valores de cloreto plasmáticos. Os valores de concentrações iônicas na água foram calculadas com base na salinidade medida, e usando valores de referência para água do mar padrão obtidos de Prosser (1973). A seta indica o sentido do tratamento experimental, de diluição da água do mar.

Houve redução no potássio plasmático com a exposição das raias a diluição da água do mar, mas com grande variação individual dentro dos grupos. Após 6 horas houve redução de 7,35-6,73 mM em 35 e 25‰ para 5,6-4,1 mM em 15 e 5‰ (Figura 21 A). Após 12 horas de exposição houve redução progressiva na concentração, de 35‰ até 5‰. A redução após 6 horas entre 35 e 5‰ foi de 43,4%, e após 12 horas foi de 63,9% (Figura 21 A). Houve assim indicação de certa regulação do potássio plasmático após 6 horas, mas aparente confirmação após 12 horas. O magnésio plasmático foi diferente entre 35 e 5‰, porém a ANOVA não indicou em qual tempo de exposição. A variação da concentração de magnésio após 6 horas entre 35 e 5‰ foi de 45,5% e após 12 horas foi de 25,3% (Figura 21 B). O magnésio plasmático, apesar destas diferenças diante de diluição da água do mar, foi sempre fortemente hipo-regulado.

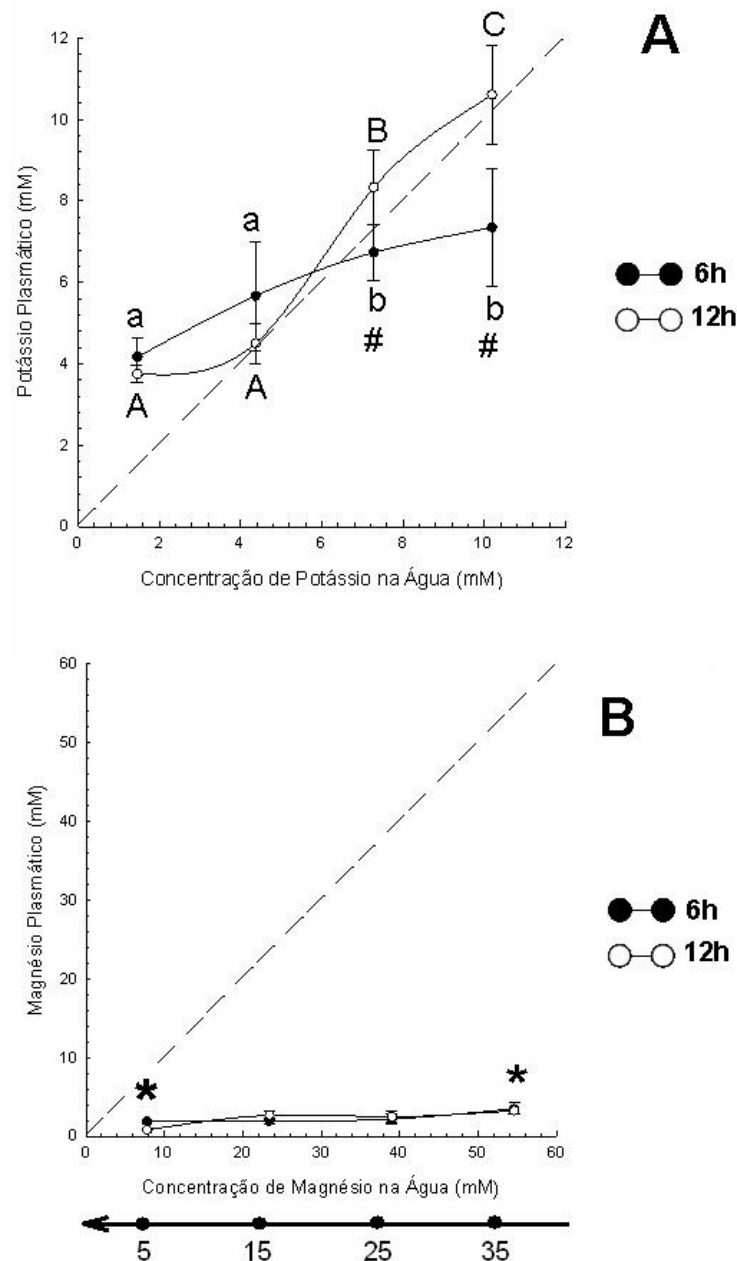


Figura 21 – Potássio (A) e Magnésio (B) plasmáticos. (A) (B) - Círculos pretos representam os valores obtidos após 6 horas de exposição. Círculos brancos representam os valores após 12 horas de exposição. (A) As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades após 6 horas. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades experimentais após 12 horas; # indica que os valores obtidos em uma mesma salinidade foram diferentes após 6 e 12 horas. (B) \* indica diferença estatística entre os grupos, não sendo possível determinar em qual tempo de exposição. Os valores de concentrações iônicas na água foram calculadas com base na salinidade medida, e usando valores de referência para água do mar padrão obtidos de Prosser (1973). A seta indica o sentido do tratamento experimental, de diluição da água do mar.

A atividade da enzima anidrase carbônica renal foi mais alta em 15‰ quando comparada à atividade em 5‰. Não foi possível determinar em qual tempo de exposição. Após 6 horas a atividade em 35‰ foi 2,76/mg proteína e em 5‰ foi

1,81/mg proteína . Após 12 horas a atividade em 35‰ foi 2,11/mg proteína e em 5‰ foi 1,22/mg proteína (Figura 22 A). A atividade da anidrase carbônica branquial não foi diferente entre as condições experimentais (salinidade e tempo) (Figura 22 B).

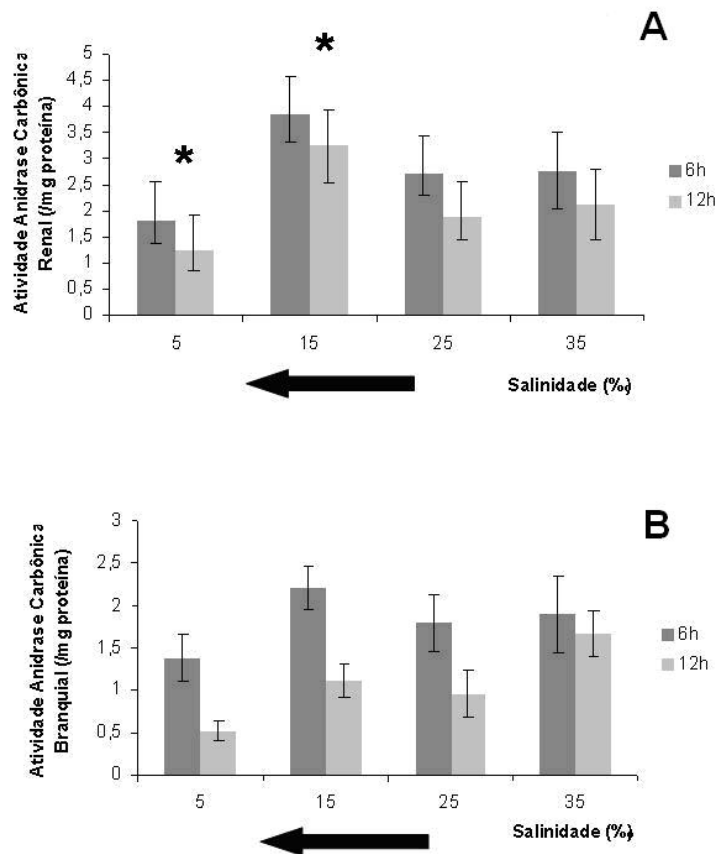


Figura 22 – Atividade da enzima Anidrase Carbônica (AC) em tecido Renal (A) e branquial (B). (A) \* indica diferença estatística entre os grupos assinalados (15 e 5‰), não sendo possível determinar em qual tempo de exposição. (B) Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais para anidrase carbônica branquial. A seta indica o sentido do tratamento experimental, de diluição da água do mar.

A atividade da NKA na Glândula retal foi mais alta em 35‰ após 6 horas com redução de 63,7% em 5‰. Após 12 horas de exposição, a atividade reduziu-se em salinidades mais baixas em comparação a 35 e 25 ‰ (Figura 23 A). A atividade da NKA renal foi maior em salinidade 5‰, com aumento de 30 vezes em comparação a atividade em 35‰. Não foi possível determinar em qual tempo de exposição a diferença foi observada (Figura 23 B). A atividade da NKA branquial não foi alterada pelo tratamento de exposição a diluição da água do mar por até 12 horas (Figura 23 C).

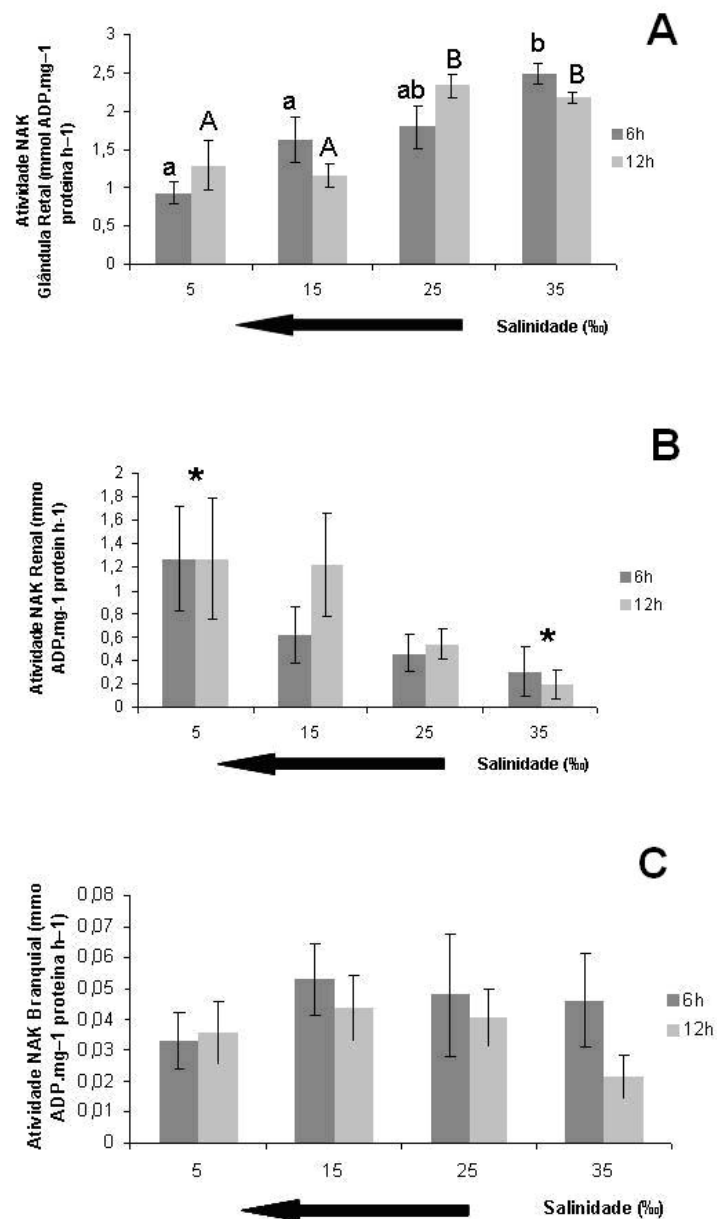


Figura 23 – Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase da Glândula retal (A), Renal (B) e Branquial (C). (A) As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes salinidades experimentais após 12 horas. (B) \* indica diferença estatística entre os grupos, não sendo possível determinar em qual tempo de exposição. A seta indica o sentido do tratamento experimental, de diluição da água do mar.

## 6. DISCUSSÃO

A diluição do LEC e conseqüente redução da osmolalidade, uréia e íons plasmáticos são esperados para espécies eurihalinas em ambientes de menor salinidade. Raias e tubarões são descritos na literatura como levemente hiperosmóticos em ambiente marinho, ou ainda isosmóticos (Ballantyne & Robinson,



2010). Em água salobra ou doce os animais citados na literatura continuam hiperosmóticos. Foi observada diluição do líquido extracelular *Z. brevirostris*, com queda nos valores plasmáticos de osmolalidade (17%), uréia (27%) e potássio (44%) após 6 horas de exposição à salinidade 5‰, e redução da osmolalidade (28%), uréia (35%), sódio (26%) e potássio (65%) após 12 horas de permanência em salinidade 5‰. Não foi observada diminuição dos valores de cloreto plasmático perante protocolo de diluição da água do mar (35‰ até 5‰). O magnésio plasmático, apesar de mostrar alguma redução, foi claramente hiporregulado em todas as salinidades. *D. sabina* e *C. leucas*, espécies eurihalinas bastante estudadas, apresentam diluição do LEC semelhante em ambiente marinho e diluído (de Vlaming & Sage, 1973; Pillans et al., 2006) (Tabela 1).

A diluição plasmática observada em *Z. brevirostris* foi menor que a descrita para as outras espécies de elasmobrânquios eurihalinos (de Vlaming & Sage, 1973, 2002; Pillans et al., 2006; Piermarini & Evans, 1998), podendo ser indicação de maior capacidade de regulação desta espécie ou apenas resultado do menor tempo de exposição ao ambiente de menor salinidade, quando comparado ao tempo de exposição proposto em outros estudos, como *D. sabina* com 6 dias de permanência em salinidade 9‰ (de Vlaming & Sage, 1973) ou *C. leucas*, com 10 dias de permanência em salinidade 0‰ (Pillans et al., 2006).

Observou-se que assim como relatado para *C. leucas* (Pillans et al., 2006) em ambiente marinho, *Z. brevirostris* é hiposmótica em relação ao meio (982 mOsm/kgH<sub>2</sub>O), diferente da maioria das espécies de elasmobrânquios. A condição hiposmótica da raia-viola-de-focinho-curto traz algumas implicações fisiológicas: com a osmolalidade do LEC menor que a observada no ambiente, o gradiente osmótico muda, mesmo que em pequena magnitude. Ao contrário do descrito na literatura, onde é observado influxo de água pelo gradiente osmótico favorável à entrada de água, em *Z. brevirostris* é possível que ocorra efluxo de água. Desta forma é esperado que a reabsorção renal de água seja maior e a urina mais concentrada e de menor volume, quando comparada com a de outros elasmobrânquios marinhos. Diferente dos teleósteos, os elasmobrânquios não apresentam o hábito de beber água em ambiente hiperosmótico (Ballantyne & Robinson, 2010). Tal comportamento é observado em peixes ósseos marinhos por serem fortemente hiposmóticos à água do mar, havendo absorção de sais e água pelo trato gastrointestinal, e posterior secreção de sal pelas brânquias. Segundo literatura o hábito

de beber água em elasmobrânquios vem sendo estudado recentemente, sendo comprovado em duas espécies, *Scyliorhinus canicula* (Hazon et al., 1997) e *Triakis scyllia* (Anderson et al., 2002). É possível que espécies de elasmobrânquios marinhos que sejam ligeiramente hiposmóticos em água do mar apresentem o comportamento de ingerir água para compensar a perda que ocorre pelas brânquias, rins e epitélios de interface com o meio externo em geral, sendo também possível que este comportamento seja observado em *Z. brevirostris*.

Espécie	Salinidade/Tempo	Osmolalidade (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)
<i>Carcharhinus leucas</i>	35‰ – 10 dias	916 <sup>(2)</sup>
<i>Dasyatis sabina</i>	35‰ – 6 dias	1021 <sup>(1)</sup>
<i>Zapteryx brevirostris</i>	35‰ – 6 e 12 horas	982
<i>Carcharhinus leucas</i>	0‰ – 10 dias	776 <sup>(2)</sup>
<i>Dasyatis sabina</i>	9‰ – 6 dias	629 <sup>(1)</sup>
<i>Zapteryx brevirostris</i>	5‰ – 6 e 12 horas	769,08

Tabela 1 – Dados de função osmorregulatória em duas espécies de elasmobrânquios marinhos eurihalinos, *D. Sabina* (1) de Vlaming & Sage, 1973; *C. Leucas* (2) Pillans et al., 2006.

Elasmobrânquios são denominados ureo-reguladores, sendo esperado que com a redução da osmolalidade os valores de uréia plasmáticos também apresentem queda. *Zapteryx brevirostris* apresentou concentração de uréia de 434 mM em salinidade 35‰. Valores semelhantes de uréia plasmática foram encontrados em *Dasyatis americana* (Cain et. al., 2004) e *Raja erinacea* (Treberg et. al., 2006) (Tabela 2). Elasmobrânquios eurihalinos como *Carcharhinus leucas* (Pillans & Franklin, 2004) e *Dasyatis sabina* (Piermarini & Evans, 1998) apresentam valores mais baixos de concentração de uréia quando em ambiente marinho, de 370 mM e 395 mM, respectivamente, quando comparados ao valores apresentados por *Z. brevirostris* em mesma salinidade (35‰). Quando expostos à redução de salinidade como feito em *Z. brevirostris*, *D. sabina* e *C. leucas* também apresentam redução significativa da concentração de uréia, com queda de 199 mM (Piermarini & Evans, 1998) e de 190 mM (Pillans & Franklin, 2004; Holmes & Donaldson, 1969), respectivamente, em salinidade 0‰. Foi observada redução de 34,4% da uréia entre 35 e 5‰ após 12 horas. Mesmo com a redução apresentada pela raia-viola, a capacidade de regulação de uréia foi observada. Os valores obtidos em salinidade 35‰ no presente estudo aproximam-se das concentrações observadas em espécies

exclusivamente marinhas como *Dasyatis uarNKA*, *Carcharhinus melanops* e *Pristis microdon* (Holmes & Donaldson, 1969) (Tabela 2). Os valores de uréia em *D. sabina* (Piermarini & Evans, 1998) e *C. leucas* (Holmes & Donaldson, 1969) em água doce são mais baixos que os encontrados em *Z. brevirostris* em 5‰. Em ambiente de água doce, a disponibilidade iônica é muito menor que a observada em 5‰, é possível que os valores mais altos que os encontrados nas outras espécies de elasmobrânquios eurihalinos estejam relacionados a esta diferença entre 5‰ e 0‰, ou ainda com o tempo de permanência dos animais em salinidade mais baixa de apenas 12 horas, sendo provável que em maior tempo de exposição, a redução maior também seja observada em *Z. brevirostris*.

Espécie	Salinidade/Tempo	Uréia plasmática (mM)
<i>C. leucas</i> (E)	25‰ – coleta em campo	370 <sup>(2)</sup>
<i>D. sabina</i> (E)	30‰ - 10 dias	229 <sup>(1)</sup>
<i>Z. brevirostris</i> (E)	35‰ – 6 e 12 horas	432
<i>C. leucas</i>	0‰ - coleta em campo	180 <sup>(2)</sup>
<i>D. sabina</i>	0‰ - 32 dias	174 <sup>(1)</sup>
<i>Z. brevirostris</i>	5‰ - 6 e 12 horas	300,82
<i>D. americana</i> (M)	35‰	444 <sup>(4)</sup>
<i>R. erinacea</i> (M)	35‰	359,4 <sup>(5)</sup>
<i>D. uarNKA</i> (E)	0‰	104 <sup>(3)</sup>
<i>C. melanop</i> (E)	0‰	103 <sup>(3)</sup>
<i>P. microdon</i> (E)	0‰	130 <sup>(3)</sup>

Tabela 2 – Resumo de dados disponíveis na literatura. (E) – elasmobrânquios eurihalinos, (M) elasmobrânquios exclusivamente marinhos. (1) Piermarini & Evans, 1998; (2) Pillans & Franklin, 2004; (3) Holmes & Donaldson, 1969; (4) Cain *et al.*, 2004; (5) Treberg *et al.*, 2007.

Elasmobrânquios são capazes de regular a concentração do líquido extracelular, mantendo assim os valores de composição do LEC constantes. Esta regulação é de grande importância, visto que a não variação do LEC cria um ambiente estável para as células e tecidos. Animais conformadores, que não possuem capacidade de manter a osmolalidade constante diante de mudanças na salinidade do ambiente, necessitam de mecanismos específicos de regulação de volume celular, de forma a evitar que as células inchem ou murchem além de sua capacidade de manutenção de volume. Como raias e tubarões são reguladores, o controle de volume celular é menos necessário para a sobrevivência e eurihalidade

do animal do que potencialmente para animais inteiramente conformadores. Alta capacidade de regulação da água tecidual é adaptativo, especialmente em animais eurihalinos que migram entre ambientes, e é alta em teleósteos (Freire *et al.*, 2008). Desta forma, é esperado que o teor de hidratação muscular nestes animais seja mantido estável diante de redução de salinidade (Anderson *et al.*, 2007). Não foi observada diferença no teor de hidratação tecidual muscular em *Z. brevirostris* em protocolo de redução de salinidade por 6 e 12 horas. A manutenção do teor hídrico muscular também foi observada em *Dasyatis sabina* com redução de salinidade por 12 dias (35‰ - 10‰) (de Vlaming & Sage, 1973). *Negaprion brevirostris* em redução intermediária (15‰) também não apresentou diferença na hidratação tecidual (Goldstein *et al.*, 1971). A alta capacidade de manutenção da hidratação muscular em *Z. brevirostris*, fato compatível com a sobrevivência frente a desafio osmótico, pode comprovar a capacidade de regulação da espécie, ao menos em curto prazo.

Foi observada capacidade de regulação do sódio plasmático em 6 horas. Após 12 horas de exposição houve redução do sódio plasmático nas salinidades mais baixas (25, 15 e 5‰). Mesmo com a redução em *Z. brevirostris* foi possível observar a capacidade da espécie em regular este íon que é hiporregulado, dada sua importância secundária na manutenção da osmolalidade em elasmobrânquios, como citado na literatura (Evans *et al.*, 2005; Ballantyne & Robinson, 2010). A hiporregulação deste íon é observada em todas as espécies de elasmobrânquios marinhos, eurihalinos e dulcícolas estudados (Tabela 3). Para elasmobrânquios eurihalinos como *D. sabina* e *C. leucas*, nota-se que a redução da concentração é semelhante a observada em *Z. brevirostris* (35‰ – 5 ou 0‰) (Tabela 3).

A concentração do íon cloreto foi mantida constante frente a todas as salinidades testadas após 6 e 12 horas de exposição (Tabela 3). A variação do cloreto plasmático assim como ocorre com o sódio, é esperada para espécies que são submetidas à redução de salinidade, porém tal fato não ocorreu em nosso estudo. A concentração em condição controle (35‰) foi de 205,9 mM, com redução de 11,4% em 5‰. Em *D. sabina* foi observada redução 30,6% entre salinidade 35 e 9‰ (de Vlaming & Sage, 1973). Para *C. leucas* a redução também foi bastante significativa com redução de 26% entre 35 e 0‰ (Thorson *et al.*, 1973; Pillans & Franklin, 2004). É possível que a pequena redução do cloreto em *Z. brevirostris* esteja relacionada com o tempo de exposição proposto. *D. sabina* e *C. leucas* foram expostos à salinidades mais baixas por dias, enquanto em *Z. brevirostris* o tempo

máximo de permanência foi de 12 horas (Tabela 3). É provável que em maiores tempos de permanência em salinidade mais baixa, a concentração de cloreto em *Z. brevirostris* também reduza de forma significativa. Após avaliação concentrações dos íons sódio e cloreto em *Z. brevirostris*, pudemos concluir que a espécie possui capacidade de hiporregular ambos perante redução de salinidade, comprovando assim sua eurihalidade e capacidade de habitar ambientes diluídos, ao menos em curto prazo.

O potássio no plasma apresentou redução após 6 horas nas salinidades mais baixas. A redução em 15‰ foi 22,9 % e em 5‰ 43,4% em comparação com a concentração em 35‰. Após 12 horas de exposição foi observada redução nas salinidades 25, 15 e 5‰ em relação ao controle (35‰), com redução de 21,4%, 57,54% e 64,6%, respectivamente (Tabela 3). Foi observado que os valores iniciais de potássio em 12 horas (10,6 mM) foram maiores que os obtidos após 6 horas (7,35 mM), o que resultou em valores de redução maiores nos animais que permaneceram nas condições experimentais por 12 horas. A concentração de 10,6 mM (35‰ – 12 horas) observada em *Z. brevirostris* mostra-se elevada em comparação ao observado em outras espécies eurihalinas (Tabela 3). Apenas *Heterodontus francisci*, espécie de elasmobrânquio exclusivamente marinho apresenta valores elevados de potássio plasmático (McDonald & Milligan, 1992) como os obtidos em nosso estudo. Mesmo com valores elevados e diferença de concentração alta entre 35 e 5‰, os valores obtidos em *Z. brevirostris* condizem com os padrões dos elasmobrânquios para este íon sendo observada tendência de conformação do potássio e não regulação como observado com o sódio e o cloreto.

O magnésio plasmático em *Z. brevirostris* apresentou redução em 5‰ quando comparado a 35‰, porém não foi possível detectar em qual tempo de exposição. A redução foi de 60,6% entre 35‰ e 5‰ (Tabela 3). Mesmo com redução da concentração em 5‰, a capacidade de regulação deste íon mostra-se presente na espécie, ao menos em curto prazo. Valores de magnésio nos animais eurihalinos *D. sabina* e *C. leucas* não foram caracterizados em ambiente marinho na literatura levantada, apenas os valores observados em salinidades mais baixas, estes semelhantes aos encontrados em *Z. brevirostris*, de 1,4 mM para *C. leucas* (Thorson *et al.*, 1973) (Tabela 3). Mesmo sem dados na literatura para realizar discussão a respeito das concentrações de magnésio plasmático em elasmobrânquios eurihalinos, sabe-se que este íon é de extrema importância no

meio intracelular, dada sua função de ativação enzimática e manutenção de conformação de membrana (Flatman, 1993). Pode-se concluir então que *Z. brevirostris* apresenta capacidade de regular e manter valores de magnésio plasmático compatíveis com sua vida, ao menos após 12 horas.

Espécie	Salinidade/Tempo	Na <sup>+</sup> (mM)	Cl <sup>-</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	Mg <sup>2+</sup> (mM)
<i>C. leucas</i> (E)	25‰ – coleta em campo	289 <sup>(2)</sup>	296 <sup>(2)</sup>	-	-
<i>D. sabina</i> (E)	35‰ – 6 dias	301 <sup>(1)</sup>	310 <sup>(1)</sup>	6,1 <sup>(1)</sup>	-
<i>Z. brevirostris</i> (E)	35‰ - 6 e 12 horas	216,5	205	10 (12hrs)	3,3
<i>C. leucas</i>	0‰ - coleta em campo	245 <sup>(2)</sup>	219 <sup>(2)</sup>	-	1,4 <sup>(3)</sup>
<i>D. sabina</i>	9‰ – 6 dias	192 <sup>(1)</sup>	215 <sup>(1)</sup>	1,7 <sup>(1)</sup>	-
<i>Z. brevirostris</i>	5‰ – 6 e 12 horas	193	181	4,1	1,3
<i>H. francisci</i> (M)	35‰	-	-	10 <sup>(4)</sup>	-

Tabela 3 – Valores de Sódio, Cloreto, Potássio e Magnésio plasmáticos observados em elasmobrânquios eurihalinos (E) e marinhos (M). (1) – de Vlaming & Sage, 1973. (2) – Pillans & Franklin, 2004. (3) Thorson *et al.*, 1973. (4) McDonald & Milligan, 1973.

Sabe-se que a função da Anidrase Carbônica em elasmobrânquios está relacionada com a necessidade de equilíbrio ácido-base e secundariamente com o transporte iônico relacionado à secreção ou reabsorção de sal (Evans *et al.*, 2005; Ballantyne & Robinson, 2010). Sabe-se também que a atividade desta enzima é maior em animais de água doce ou eurihalinos aclimatados em água diluída, dada a maior necessidade em manter o equilíbrio ácido-base, este desregulado pelo pH menor observado em ambientes dulcícolas. É maior também a necessidade de transporte iônico realizado pela anidrase carbônica em ambientes diluídos, visto que a disponibilidade de íons neste ambiente é menor (Evans, 1984). Em nosso estudo com *Z. brevirostris*, o aumento da atividade da anidrase carbônica renal na salinidade 15‰ após 6 horas pode estar relacionado ao choque osmótico que a espécie sofreu, é possível que a diminuição do pH ou da concentração iônica tenham sido maiores entre 25 e 15, e não em 5‰, como esperado. Segundo literatura, a atividade é maior em tecido renal e tende a aumentar conforme redução de salinidade (Ballantyne & Robinson, 2010). Em teoria, a atividade da enzima deveria ser mais alta nos animais aclimatados em 5‰, visto que este ambiente é

caracterizado pela menor disponibilidade iônica e possivelmente menor pH (Evans, 1984; Ballantyne & Robinson, 2010). A atividade também deveria ser mais alta visto que está diretamente relacionada aos trocadores iônicos  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Evans, 1984). O aumento na atividade da anidrase carbônica em teoria levaria ao aumento na concentração de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  no meio intracelular. O aumento das concentrações e a necessidade em secretar ambos para o meio levariam à ativação dos trocadores  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que por consequência ao secretarem o excesso de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  para o meio (brânquias) ou lúmen (rim), realizariam reabsorção de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , permitindo desta forma a captação iônica tão necessária em ambientes diluídos (Ballantyne & Robinson, 2010). É possível que os tempos de exposição (6 e 12 horas), não foram suficientes para caracterizar desafio osmótico e perda significativa de íons, que justificariam a ativação da enzima. É possível também que devido a importância secundária dos íons na manutenção osmótica em elasmobrânquios, a diminuição da disponibilidade de NaCl no meio, não afete estes animais, ao menos em curto prazo.

A bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (NKA) é de extrema importância em processos de transporte iônico (Evans *et al.*, 2005). Sua ativação e funcionamento são dependentes de ATP, gerando transporte iônico contra o gradiente. Juntamente com o co-transportador  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  e os canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , a NKA exerce papel fundamental na secreção ativa de íons quando em ambiente marinho pela glândula retal nos elasmobrânquios e reabsorção ativa de íons pelos rins e brânquias quando estes animais encontram-se em ambientes diluídos. Estudos de NKA nos diferentes tecidos que participam da osmorregulação em elasmobrânquios são numerosos (Hayslett *et al.*, 1972; Lytle & Forbusch, 1992; Piermarini & Evans, 2000; Wilson *et al.*, 2002; Pillans *et al.*, 2005; Choe *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2009).

Em *Z. brevirostris* a atividade da NKA da glândula retal foi maior em 35% de forma geral. Tal resultado era esperado e corrobora com a literatura atual, com valores elevados em ambiente marinho para *D. Sabina* (Pillans *et al.*, 2005) e *C. leucas* (Piermarini & Evans, 2000). Padrão semelhante de redução da atividade da NKA da glândula retal em ambientes mais diluídos podem ser observados em *C. leucas* (Pillans *et al.*, 2005), com redução de 39% e em *D. sabina* (Piermarini & Evans, 2000) com redução de 50%. A maior atividade da NKA na glândula retal em ambiente marinho na *Z. brevirostris* era esperada, dada a importância desta bomba na secreção de sal em elasmobrânquios. A atividade foi baixa quando comparada a

outras espécies. É possível que esta diferença esteja relacionada ao método empregado na leitura de atividade, que foi diferente ao usado nos trabalhos com *C. leucas* e *D. Sabina*. Mesmo com valores bem menores de atividade, o padrão observado em espécies de elasmobrânquios eurihalinos se repetiu, com maior atividade em água salgada e redução gradual de atividade em água salobra.

A NKA renal não é tão importante nos processos de secreção iônica nos elasmobrânquios, dada a relevância e alta atividade da enzima na glândula retal na secreção de NaCl em ambiente marinho (Ballantyne & Robinson, 2010). Porém sua importância e atividade aumentam muito em ambientes de menor salinidade (Piermarini & Evans, 2000), visto que em ambientes diluídos a disponibilidade de íons é baixa, é necessária a reabsorção altamente eficiente dos íons nas porções renais, de forma a manter as concentrações compatíveis à vida. Em *Z. brevirostris* a atividade da NKA renal foi maior em salinidade 5‰ em comparação à atividade em 35‰ (~ 30 vezes). Não foi possível determinar em qual tempo de exposição. De fato, corroborando dados obtidos em *C. leucas* (Piermarini & Evans, 2000), referentes à atividade da NKA renal em ambiente marinho e dulcícola e esperados para espécies eurihalinas de elasmobrânquios, *Z. brevirostris* apresenta atividade da NKA maior em ambientes de menor salinidade do que em ambiente marinho. É possível que a atividade em curto prazo (12 horas) aumente ainda mais com maior tempo de exposição, porém mesmo com pouco tempo de exposição foi possível observar a atividade em *Z. brevirostris*, comprovando a importância da atividade desta bomba no processo de adaptação e conquista de novos ambientes.

Por fim, a presença da NKA em brânquias é conhecida, mas dada a importância secundária na em secreção de sal em ambiente marinho, a atividade esperada é baixa. Em ambientes diluídos o esperado para raias e tubarões eurihalinos é o aumento da atividade, dada a necessidade de maior captação de íons do ambiente (Piermarini & Evans, 2000). Em *D. sabina*, a atividade aumentou (Piermarini & Evans, 2000). Em *Z. brevirostris* tal aumento não foi observado. A ausência de aumento também foi observada em *C. leucas* aclimatados por 17 dias em água salgada e doce (Pillans *et al.*, 2005). A atividade geral da NKA branquial em *C. leucas* foi baixa como também observado em *Z. brevirostris*. A ausência de aumento na atividade pode estar relacionada ao tempo de permanência em salinidade mais baixa. É possível que para a espécie em questão neste estudo, 12



horas de exposição não seja de fato um desafio osmótico. E após exposição de dias a atividade da NKA branquial aumente em ambiente de menor salinidade.

Foi realizado Mann-Whitney rank sum test ( $P = <0,001$ ) com os dados obtidos de atividade da NKA na glândula retal, rins e brânquias de forma a detectar possíveis diferenças entre os tecidos. De fato, em comparação entre as atividades foi possível concluir que atividade da glândula retal foi mais alta que a observada no tecido renal, que por sua vez foi maior que a observada do tecido branquial. Este resultado é também observado em *C. leucas* (Pillans *et al.*, 2005).

Estudos fisiológicos de raias e tubarões eurihalinos são escassos. A raia-viola-de-focinho-curto é classificada oficialmente como marinha, porém há relatos dessas raias em estuários paranaenses. Não houve morte de nenhum exemplar de *Zapteryx brevirostris* durante o experimento de redução de salinidade. A coleta dos animais foi realizada cerca de 20 km da costa, sendo necessária viagem de barco de aproximadamente duas horas do local onde as redes de espera eram montadas até a feira de peixe onde os animais eram obtidos. Foi observada capacidade de sobrevivência, mesmo tendo as raias permanecido por aproximadamente 2 horas fora da água dentro das caixas plásticas de transporte usadas pelos pescadores. Mesmo com a privação de água de 2 horas os animais eram coletados vivos e recuperavam-se do estresse da captura em 24 horas (movimentos de nado e espiráculos normalizados). Os animais usados no experimento demonstraram alta capacidade de regulação osmótica e iônica em todas as salinidades testadas (35, 25, 15 e 5‰) nos dois tempos de exposição, 6 e 12 horas. Não houve morte de nenhum exemplar de *Zapteryx brevirostris* durante o experimento de redução de salinidade. Capacidade de sobrevivência semelhante é observada em outras espécies eurihalinas de elasmobrânquios já estudadas, *Dasyatis sabina* com permanência de 8 dias em salinidade intermediária (15‰) (Piermarini & Evans, 1998), 12 dias em salinidade 10‰ (de Vlaming & Sage, 1973) e 32 dias em salinidade 0‰ (Piermarini & Evans, 1998), e *Carcharhinus leucas* (Pillans *et. al.*, 2006) com permanência em 0‰ durante 16 dias. A capacidade de regulação e sobrevivência em *Z. brevirostris* é compatível com os relatos de permanência da espécie em estuários, ao menos em curto prazo (horas). Foi possível concluir que a espécie *Zapteryx brevirostris* é de fato eurihalina, e não apenas marinha como descrita atualmente, possivelmente encaixando-se na classificação de animais marinhos que entram ocasionalmente em água salobra proposta por Ballantyne e

Robinson (2010). São necessários mais estudos de forma a avaliar o grau de eurihalidade da espécie, observando desta forma se ela é tão eurihalina a ponto de tolerar água doce durante dias como *D. sabina* (Piermarini & Evans, 1998) e *C. leucas* (Pillans et. al., 2006) ou possui capacidade apenas em tolerar salinidades compatíveis com ambientes estuarinos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de eurihalidade apresentada por *Zapteryx brevirostris*. Segundo relatos de sua presença em estuários, o protocolo proposto para este trabalho foi baseado em variações de salinidade encontradas no ambiente estuarino diariamente, as variações que vão de água salgada (35‰) até água muito diluída (5‰) ocorrem várias vezes em um dia. O protocolo estabelecido foi de curto prazo, com exposição máxima de 12 horas. Após análise dos dados plasmáticos, teciduais e enzimáticos obtidos, pudemos concluir que a raia-viola-de-focinho-curto é uma espécie de elasmobrânquio capaz de habitar ambientes estuarinos. Visto que 95% das espécies de raias e tubarões são exclusivamente marinhos, a capacidade de regulação de *Z. brevirostris* a inclui no seletivo grupo de elasmobrânquios que podem viver em diferentes salinidades e desta forma fazer parte de diferentes nichos ecológicos. Visto que esta espécie já tem sua posição de mesopredadora bem estabelecida na literatura, podemos concluir que a eurihalidade comprovada permite que este animal faça parte de níveis elevados de cadeias tróficas não apenas marinhas, mas também estuarinas e possivelmente dulcícolas.

A espécie utilizada no presente estudo encontra-se vulnerável na lista de animais ameaçados de extinção. Entretanto, no Paraná, a espécie não conta com leis de proteção e proibição de pesca. São animais encontrados constantemente no descarte da pesca de camarão, sendo observada também a prática da venda da carne desta espécie como carne de cação. Estudos fisiológicos que visem entender a capacidade de sobrevivência, bem como adaptação da espécie são de extrema importância, para que, juntamente com estudos de estrutura populacional, reprodução, morfometria, alimentação e distribuição, seja possível obter-se maior conhecimento desta espécie e desta forma protegê-la. A literatura apresenta dados

de duas espécies de elasmobrânquios eurihalinos, a raia *Dasyastis sabina* e o tubarão *Carcharhinus leucas*, com a comprovação da eurihalinidade de *Z. brevirostris* apresentada neste trabalho, é possível incluir esta espécie no grupo de raias e tubarões com esta peculiaridade, sendo desta forma possível iniciar novos estudos de fisiologia e biologia molecular com esta raia. Por ser um animal de tamanho reduzido ( $\pm 60\text{cm}$ ) e fácil obtenção torna-se mais fácil aclimatar os animais em laboratório, porém dado seu status ameaçado é necessário estabelecer protocolos não-letais de estudo.

## REFERÊNCIAS

- ALTHOFF, T., HENTSCHEL, H., LUIG, J., SCHÜTZ, H., KASCH, M., KINNE, R.K.H, 2005. Na<sup>+</sup>-D-Glucose cotransporter in the kidney of *Squalus acanthias*: molecular identification and intrarenal distribution. *American Journal of Physiology*, **4**, 1094-1104.
- ANDERSON, W.G., GOOD, J.P., HAZON, N., 2002. Changes in secretion rate and vascular perfusion in the rectal gland of the European lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) in response to environmental and hormonal stimuli. *Journal of Fish Biology*, **60**, 1580–1590.
- ANDERSON, W.G., TAYLOR, J.R., GOOD, J.P., HAZON, N., GROSELL, M., 2007. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **148**(A), 3-13.
- BALLANTYNE, J.S., ROBINSON, J.W., 2010. Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry, *Journal of Comparative Biology*, **180**, 475-493.
- BATISTA, V.S. 1987. Desenvolvimento sexual de *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841), no litoral do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, **47**(3), 301-307.
- BOYLAN J.W., FELDMAN B., ANTOWIAK D., 1967. Factors affecting gill permeability in *Squalus acanthias*. *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory* **5**, **29**.
- BRADFORD, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical and Bioanalytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A., 2004. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoology and Wildlife Medicine*, **35**, 471–476.
- CASTELLO, H.P., 1971. Contribución al conocimiento sistemático y biológico de *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841) de la costa atlántica marplatense (Chondrichthyes, Rhinobatidae). *Physis*, **30**(80), 619-629.
- CHEW, S.F., POOTHODIYIL, N.K., WONG, W.P., IP, Y.K., 2006. Exposure to brackish water, upon feeding, leads to enhanced conservation of nitrogen and increased urea synthesis and retention in Asian freshwater stingray *Himantura signifer*. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 484–492.
- CHOE, K.P., SUSAN, L.E., JAMES, B.C., EVANS, D.H., 2007. The putative mechanism of Na<sup>+</sup> absorption in euryhaline elasmobranchs exists in the gills of a stenohaline marine elasmobranch, *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **146**(A), 155–162.

- COHEN, J.J.; KRUPP, M.A.; CHIDSEY, C.A., 1958. Renal conservation of trimethylamine oxide by the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *American Journal of Physiology*, **194**, 229–235.
- COMPAGNO, L. J. V. 1977. Phyletic relationships of living sharks and rays. *American Zoologist*, **17**, 303–322.
- COOMBS, S. & MONTGOMERY, J.C., 1999. The enigmatic lateral line system, *Comparative Hearing: Fish and Amphibians*. R.R. Fay & A.N. Popper, **Editora Springer-Verlag**, 319–362.
- DOWD, W.W., HARRIS, B.N., CHECH, J.J., JR., KÜLTZ, D., 2010. Proteomic and physiological respond of leopard sharks (*Triakis semifasciata*) to salinity changes. *The Journal of Experimental Biology*, **213**, 210-224.
- de VLAMING, V.L.; SAGE, M., 1973. Osmoregulation in the euryhaline elasmobranch, *Dasyatis sabina*. *Comparative Biochemistry Physiology*, **45**, 31–44.
- DUNCAN, W.P., COSTA, O.T.F., ARAUJO, M.L.G., FERNANDES, M.N. 2009. Ionic regulation Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, **74**, 956-960.
- 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., COSTA,, SAKURAGUI, O.T.F., , MARGARETH M., FERNANDES, M.N. 2010. Functional Morphology of the Gill in Amazonian Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): Implications for Adaptation to Freshwater. *Physiological and Biochemical Zoology*, **83**(1), 19-32.
- DUNCAN, W.P., SILVA, N.F., FERNANDES, M.N., 2011. Mitochondrion-rich cells distribution, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and gill morphometry of the Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, **37**(3), 523-531.
- EVANS, D.H., 1984. Gill Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange systems evolved before the vertebrates entered freshwater. *Journal of Experimental Biology*, **113**, 465–469.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gás Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, **85**, 97-177.
- FIGUEIREDO, J.L. 1977. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: I. Introdução: cações, raias e quimeras*. São Paulo, **Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**, 104 pag.

FINES, G.A., BALLANTYNE, J.S., WRIGTH, P.A., 2001. Active urea transport and an unusual basolateral membrane composition in the gills of a marine elasmobranch. *American Journal of Physiology*, **280**, 16-24.

FISHBASE - Acessado em Junho/2011 (<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=14141&genusname=Zapteryx&speciesname=brevirostris>)

FLATMAN, P. W. (1993). The role of magnesium in regulating ion transport. *Magnesium and the Cell*. Editora N. J. Birch, 197–216.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; Souza, M.M.; PRODOCIMO, V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **149**(A), 435–446.

GOLDSTEIN, L., OPPELT, W.W., MAREN, T.H., 1968. Osmotic regulation and urea metabolism in the lemon shark *Negaprion brevirostris*. *American Journal of Physiology*, **215**, 1493–1497.

GONZALEZ, M.M.B, 2004. Nascimento da raia-viola *Zapteryx brevirostris* (Muller & Henle) (Chondryctes, Rhinobatidae), em cativeiro. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**(4), 785-788.

HAYSLETT, J.P., JAMPOL, L.M., FORREST, J.N, EPSTEIN, M., MURDAUGH, H.V., MYERS, J.D. 1973. Role of Na-K-ATPASE in the renal reabsorption of sodium in the elasmobranch, *Squalus Acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **44**(A), 417-422.

HAZON, N.; TIERNEY, M.; TAKEI, Y. 1997. The role of the rennin angiotensin system in elasmobranch fish. American Elasmobranch Society 13<sup>th</sup> Annual Meeting – Abstract.

HAZON, N., ANDERSON, G., GOOD, J., PILLANS, R., FRANKLIN, C., 2007. Osmoregulation in elasmobranch fish- A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **146**(A), S87-S96.

HAZON, N. 2009. Osmoregulations in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **153**(A), 64.

HELFMAN G.S., COLLETTE B.B., FACEY, D.E., 1997. The diversity of fishes.  
HOFF, T.B. & MUSICK, J.A., 1990. Western North Atlantic shark-fishery management problems and informational requirements. *National Marine Fisheries Service*, **90**, 455–472.

HOLMES, W.N.; DONALDSON, E.M., 1969. The body compartments and the distribution of electrolytes. Fish Physiology. Excretion, ionic regulation, and metabolism, **Academic Press**, 1–89.

- HUETER, R.E. & COHEN, J.L. 1991. Vision in elasmobranchs: a comparative and ecological perspective. *Journal of Experimental Zoology*, **5**, 1–182.
- JANECH, M.G., FITZGIBBON W.R., PLOTH D.W., LACY, E.R., MILLER, D.H., 2006. Effect of low environmental salinity on plasma composition and renal function of the Atlantic stingray, a euryhaline elasmobranch. *American Journal of Physiology*, **291**, 770–780.
- LORENZINI, S. 1678. *Osservazioni intorno alle Torpedini*, **Vol. 1. Florence**. 136 pg.
- LUND, R. & GROGAN E.D. 1997. Relationships of the Chimaeriformes and the basal radiation of the Chondrichthyes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **7**, 65–123.
- LUND, R., GROGAN R. *Biology of sharks and their relatives*. **CRC PRESS LLC**, 2004.
- LYTHE, S.C. & FORBUSH, B. III, 1992. The Na-K-Cl Cotransport Protein of Shark Rectal Gland. *The Journal Of Biological Chemistry*, **267**(35), 25438-25443.
- MARION, C. 2009. Hábitos alimentares da raia-viola, *Zapteryx brevirostris*, (Muller & Henle, 1981) (Chondryctes, Rhinobatidae) no litoral Norte do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu. 82pg.
- MARION, C., 2011. Feeding habits of the shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Müller and Henle, 1841) (Elasmobranchii, Rhinobatidae) in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **71** (1).
- MARTIN, R.A., 2005. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs. *Journal of Marine Biology Association UK*, **85**, 1049–1073.
- McCORMICK, S.D. 1993. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 56-658.
- McDONALD, D.G., MILLIGAN, C.L. 1992. Chemical properties of the blood. *Fish physiology*, **EDITORA. Academic Press**, 55–133.
- MOTTA, P.J., WILGA, C.D. 2001. Advances in the study of feeding behaviors, mechanisms, and mechanics of sharks. *Environmental Biology Fishery*, **60**, 131-56.
- MYRBERG, A.A., Jr. 2001. The acoustical biology of elasmobranchs. *Environmental Biololy of Fishes* **60**, 31–45.
- NELSON, J. S., 1994. *Fishes of the World*. **John Wiley & Sons**, 624 pg.
- OGURI, M., 1964. Rectal glands of marine and fresh-water sharks: comparative histology. *Science*, **144**, 1151–1152.

- ØRVIG, T. 1951. Histologic studies of Placoderms and fossil Elasmobranchs. I. The endoskeleton, with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. *Arkiv for Zoology*, **2**, 321–456.
- PIERMARINI, P.M., EVANS, D.H., 1998. Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater Lake Jesup of the St. Johns River, Florida. *Physiological Zoology*, **71**, 553–560.
- PIERMARINI, P.M., EVANS, D.H., 2000. Effects of environmental salinity on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology*, **203**, 2957–2966.
- PIERMARINI, P.M., EVANS, D.H., 2001. Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Experimental Biology*, **204**, 3251–3259.
- PIERMARINI, P.M., VERLANDER, J.W., ROYAUX, I.E., EVANS, D.H., 2002. Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. *American Journal of Physiology*, **283**, 983–992.
- PILLANS, R.D.; FRANKLIN, C.E., 2004. Plasma osmolyte concentrations and rectal gland mass of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry Physiology*, **138**(A), 363–371.
- PILLANS, R.D.; GOOD, J.P.; ANDERSON, W.G.; HAZON, N.; FRANKLIN, C.E., 2005. Freshwater to seawater acclimation of juvenile bull sharks (*Carcharhinus leucas*): plasma osmolytes and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill, rectal gland, kidney and intestine. *Journal of Comparative Physiology*, **175**(B), 37–44.
- PILLANS, R.D., ANDERSON, W.G., GOOD, J.P., HYODO, S, TAKEI Y, HAZON N, FRANKLIN, C.E. 2006. Plasma and erythrocyte solute properties of juvenile bull sharks, *Carcharhinus leucas*, acutely exposed to increasing environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **331**, 145–157.
- PILLANS, R.D., GOOD, J.P., ANDERSON, W.G., HAZON, N., FRANKLIN, C.E., 2008. Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, **72**, 1559-1571.
- PROSSER, C.L., 1973. *Comparative Animal Physiology*. W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- RODINA, O. A. & IVANOV, A. O. 2002. Chondrichthyans from the Lower Carboniferous of Kuznetsk Basin. *Russian Academy of Sciences International Symposium, Geology of the Devonian System*, 263–268.
- SANTOS, C., CORTELLETE, G.M., ARAUJO, K.C.B., SPACH, H.L., 2006. Estrutura populacional da raia-viola *Zapteryx brevirostris* (CHONDRICHTHYES, RHINOBATIDAE), na plataforma adjacente à baía de Paranaguá, PR. *Acta Biológica Leopondensia*, **28**, 32-37.



SHUTTLEWORTH, T.J., 1988. Salt and water balance - extrarenal mechanisms. *Physiology of Elasmobranch Fishes*, 171–199.

SMITH, C.P. & WRIGHT, P.A. 1999. Molecular characterization of an elasmobranch urea transporter. *American Journal of Physiology*, **276**, 622-626.

STOLTE H., GALASKE R.G., EISENBACH, G.M., LECHENE, C., SCHIDT-NIELSEN, B., BOYLAN, J.W. 1977. Renal tubule ion transport and collecting duct function in the elasmobranch little skate, *Raja erinacea*. *Journal of Experimental Zoology*, **199**, 403–410.

THORSON, T.B.; COWAN C.M.; WATSON, D.E., 1973. Body Fluid Solutes of Juveniles and Adults of the Euryhaline Bull Shark *Carcharhinus Leucas* from Freshwater and Saline Environments. *Physiological Zoology*, **46**, 29-42.

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

TRICAS, T.C. & NEW, J.G., 1998. Sensitivity and response dynamics of electrosensory primary afferent neurons to near threshold fields in the round stingray. *Journal of Comparative Physiology*, **182(A)**, 89–101.

VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGEZ; E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **122(C)**, 121-129.

WILSON, J.M., MORGAN. J.D., VOGL, A.W., RANDALL, D.J. 2002. Branchial mitochondria-rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132(A)**, 365–374.

YANCEY, P.H.; SOMERO, G.N., 1979. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochemical Journal*, **183**, 317–323.