

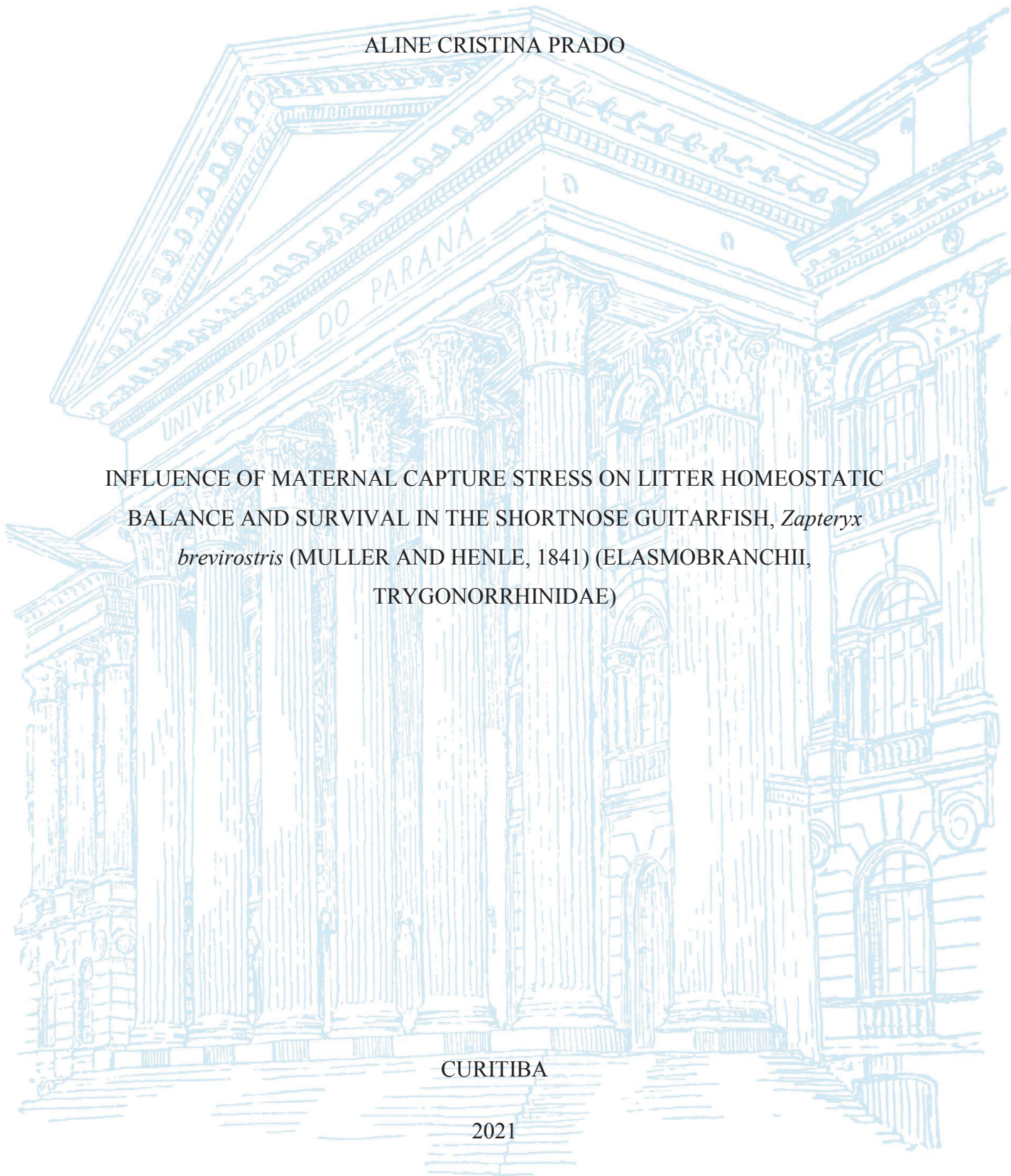
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE CRISTINA PRADO

INFLUENCE OF MATERNAL CAPTURE STRESS ON LITTER HOMEOSTATIC
BALANCE AND SURVIVAL IN THE SHORTRNOSE GUITARFISH, *Zapteryx*
brevirostris (MULLER AND HENLE, 1841) (ELASMOBRANCHII,
TRYGONORRHINIDAE)

CURITIBA

2021



ALINE CRISTINA PRADO

INFLUENCE OF MATERNAL CAPTURE STRESS ON LITTER HOMEOSTATIC
BALANCE AND SURVIVAL IN THE SHORTNOSE GUITARFISH, *Zapteryx*
brevirostris (MULLER AND HENLE, 1841) (ELASMOBRANCHII,
TRYGONORRHINIDAE)

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Zoologia, no Programa de Pós-Graduação
em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Carolina Arruda de
Oliveira Freire

Co-orientadora: Dr^ª Natascha Wosnick

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Prado, Aline Cristina

Influence of maternal capture stress on litter homeostatic balance and survival in the Shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Muller and Henle, 1841) (Elasmobranchii, Trygonorrhinidae). / Aline Cristina Prado. – Curitiba, 2021.

64 p.: il.

Orientador: Carolina Arruda de Oliveira Freire.

Coorientador: Natascha Wosnick.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Elasmobrânquios – Efeito do stress. 2. Reprodução animal. 3. Animais aquáticos – Fisiologia. I. Título. II. Freire, Carolina Arruda de Oliveira, 1966 -. III. Wosnick, Natascha. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (22. ed.) 597.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE CRISTINA PRADO** intitulada: **Influence of maternal capture stress on litter homeostatic balance and survival in the Shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Muller and Henle, 1841) (Elasmobranchii, Trygonorrhinidae)**, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica

12/03/2021 11:35:53.0

CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/03/2021 14:57:23.0

FABIO PRIOR CALTABELLOTTA

Avaliador Externo (OREGON STATE UNIVERSITY)

Assinatura Eletrônica

12/03/2021 11:40:03.0

CYNTIA AWRUCH

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF TASMANIA)

Avenida Cel Francisco H Santos, s/n - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1641 - E-mail: pgzoo@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 82351

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jspe> insira o código 82351

Dedico à minha família, pelo apoio e por acreditarem
no meu amor por tubarões e raias.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, por todo apoio, amor e carinho. Obrigada por sempre acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem na minha caminhada. Por aguentarem carro fedendo a tubarão e raia. Às minhas avós que sempre estão ali pra dar aquele abraço de vó. Aos meus tios por sempre me incentivarem. Às minhas cachorras que me recarregam e por me dedicarem tanto amor. Vocês são minha fortaleza e com certeza eu não seria metade de quem eu sou sem todos vocês na minha vida. Eu amo vocês mais que tudo!

Às minhas orientadoras e mentoras de vida e profissão, professora Carolina Freire e Natascha Wosnick. Obrigada por sempre me acolherem e me ajudarem a ser uma profissional e pessoa melhor. Obrigada pelas oportunidades, dedicação, conselhos e por sempre me incentivarem e tirarem o melhor de mim. Por acreditarem que sempre posso melhorar e ajudar esses animais que tanto amo. Obrigada por serem orientadoras amorosas, que no meio dessa loucura que foi fazer um mestrado em meio a uma pandemia, sempre me acalmaram, acolheram e mostraram que sempre há uma saída, uma nova ideia, algo novo a ser feito. Vocês são uma inspiração e tenho muito carinho e gratidão. É uma honra ser orientada por mulheres tão incríveis.

Aos colegas do LFCO, minha casa por 4 anos! Obrigada por terem me recebido bem e estarem dispostos a ajudar! Obrigada ao Leonardo e a Renata por sempre ajudarem no que precisei. Ao André por ter me dado ideias brilhantes de metodologias ao longo do projeto e por sempre ajudar também. À todos do LFCO, professora Viviane, Flávia, Nicole, Deivysson, pelas risadas, osmotherapy, exibições de doguinhos, gatinhos e porquinhos da Índia para acalmar o coração, dicas, conselhos e discussões sobre os trabalhos.

Obrigada as minhas amadas amigas e parceiras de trabalho do Grupo de Estudos de Elasmobrânquios do Paraná (GEEP). Agradeço por serem inspiração e serem profissionais incríveis, além de grandes amigas e seres humanos maravilhosos. À Natascha, que além de orientadora, também é uma amiga incrível e sempre acredita em nós. Obrigada à Renata, por ser uma amiga maravilhosa e sempre estar ali por mim. Por me ajudar com estatística, a carregar balde com água, soltar raias e por proporcionar momentos maravilhosos como pescar peixes venenosos, polvos e baiacus, uma hora os elasmos vem. Também pelos conselhos e risadas. À Érica, por todo amor, risadas,

conselhos e boa energia. Obrigada por viver esses momentos “poquito loco” rs e me acolher em fases difíceis, por me fazer rir e por ser essa amiga maravilhosa, tigresa rs. À Elo, por ser uma pessoa incrível, sempre ajudando nos campos e fazendo todos felizes com chocolates. A Aninha maravilhosa, amiga que o Maranhão me deu, saudades. Obrigada por me ajudarem a soltar as raias, levando rabada junto. Amo todas vocês!

Agradeço também a minha banca durante o mestrado, professor Luís Fernando Fávoro (Zão) e Claudia. As contribuições e conselhos de vocês com certeza foram super importantes para esse trabalho. Muito Obrigada!

Aos pescadores artesanais de Matinhos, meus queridos companheiros há 5 anos! Sem vocês esse trabalho não poderia ser feito. Obrigada por sempre me ajudarem, estarem interessados nos trabalhos e dispostos a ajudar na conservação. Obrigada especialmente ao Nato, Osmar, Dona Sandra, Luciano, Carol, Seu Daio, Seu Dio, Tego, Seu Ângelo, Israel, Dalgo e a todos que sempre me acolherem muito bem na colônia.

À PPGZoo, professores, funcionários e amigos, os quais compartilhei momentos maravilhosos! Obrigada especialmente à nossa ex (mas pra sempre) secretária Fabiane por sempre nos auxiliar e ser perfeita. Obrigada aos amigos pelos cafezinhos, conversas, risadas, cervejinhas para comemorar nossas conquistas. Agradeço em especial ao Henrique, Aline, Gabriel, Priscila, Camila, Claudia, Giovanna, Matheus e Larissa. Vocês são maravilhosos!

À Associação MarBrasil, Robin, Juliano e Lalá, pelo suporte logístico, ensinamentos e amizade. Muito obrigada!

Aos meus amigos William, Beatriz Assad, Beatriz Hirano, Rebekah, Yedda por estarem sempre comigo, alguns desde pequena. Obrigada por todo amor, risadas, conselhos e vivências. Desculpe se às vezes eu sumia, ou não podia sair, estava soltando raia rs. Amo vocês!

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa e à CAPES pelo financiamento dos trabalhos de campo.

Obrigada a todos pelo apoio, amor e por tornarem esse trabalho possível! Eu não conseguiria sem cada um de vocês! Muito obrigada!

The sea, once it casts its spell, holds one in its net of wonder forever.

Jacques Yves Cousteau

RESUMO

Elasmobrânquios têm sofrido severos declínios populacionais devido às ações antrópicas, sendo agravados por sua história de vida e características biológicas. Os efeitos sub-letais de ordem reprodutiva como resultado da captura incidental (i.e., aborto e nascimento prematuro) são mal compreendidos e negligenciados nos planos de gestão. Embora estes efeitos já tenham sido investigados para as mães, os impactos diretos na prole, como alterações fisiológicas e taxas de sobrevivência, permanecem desconhecidos. Assim, o presente estudo teve como objetivo compreender os impactos do estresse materno no equilíbrio homeostático e na sobrevivência da prole de *Zapteryx brevirostris*. Para isso, fêmeas prenhes capturadas incidentalmente (vivas e mortas) e suas respectivas proles foram amostradas e avaliadas quanto ao estresse (ureia, lactato e fósforo, oxigênio dissolvido) e condição energética (glicose, triglicerídeos e colesterol total). Gestantes vivas foram monitoradas por 48 horas. No caso de abortos e/ou partos prematuros, as mães e os embriões foram amostrados (biometria e sangue). Para as fêmeas que morreram sem expulsar a prole (retenção), foram coletados sangue e líquido uterino, bem como os embriões retidos. As fêmeas que sobreviveram após o monitoramento foram devolvidas à natureza. Os resultados demonstraram que o parto induzido por captura é altamente prejudicial ao recrutamento populacional. Os estágios iniciais e intermediários de desenvolvimento são críticos, com abortos (73%) e partos prematuros ocorrendo principalmente nesses estágios. O nascimento prematuro é raro para a espécie (12%). Embriões em estágio final de desenvolvimento são mais suscetíveis à retenção (14%) devido à mortalidade materna. A mortalidade da prole foi de 100%, incluindo embriões que nasceram prematuramente. Além disso, as alterações séricas maternas (aumento do lactato e fósforo) foram semelhantes para todas as condições (aborto, parto prematuro e retenção) e o estresse experimentado pelos embriões foi semelhante ao experimentado pelas mães. Quanto ao líquido uterino, foram detectadas alterações significativas para ureia, lactato e oxigênio dissolvido. Além disso, foi observado que a hipóxia uterina é o principal fator determinante na expulsão de embriões. Ademais, a base fisiológica do parto induzido pela captura parece não ser apenas de origem materna, mas também embrionária. Portanto, evitar que as fêmeas sejam capturadas durante a gravidez parece ser a única alternativa para garantir a sobrevivência materna e da prole.

Palavras-chave: Fisiologia da conservação, Estresse de captura, Reprodução, Elasmobrânquios.

ABSTRACT

Elasmobranchs are suffering severe population declines due to anthropogenic actions, being aggravated by their life history and biological traits. The sub-lethal effects of reproductive order as a result of incidental capture (e.g., abortion and premature birth) are poorly understood and neglected in management plans. Although the effects of birth induced by capture have already been investigated for the mothers, the direct impacts on litter, such as physiological alterations and survival rates, remain unknown. Thus, the present study aimed to understand the impacts of maternal stress on litter homeostatic balance and survival in *Zapteryx brevirostris*. For this, pregnant females caught as bycatch (both live and dead) and their respective litter were sampled and evaluated for both stress (urea, lactate and phosphorus, dissolved oxygen) and energetic condition (glucose, triglycerides, and total cholesterol). Live pregnant females were monitored for 48 hours. In the case of abortion and/or premature births, both mothers and embryos were sampled (i.e., biometrics and blood). For females that died without expelling the litter, blood and uterine liquid were collected, as well as the embryos retained. Females that survived after monitoring was returned to the wild. Our results demonstrated that capture-induced parturition is highly harmful to population recruitment. The early and intermediate stages of development are critical, with abortions (73%) and premature births occurring mainly in these stages. Premature birth is rare for the species (12%). Embryos in the final stages of development were more susceptible to retention (14%) due to maternal mortality. Litter mortality was 100%, including embryos that born prematurely. Moreover, maternal serum alterations (increased concentrations of serum lactate and phosphorus) were similar for all categories (abortion, premature birth, and retention) and the stress experienced by the embryos is similar to the stress experienced by the mothers. As for the uterine fluid, significant alterations were detected for urea, lactate and dissolved oxygen. Here we present evidence that uterine hypoxia is the main determining factor involved in the expulsion of embryos. Moreover, the physiological basis of capture-induced parturition appears to be not only of maternal origin, but also embryonic. Therefore, preventing females from being caught during pregnancy seems the only alternative to ensure both maternal and litter survival.

Keywords: Conservation Physiology, Capture stress, Reproduction, Elasmobranchs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime feminino de *Zapteryx brevirostris*. Foto: Renata D. Leite 24
- Figura 2.** Estágios de desenvolvimento embrionário de *Zapteryx brevirostris* observados durante os eventos de aborto, parto prematuro e retenção. A) Estágio 1. B) Estágio 2. C) Estágio 3, dois embriões. D) Estágio 4. E) Estágio 5. F) Estágio 6. G) Estágio 7. H) Estágio 8. I) Estágio 9. J) Estágio 10. Os embriões são representados por "emb", as brânquias externalizadas por "eg" e o saco vitelínico por "ys", todos indicados pelas setas brancas. Escala: 5cm, 3cm e 2cm. 33
- Figura 3.** Concentrações sorológicas de fêmeas grávidas de *Z. brevirostris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no soro de fêmeas que sofreram aborto (AB), parto prematuro (PB) ou morreram retendo os embriões (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). 35
- Figura 4.** Concentrações no líquido uterino de fêmeas grávidas de *Z. brevirostris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no líquido uterino de fêmeas que sofreram aborto (AB), parto prematuro (PB) ou morreram retendo os embriões (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). 36
- Figura 5.** Concentrações sorológicas dos embriões de *Z. brevirostris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no soro dos embriões abortados (AB), nascidos prematuramente (PB) e retidos (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas pelas letras minúsculas e por (*). 37
- Figura 6.** Comparação das concentrações sorológicas de ureia das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevirostris* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). 38

Figura 7. Comparação das concentrações sorológicas do lactato das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*). 39

Figura 8. Comparação das concentrações sorológicas do fósforo das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*). 40

Figura 9. Comparação das concentrações sorológicas de glicose das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*). 41

Figura 10. Comparação das concentrações sorológicas dos triglicérides das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*). 42

Figura 11. Comparação das concentrações sorológicas do colesterol total das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*). 43

Figura 12. Concentração de oxigênio dissolvido (mg/dL) na água do mar (grupo controle, n = 3; box cinza) e líquido uterino de fêmeas *Z. brevis* que retiveram (n = 2; box azul) e abortaram seus embriões (n = 1; box rosa). A diferença estatística está representada por (*). 44

LISTA DE SIGLAS

LU- Líquido uterino

AB – Aborto

PB – Parto prematuro

RT– Retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Subclasse Elasmobranchii	16
1.2	Importância ambiental, socioeconômica e ameaças	17
1.3	Planos de manejo e fisiologia como ferramenta para conservação	19
1.4	Fisiologia reprodutiva	20
1.5	Caracterização da espécie	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1	Obtenção dos animais	27
2.2	Monitoramento	27
2.3	Amostragem biológica	28
2.3.1	Fêmeas grávidas	28
2.3.2	Prole	28
2.3.3	Líquido uterino e avaliação de oxigênio dissolvido	29
2.4	Análises dos parâmetros fisiológicos	30
2.5	Análises estatísticas	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Estágios de desenvolvimento embrionário	31
3.2	Respostas fisiológicas maternas ao aborto, parto prematuro e retenção	34
3.3	Respostas fisiológicas do líquido uterino ao aborto, parto prematuro e retenção	35
3.4	Respostas fisiológicas da prole ao aborto, parto prematuro e retenção	36
3.5	Respostas fisiológicas das mães, líquido uterino e prole ao estresse em cada grupo	38
3.6	Concentração de oxigênio dissolvido no líquido uterino	43
4	DISCUSSÃO	44
4.1	Estágios de desenvolvimento embrionário e taxas de sobrevivência da prole	45
4.2	Respostas fisiológicas maternas ao aborto, parto prematuro e retenção	46
4.3	Respostas fisiológicas do líquido uterino ao aborto, parto prematuro e retenção	47

4.4 Respostas fisiológicas da prole ao aborto, parto prematuro e retenção.....	48
4.5 Impactos gerais do aborto, parto prematuro e retenção nas mães e suas proles.....	50
4.6 Impactos gerais do estresse materno devido à captura no líquido uterino	51
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Subclasse Elasmobranchii

A classe Chondrichthyes (peixes cartilagosos) é composta pelas subclasses Elasmobranchii (tubarões e raias) e Holocephali (quimeras) (Compagno et al., 2005). Com origem há 400 milhões de anos, elasmobrânquios são considerados uma das linhagens mais antigas entre os vertebrados, sendo protagonistas da irradiação atual (Heinicke et al., 2009; Weigmann, 2016). Possuem ampla distribuição e espécies altamente adaptadas aos ambientes aquáticos (Compagno et al., 2005; Dulvy et al., 2014). Apresentam aproximadamente 1250 espécies, distribuídas em 17 ordens e 52 famílias (Dulvy et al., 2014; Heinicke et al., 2009). Atualmente representam a subclasse com maior diversidade em relação às quimeras (Holocephali), além de possuírem maior escopo de estudos e conhecimentos biológicos, principalmente devido ao fácil acesso aos animais provindos da pesca e sua importância socioeconômica (Dulvy et al., 2017).

O sucesso evolutivo dos tubarões e raias é parcialmente devido à eficiência de suas adaptações reprodutivas. A modificação do aparelho reprodutor masculino em cláspers permitiu a fertilização interna sendo uma das adaptações mais significativas (Carrier et al., 2004; Conrath, 2005) quando comparados a outros peixes. Além disso, elasmobrânquios possuem uma variedade de modos reprodutivos complexos, sendo classificados quanto a variações no desenvolvimento embrionário e investimento nutricional (Carrier et al., 2004; Wourms e Demski, 1993). Os filhotes nascem totalmente desenvolvidos e idênticos aos pais (Carrier et al., 2004; Conrath, 2005). Segundo Carrier (2004), ao contornar um estágio larval, esses animais reduziram as perdas da prole por predação. Somado a isso, por já nascerem bem desenvolvidos em relação à teleostes, os filhotes de elasmobrânquios possuem uma maior capacidade de forrageamento (Carrier et al., 2004). Ademais, são considerados K estrategistas, apresentando baixa fecundidade, maturidade sexual tardia, crescimento lento, alta longevidade, baixa mortalidade natural, relação estreita entre o número de jovens produzidos e o tamanho da biomassa reprodutiva, e alto investimento materno (Carrier et al., 2004; Callard e Koob, 2012; Stevens, 2000).

1.2 Importância ambiental, socioeconômica e ameaças

Elasmobrânquios desempenham um papel fundamental nas teias tróficas e na manutenção e equilíbrio dos habitats onde estão inseridos (Cortés, 1999; Dulvy et al., 2017). Atuam não apenas na transferência de energia, mas também na predação espacial e temporal, competição de recursos e seleção natural, removendo animais doentes, fracos, senis, feridos ou mortos do meio ambiente, contribuindo para a saúde do ecossistema marinho (Camhi et al. 1998; Cortés, 1999; Dulvy et al., 2017; Heithaus et al. 2008; Navia et al. 2016; Stevens et al., 2000). A retirada desses predadores e mesopredadores das cadeias alimentares causa sérios impactos ambientais e socioeconômicos. O declínio dos principais predadores devido à pesca desenfreada pode desencadear um efeito cascata que afeta toda a cadeia. Na Baía de Chesapeake, que banha os estados da Virgínia e Maryland, nos EUA, observou-se que a redução de grandes tubarões causou uma superabundância de raias-ticonha (*Rhinoptera bonasus*). Consequentemente, a predação intensificada de suas presas, levou a uma redução drástica na colheita de bivalves economicamente importantes na região, sendo suficiente para extinguir a tradicional pesca de bivalves nessa baía. (Myers et al., 2007). Em contraste, a manutenção das populações de tubarões e raias gera benefícios ambientais e socioeconômicos significativos. Sabe-se que enquanto um tubarão ou raia vale ~ US \$ 50 morto (i.e., nadadeiras), os mesmos vivos valem ~ US \$ 73 por dia (Gallagher e Hammerschlag, 2011). Além disso, a observação desses animais por meio do ecoturismo gera mais de US \$ 314 milhões e 10.000 empregos por ano globalmente em toda a cadeia turística (i.e., observação, acomodação, alimentação) (Cisneros-Montemayor et al., 2013).

Apesar de sua grande importância ecológica como predadores de topo, elasmobrânquios também têm uma importância econômica, social e cultural significativa (Dulvy et al., 2017). Em países em desenvolvimento, tubarões e raias são uma importante fonte de proteína para comunidades tradicionais e com poucos recursos, contribuindo para sua segurança alimentar (Bornatowski et al., 2018; Dulvy et al., 2014, 2017; Moore et al., 2017). Além disso, a carne é apreciada pelo seu baixo valor comercial e pela ausência de espinho (~ US \$ 2,00 / kg) (Bornatowski et al., 2018). Ademais, a pesca desses animais se torna uma alternativa em tempos de escassez de teleósteos de valor comercial (Lessa et al., 2005).

Atualmente, elasmobrânquios estão entre os animais mais ameaçados do mundo, com 36% das espécies descritas categorizadas sob algum nível de ameaça (Dulvy et al., 2014; IUCN, 2021). Segundo estudos, algumas regiões já apresentam um declínio populacional de mais de 90% para algumas espécies (Dent e Clarke, 2015; Pacoureau et al., 2021). Os declínios são principalmente devido à captura direcionada e incidental em praticamente todos os tipos de pesca comercial (Dulvy et al., 2014; Stevens et al., 2000). A milenar demanda por nadadeiras pelo mercado asiático, aliada à crescente demanda por carne e subprodutos de tubarões e raias (i.e., óleo de fígado e brânquias), tem causado grande preocupação com a conservação desses animais (Barreto et al., 2017; Dent e Clarke, 2015; Dulvy et al., 2017). Globalmente, cerca de 100 milhões de tubarões são mortos anualmente (Worm et al., 2013). Só em 2000, 80% ou 908.000 toneladas de tubarões foram mortos e cruelmente descartados, principalmente para a remoção das nadadeiras para uso em sopas tradicionais em países asiáticos (*finning*) (Worm et al., 2013). Embora essa prática tenha sido proibida em vários países desde dos anos 2000 (Ferretti et al., 2020), a pesca e o comércio de carne de várias espécies são mal regulamentados, contribuindo para o comércio ilegal das nadadeiras e causando um grande impacto nas populações (Barreto et al., 2017; Dulvy et al., 2017). O cenário para as raias é ainda mais alarmante, uma vez que o impacto da pesca é desconhecido e negligenciado. O grupo também sofre com degradação de habitat, mudanças climáticas e poluição marinha (Alomar e Duedero, 2017; Bezerra et al., 2019; Di Santo et al., 2016c; Gervais et al., 2018; Johnson et al., 2016; Pistevos et al., 2015). Além disso, os declínios são potencializados pelas características biológicas e história de vida do grupo, resultando em baixa capacidade de recuperação populacional em abundância (Stevens et al., 2000).

No Brasil, o cenário da pesca de elasmobrânquios é preocupante e contribui fortemente para o cenário mundial. O país não possui programas oficiais de estatísticas pesqueiras há mais de 10 anos e atualmente se destaca como o 1º importador e 11º produtor de carne de tubarão (Barreto et al., 2017) e raias do mundo. Embora existam leis vigentes para o grupo, as quais proíbem a captura de espécies em risco de extinção (por exemplo, Portaria nº 445/2014), a fiscalização e o monitoramento são escassos (Barreto et al., 2017). A última atualização da legislação para o grupo foi em 2018, permitindo a utilização das espécies listadas na Portaria nº 445 desde que existam planos de recuperação que estabeleçam diretrizes para o uso sustentável (Portaria MMA nº 73/2018). Porém, além de 40% das 169 espécies existentes no território nacional já

estarem em algum nível de ameaça, 36% apresentam ausência de dados básicos (ICMBio, 2016). Além disso, atualmente não existem planos de recuperação para elasmobrânquios em vigência no país. Desta forma, é imperativo focar esforços e recursos em investigações que gerem subsídios para planos de manejo e recuperação, a fim de melhorar a gestão e ordenamento pesqueiro e, principalmente conservar a biodiversidade de raias e tubarões em todo o território nacional.

1.3 Planos de manejo e fisiologia como ferramenta para conservação

Apesar de sofrerem outras ameaças, atualmente o maior impacto para a conservação do grupo é a captura incidental, sendo os animais muitas vezes descartados ou consumidos por comunidades tradicionais (Dulvy et al., 2017). Além disso, muitos teleósteos de interesse comercial ocorrem simultaneamente em locais de importância econômica e cultural para o setor pesqueiro (Simpfendorfer e Dulvy, 2017). Assim, algumas das medidas adotadas (i.e., períodos de defeso) acabam gerando conflitos e distanciando ainda mais as comunidades tradicionais e a pesca de pequena escala das medidas de conservação (Simpfendorfer e Dulvy, 2017; Worm et al., 2017). Nesse sentido, modificações no aparato de pesca, tornando-o menos impactante e mais seletivo, instalação de dispositivos de fuga, soltura compensatória/boas práticas de manejo que reduzam a mortalidade de elasmobrânquios provindos do *bycatch*, aliados à viabilização de meios alternativos de subsistência, são estratégias com grande potencial para a conservação de espécies impactadas pela pesca comercial (Cisneros-Montemayor et al., 2013, Haas et al., 2017; Simpfendorfer e Dulvy, 2017; Tolotti et al., 2015).

A soltura compensatória (i.e., liberação imediata de animais independentemente de seu estado físico) tem sido adotada globalmente e vem se mostrando eficiente para pelo menos mitigar a pressão de extinção aplicada sobre a maioria das espécies dos elasmobrânquios. Alguns estudos demonstram que a taxa de sobrevivência pós-liberação para algumas espécies é extremamente alta (Braccini, 2012; Gallagher et al., 2014; Moyes et al., 2006). Além disso, sabe-se que cerca de 95% das espécies capturadas pela frota industrial ainda estão vivas quando trazidas a bordo, o que reforça que espécies acessórias e ameaçadas podem se beneficiar dessa prática (Moyes et al., 2006). Embora os efeitos diretos do estresse de captura já sejam relativamente bem estudados em tubarões (i.e., taxas de mortalidade e efeitos fisiológicos do estresse), pouca atenção vem sendo dada às raias, particularmente considerando os efeitos sub-letais da captura (i.e., parto induzido

pela captura, traumas físicos). Efeitos sub-letais são de especial preocupação visto que a médio e longo prazo podem afetar as populações, influenciando variáveis de aptidão como crescimento, processos reprodutivos e resposta imune (Skomal e Mandelman, 2012). Aliado a isso, existem desafios para o sucesso da soltura, dentre eles resposta espécie-específica, estado de saúde, ontogenia, história de vida, tempo de pesca, aparato utilizado e protocolos de manejo empregados (Poisson et al., 2014; Skomal e Mandelman, 2012). Neste contexto, estudos de fisiologia do estresse se tornam imperativos para verificar como o estresse de captura afeta estes animais a nível bioquímico. Somado a isso, geram subsídios para os planos de manejo, uma vez que auxiliam no entendimento de quais protocolos devem ser seguidos para que haja uma boa recuperação pós-soltura, garantindo altas taxas de sobrevivência e redução dos efeitos sub-letais (Hoffmayer et al., 2015).

1.4 Fisiologia reprodutiva

Apesar dos inúmeros estudos sobre os aspectos básicos da biologia reprodutiva de elasmobrânquios, pouco se sabe sobre a fisiologia reprodutiva desses animais (Awruch, 2013). Os poucos estudos disponíveis são restritos a alguns grupos de pesquisa e possuem enfoque endocrinológico, principalmente quanto ao controle hormonal e ciclo estral dos adultos (Awruch et al., 2008; Demski, 1989; Henningsen et al., 2008; Hoffmayer et al., 2010; Fujinami e Semba, 2020; Sulikowski, Tsang e Howell, 2004; Tricas et al., 2000). Alguns estudos de cunho fisiológico, abrangem outros aspectos relacionados a reprodução, como estresse de captura (Guida et al., 2017; Manire et al., 2007; Prado, 2018; Wosnick et al., 2019a), abortos (Wosnick et al., 2019a), mudanças climáticas (Di Santo et al., 2016a, 2016b; Elisio et al., 2019), toxicologia (Gelsleichter et al., 2006; Martins et al., 2020) e estratégias nutricionais (Rangel et al., 2020a). Além disso, dada a óbvia dificuldade de manutenção desses animais em laboratório e pouco interesse econômico em comparação aos teleósteos, muitos estudos ficam limitados a espécies bentônicas e de pequeno porte (Awruch, 2013; Didier et al., 2012). Ademais, devido ao tamanho reduzido e a vulnerabilidade nos primeiros estágios de vida, poucos estudos fisiológicos são voltados ao desenvolvimento embrionário e à prole ou, quando realizados, são focados em espécies ovíparas (Di Santo, 2016a, 2016b; Kormanik, 1993; Lyons e Wynne-Edwards, 2018; Rosa et al., 2014).

Em temas reprodutivos, efeitos sub-letais do estresse causado pela captura tem sido uma preocupação. Mesmo que o animal sobreviva e seja solto, efeitos deletérios a longo prazo podem comprometer não só a saúde do animal, como a sua reprodução e *fitness* (Skomal, 2007; Skomal e Mandelman, 2012). Apesar de alarmante, os estudos relacionados a como o estresse de captura afeta a reprodução ainda são negligenciados e escassos, tanto na academia, quanto nos planos de manejo (Adams et al., 2018, Guida et al., 2017; Wilson et al., 2014). Um dos efeitos sub-letais preocupantes é o parto induzido pela captura. Esse evento é caracterizado pela expulsão prematura de ovos ou embriões devido estresse fisiológico e traumas físicos sofridos pela mãe durante a interação com aparatos de pesca (Adams et al., 2018). O parto induzido pela captura não é novidade e é comumente reportado para o grupo em estudos de reprodução (i.e., Adams et al., 2018; Charvet-Almeida et al., 2005; Rincon e Vooren, 2007; Rolim et al., 2015; Schluessel et al., 2015; Zagaglia et al., 2010). No entanto, pouco se sabe a respeito dos processos envolvidos no fenômeno e suas implicações na reprodução e recrutamento populacional.

Recentemente, Adams et al. (2018) demonstraram que cerca de 12% a 18% das espécies de elasmobrânquios sofrem partos induzidos pela captura. Os autores discutem que os eventos podem ser classificados em duas categorias: **partos prematuros**, caracterizados pela expulsão de embriões prematuros vivos, podendo apresentar aptidão reduzida devido à falta de desenvolvimento; e **abortos**, caracterizados pela interrupção da gravidez através da expulsão de embriões mortos, antes mesmo que os mesmos estejam aptos a sobreviver (Adams et al., 2018). No entanto, como não há estimativas de mortalidade para a prole pós-nascimento, os autores sugerem seguir o princípio da precaução, onde todos os eventos de parto induzidos por captura devem ser tratados como abortos, presumindo que toda prole irá sucumbir à morte.

Wosnick et al., 2018 demonstraram que *Zapteryx brevirostris* grávidas que abortam apresentam alterações na macromorfologia do útero, indicando que o processo pode causar infertilidade. Em seguida, Wosnick et al., 2019a observaram que grávidas de *Z. brevirostris* exibem altas taxas de aborto com subsequente mortalidade materna (60%). Aliado a isso, foram observadas alterações significativas em alguns marcadores fisiológicos de estresse (i.e., pH, lactato, fósforo, potássio) entre as fêmeas grávidas que abortaram e morreram e as que sobreviveram, indicando que a sobrecarga alostática irreversível leva à mortalidade. Posteriormente, Rangel et al. (2020b) demonstraram que em *Potamotrygon amandae* todas as fêmeas prenhes sofrem partos induzidos quando

capturadas. De acordo com os autores, o fenômeno é influenciado por características reprodutivas, como tamanho da ninhada e estágio da gestação, sendo mais acentuado em fêmeas com ninhadas maiores e em estágios finais de desenvolvimento embrionário. Apesar de trazerem informações valiosas sobre os partos induzidos pela captura, estudos prévios não avaliaram o perfil fisiológico e a sobrevivência com foco na prole, existindo uma lacuna no conhecimento referente aos efeitos do fenômeno nos filhotes.

Visto que a gravidez é um desafio do ponto de vista do sistema imunológico materno, algumas adaptações são necessárias para garantir a gestação e evitar que o feto seja tratado como um corpo estranho a ser eliminado. Durante a gestação de espécies vivíparas lecitotróficas, os embriões, de forma geral, são envoltos pela cápsula ovígera (Hamlet et al., 1998; Wourms, 1994). Essa delicada cápsula é uma matriz extracelular de origem materna, provavelmente impermeável a passagem de grandes moléculas, como antígenos e anticorpos, funcionando como barreira imunológica (Wourms, 1994). Além disso, o útero dessas espécies sofre diversas modificações para acomodar e manter a prole. O desenvolvimento de cristas e vilosidades da parede uterina e do oviduto, a presença de um epitélio escamoso, o aumento na vascularização e redução na espessura do tecido uterino, melhorando as trocas gasosas, são algumas das modificações observadas em algumas espécies vivíparas (Braccini et al., 2007; Buddle et al., 2020; Hamlet et al., 1998; Hamlett e Hysell, 1998; Paiva et al., 2012; Tomita, Cotton e Toda, 2016). Essas especializações garantem que o útero forneça grandes quantidades de oxigênio e estabilidade osmo-iônica, a fim de manter a homeostase da prole durante a gestação (Hamlet et al., 1998).

Outra especialização para garantir o equilíbrio homeostático e manutenção da gestação é a produção de líquido uterino (LU), secretado pela parede uterina. Fisiologicamente, as concentrações iônicas do LU são semelhantes ao plasma materno nos estágios iniciais e à água do mar nos estágios finais (Ellis e Otway, 2011; Kormanik, 1993). Em alguns tubarões e raias vivíparos lecitotróficos, verificou-se que nos primeiros estágios da gestação, os embriões são circundados pela cápsula ovígera e banhados neste fluido intracapsular. Nos estágios finais, a cápsula se rompe e os embriões se desenvolvem livremente no útero, banhados pela água do mar, que funciona como um novo LU. Este novo ambiente uterino é criado pelas mães por meio da lavagem uterina, que consiste em trocas periódicas do LU com água do mar (Burger; 1967; Buddle et al., 2020; Ellis e Otway, 2011; Kormanik, 1993; Tomita, Cotton e Toda, 2016). A finalidade

da lavagem uterina, a frequência e em que espécies ocorre ainda não foram demonstradas. No entanto, acredita-se que esse processo ocorra em outras espécies lecitotróficas, atuando na remoção de resíduos e permitindo que os embriões acessem oxigênio e moléculas inorgânicas da água do mar (Buddle et al., 2020; Ellis e Otway, 2011; Tomita, Cotton e Toda 2016). Desta forma, embora pouco estudado, o LU possui papel fundamental na respiração, hidratação, osmorregulação e excreção embrionária, mantendo um ambiente uterino ideal ao desenvolvimento dos fetos (Buddle et al., 2020; Kormanik, 1993). No entanto, os poucos estudos disponíveis têm focado na composição e concentração bioquímica do LU e em investigações sobre a osmorregulação pré-natal (Price e Daiber 1967; Evans et al. 1982; Kormanik 1988, 1992, 1993; Buddle et al., 2020; Ellis e Otway, 2011). Além disso, algumas hipóteses em relação ao parto induzido pela captura sugerem que a falta de oxigênio no LU desencadearia o processo de expulsão dos embriões (Rincon e Vooren, 2007). Assim, avaliar o LU em estudos de estresse pré-natal e expulsão da prole devido a captura pode trazer informações valiosas sobre a manutenção homeostática da prole durante o estresse sofrido pelas mães.

1.5 Caracterização da espécie

As raias-violas pertencem à ordem Rhinoprístiformes, composta pelas famílias Rhinidae (3 gêneros, 10 espécies); Rhinobatidae (3 gêneros, 31 espécies) Glaucostegidae (único gênero, 6 espécies) e Trygonorrhinidae (3 gêneros, 8 espécies) (Last et al., 2016). Atualmente, o grupo é considerado extremamente vulnerável, apresentando alto risco de extinção (Dulvy et al., 2014; Last et al., 2016; Moore, 2017). Isso porque, além de sofrerem com a dificuldade de identificação, distribuição restrita, pressão de pesca direcionada e incidental, também recebem pouca atenção de pesquisadores e agências financiadoras (Moore, 2017).

No Brasil, são descritas quatro espécies: a raia-viola-brasileira (*Pseudobatos horkelli*; família Rhinobatidae), a raia-viola-chola (*P. percellens*; Rhinobatidae), a raia-viola-do-atlântico (*P. lentiginosus*; Rhinobatidae), e a raia-viola-do-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*; família Trygonorrhinidae) (ICMBio, 2016; Last et al., 2016). *Zapteryx brevirostris* (Muller e Henle, 1841) é uma raia endêmica da costa Sul Americana, com distribuição limitada ao sudeste do Atlântico Sul, ocorrendo do leste do Brasil até o nordeste da Argentina (Figueiredo, 1977). É a única raia do gênero *Zapteryx* com ocorrência no Oceano Atlântico (Batista, 1991). Sua principal característica é o

corpo em forma de bandolim ou viola, caracterizado pela presença de um focinho obtuso e de um disco mais largo do que o resto do corpo. A coloração varia, com o dorso sendo geralmente entre o verde-oliva e o marrom, e o ventre variando entre o bege, cinza ou amarelo (Fishbase, 2020). Podem apresentar manchas marrons pelo corpo, principalmente quando filhotes. É uma raia de pequeno porte, atingindo comprimento total de até 59 cm em machos e 65 cm em fêmeas (Colonello et al., 2011), e com peso máximo registrado de 1,9 kg (Figura 1).



Figura 1. Espécime feminino de *Zapteryx brevirostris*. Foto: Renata D. Leite

A maturidade sexual é tardia, levando em média de seis a nove anos para ser atingida entre 42 e 43 cm de comprimento total (Batista, 1991; Caltabellotta et al., 2019; Carmo et al., 2018; D 'Alberto et al., 2019; Santos et al., 2006). São vivíparas lecitotróficas, com ninhadas de em média seis embriões por gestação, sendo o ciclo reprodutivo bianual (Batista 1991; Abilhoa et al., 2007). No Paraná, a cópula ocorre durante o inverno (junho-agosto), o desenvolvimento embrionário na primavera (setembro-novembro) e o parto no verão (dezembro-fevereiro) (Batista, 1991; Abilhoa et al., 2007). A espécie apresenta algumas estratégias sociais durante o período reprodutivo, como a formação de grupos, segregação sexual e ontogênica, e uso de poças de maré para o parto (Santos et al., 2006; Springer, 1967; Wosnick et al., 2019b). São carnívoras, com

a dieta bastante diversificada, mas composta principalmente por crustáceos decápodes, poliquetas, pequenos peixes, cefalópodes e sipunculídeos (Barbini et al., 2011; Bornatowski et al., 2005; Marion et al., 2011). Possui grande relevância ecológica, não só pelo seu papel como bioturbadora, mas também por ser considerada uma espécie-chave na estrutura topológica das redes tróficas do Sul do Brasil (Bornatowski et al., 2014b).

Atualmente a espécie está classificada como “Em Perigo” na lista vermelha da International Union for the Conservation of Nature (IUCN) e “Vulnerável” pelo ICMBio, e vem apresentando declínios populacionais alarmantes no Brasil, Argentina e Uruguai. Somente no Rio Grande do Sul, foi observado um declínio de 95% da CPUE (captura por unidade de esforço) em kg/h, entre 1983 e 2005, sendo o Brasil considerado um sumidouro para a espécie (ICMBio, 2016). Diante disso, acredita-se que os declínios no país sejam atualmente maiores e o risco de extinção precise ser atualizado, visto que a última avaliação nacional da espécie foi em 2011 pelo ICMBio (Vooren et al., 2006). Apesar de proibida a captura e comercialização pela Portaria nº 445, a espécie sofre pressão pesqueira pois faz parte do *bycatch* da pesca artesanal. É comumente capturada em uma gama de artes de pesca, principalmente com redes de fundeio na pesca direcionada à teleósteos de alta importância comercial, como o linguado (*Paralichthys* spp.) e pescadas (*Cynoscion* spp.) (Costa e Chaves, 2006; Chaves et al., 2019). Mesmo com baixo valor comercial, a espécie é vendida em alguns locais como filé de cação ou então consumida por membros das comunidades de pesca. Ainda, em alguns locais ou situações (i.e., quando o volume de captura de peixes com maior valor comercial é alto), a espécie é descartada ainda com vida em caçambas de lixo (Wosnick et al., 2019a).

A espécie é considerada um bom modelo de estudo, visto que pode ser adquirida nas comunidades pesqueiras artesanais, é facilmente mantida em laboratório e apresenta altas taxas de sobrevivência frente à captura e manejo (Prado, 2018; Takatsuka et al., 2019; Wosnick e Freire, 2013; Wosnick et al., 2019a). No entanto, durante o período reprodutivo, tanto as fêmeas quanto os machos se tornam extremamente vulneráveis à captura, com altas taxas de mortalidade (60% para fêmeas e 68% para machos) e efeitos sub-letais de ordem reprodutiva sendo observados (i.e., abortos e possíveis alterações na qualidade espermática, como diminuição da osmolalidade seminal) (Prado, 2018; Prado *em revisão*; Wosnick et al., 2019a). A vulnerabilidade da espécie neste período é alarmante, pois entre todos os Rhinopristiformes, *Z. brevirostris* é a raia-viola que atinge a maturidade sexual mais tardiamente (em média seis a nove anos) e tem menor

produtividade anual ($b=0,5$ inferior e $4,0$ superior) em comparação a espécies com produção reprodutiva anual semelhante. Além disso, demonstra baixo potencial de recuperação populacional ($r_{max} \sim 0,2$) (Colonello et al., 2011; D'Alberto et al., 2019).

Desta forma, visto que os adultos são relativamente bem estudados em relação aos aspectos reprodutivos e fisiológicos (Abilhoa et al., 2007; Batista, 1991; Colonello et al., 2011; Prado, 2018; Takatsuka et al., 2019; Wosnick e Freire, 2013; Wosnick et al., 2018; Wosnick et al., 2019a) estudos focados em avaliar como o estresse de captura materno afeta as proles nascidas prematuramente ou abortadas são necessários e fornecem informações mais robustas sobre a vulnerabilidade da espécie durante o período reprodutivo. Aliado a isso, compreender os mecanismos envolvidos na fisiologia do parto induzido pela captura, fornece subsídios para protocolos que possam ser inseridos nos planos de recuperação da espécie, objetivando reduzir esses eventos deletérios, a fim de garantir o recrutamento. Ademais, o incremento de novas informações sobre o parto induzido pela captura traz *insights* e informações importantes que podem beneficiar estudos futuros com outras espécies que apresentam a mesma estratégia reprodutiva (Adams et al., 2019; D'Alberto et al., 2019).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de parto induzido pela captura, a fim de entender quais os impactos do estresse materno na manutenção homeostática da prole desta raia endêmica e em risco de extinção. Para isso algumas hipóteses publicadas anteriormente foram consideradas. 1) no caso de *Zapteryx brevirostris*, o parto induzido por captura é uma estratégia de auto-sacrifício ou autopreservação? 2) O estresse fisiológico vivenciado pela prole é semelhante ao vivido por suas mães? 3) O líquido uterino protege os embriões da sobrecarga alostática materna experimentada durante o estresse? 4) O parto induzido por captura está relacionado à hipóxia uterina? Para responder a essas questões, marcadores fisiológicos secundários de estresse e de condição energética foram avaliados no soro de fêmeas grávidas, no líquido uterino e no soro dos embriões. Os resultados fornecerão subsídios para melhorar a compreensão desse fenômeno e também para determinar quais os melhores protocolos para reduzir as taxas de mortalidade da prole, os quais podem ser adotados em planos de manejo, atendendo aos objetivos do Plano Brasileiro de Conservação de Elasmobrânquios Marinhos Ameaçados de Extinção (PAN-Tubarões).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos animais

Quarenta e nove fêmeas prenhes vivas de *Zapteryx brevirostris* (média \pm DP; comprimento total $47,2 \pm 2,1$ cm; largura do disco $23,8 \pm 1,2$ cm; peso corporal $739,5 \pm 145,7$ g) foram obtidas junto aos pescadores artesanais do litoral do Paraná durante os meses reprodutivos da espécie na região (primavera austral e início do verão - setembro a dezembro). Os animais foram capturados incidentalmente em pescarias direcionadas ao linguado (*Paralichthys* spp.), utilizando redes de fundo (fundeio - malha de 16 a 22 cm entre nós opostos). Nenhum animal foi deliberadamente removido da natureza pelos autores. A gestação foi diagnosticada pela presença de hematomas na cloaca e distensão do abdômen, seguido de confirmação ultrassonográfica quando necessário (CUS-3000, Shenzhen Carewell Electronics Co., Ltd).

2.2 Monitoramento

As fêmeas grávidas desembarcadas foram colocadas imediatamente em caixas plásticas sem água e transportadas por aproximadamente uma hora até a Associação MarBrasil para monitoramento. O transporte seguiu o protocolo previamente estabelecido para a espécie considerando as taxas de mortalidade em estudos anteriores (Wosnick et al., 2019a). Posteriormente, as fêmeas foram aclimatadas lentamente em sistema de circulação semiaberto, com temperatura e salinidade da água sendo monitoradas constantemente. Este protocolo visou reduzir a contaminação por amônia das caixas de monitoramento permanente. Após uma hora, as fêmeas foram transferidas e mantidas individualmente em caixas plásticas de 60L, contendo 25L de água do mar (33 psu e 25°C), com aeração constante durante todo o período de monitoramento. A qualidade da água foi mantida por meio de filtração biológica adicionando 1 ml de biofilme (Stability, Seachem) em cada caixa. O protocolo de monitoramento seguiu Wosnick et al. (2019a) e foi realizado por 48 horas. A qualidade da água e a condição das fêmeas foram verificadas a cada hora. Na presença de embriões expelidos, muco e fezes das fêmeas, bem como alterações na salinidade, temperatura e concentração de compostos nitrogenados, as caixas eram prontamente limpas e a água renovada parcialmente. A salinidade foi mensurada por meio de Refratômetro (Modelo RTS-101ATC, Instrutherm, Brasil). A temperatura foi aferida com termômetro próprio para aquário (modelo 186166/17, 1°C,

cód.5021, Incoterm) e as concentrações de amônia tóxica foram medidas através de kit comercial para água do mar (LabconTest). Quando a amônia apresentou concentrações acima do ideal, foi realizada a troca parcial de água (~ 50%), seguida pela adição de 12 gotas de removedor de amônia (Prime, Seachem). Esta investigação foi aprovada pelo Ministério do Meio Ambiente (IBAMA / ICMBio-SISBIO nº 70981-1) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPR nº 776/2014).

2.3 Amostragem biológica

2.3.1 Fêmeas grávidas

Na presença de aborto (**AB**) ou parto prematuro (**PB**), as fêmeas foram imediatamente submetidas à biometria (comprimento total - CT em cm; largura de disco - LD em cm; peso corporal em g). Amostras de sangue (~ 1mL) foram coletadas por punção caudal. As amostras foram centrifugadas (2.100 rpm) à temperatura ambiente (23°C) por 5 minutos e o soro foi mantido a -20°C para análise no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO/UFPR). As fêmeas que sobreviveram após abortos ou partos prematuros foram devolvidas às caixas de monitoramento, uma vez que ambos os eventos ocorrem de forma consecutiva na espécie. Ao final do período de monitoramento, as fêmeas sobreviventes foram devolvidas à natureza em protocolo previamente estabelecido para a espécie (Wosnick et al., 2019a). Fêmeas que morreram após abortos consecutivos ou partos prematuros também foram amostradas (biometria e coleta de sangue) e, posteriormente, submetidas a necropsia para coleta de líquido uterino e de embriões remanescentes (quando presentes). Como algumas fêmeas morreram sem expulsar seus embriões, uma terceira categoria foi estabelecida e classificada como retenção (**RT**).

2.3.2 Prole

Para entender em que estágios de desenvolvimento e com que frequência cada evento (ou seja, aborto, nascimento prematuro e retenção) ocorria, bem como para determinar os períodos mais críticos da gestação para a prole, todos os embriões foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento. A classificação foi baseada em Pasquino & Gadig (2018) e considerou: comprimento total, exposição branquial, cor da pele, características morfológicas externas e peso/comprimento do vitelo.

Os embriões foram sexados, fotografados e pesados com e sem vitelo (para obtenção do peso real) em balança de precisão (Modelo KN-500 Z, Digimes). Os embriões que nasceram prematuramente (vivos) foram mantidos separadamente em caixas plásticas de 5L com ~ 2L de água do mar (estágios iniciais) ou em caixas plásticas de 60L com 10L de água (estágios intermediários) e aeração constante. O monitoramento durou o período suportado pelos embriões fora do útero. Os embriões que acabaram morrendo foram congelados a -20°C para análise posterior. Amostras de sangue desses embriões abortados, nascidos prematuramente e retidos (~ 50 μL) foram coletados por incisão pericárdica com posterior aspiração com micropipeta monocanal de 100 μL (modelo Pipetman® G, Gilson). A coleta de sangue nos embriões foi realizada apenas em embriões mortos dada a invasividade e letalidade do método. As amostras foram centrifugadas (2.100 rpm) à temperatura ambiente (23°C) por 5 minutos e o soro congelado a -20°C para análise no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO/UFPR). Devido ao pequeno tamanho de alguns embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, não foi possível realizar a coleta de sangue, impossibilitando o acesso às alterações fisiológicas nesses estágios. Assim, apenas embriões em estágios intermediários e finais de desenvolvimento foram amostrados e analisados.

2.3.3 Líquido uterino e avaliação de oxigênio dissolvido

O líquido uterino das fêmeas que morreram durante o monitoramento (aborto e retenção) foi coletado. O procedimento não foi realizado em fêmeas vivas devido à invasividade do método. A extração seguiu o protocolo utilizado por Ellis e Otway (2011), caracterizado pela inserção de uma agulha (18G) na abertura da cápsula ovígera e aspiração do líquido intracapsular. Imediatamente após a coleta, 5 ml do LU foram rapidamente transferidos para um microtubo adaptado para evitar o contato com o ar. Como o LU é semelhante à composição da água do mar em estágios intermediários/finais (Kormanik, 1993), para avaliar a concentração de oxigênio dissolvido, as amostras coletadas das fêmeas foram analisadas por meio de um kit comercial (LabconTest, Alcon), sempre utilizando uma amostra da água do mar como controle. Não foi possível analisar a concentração de O_2 dissolvido no LU de fêmeas que tiveram parto prematuro devido à quantidade insuficiente de amostra para realização do teste (5 ml). Cerca de 2ml do LU resmanescente foram armazenados e mantidos congelados a -20°C para análise

dos marcadores fisiológicos no Laboratório de Fisiologia Comparada da Osmorregulação (LFCO/UFPR).

2.4 Análises dos parâmetros fisiológicos

As concentrações de ureia, lactato, fósforo, glicose, triglicerídeos e colesterol total foram determinadas colorimetricamente (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) usando kits comerciais (Labtest, Brasil). Esses ensaios tiveram como objetivo verificar a influência das alterações fisiológicas maternas na prole e avaliar as possíveis alterações na composição e integridade do líquido uterino durante o parto induzido pela captura e retenção dos filhotes. As concentrações sorológicas de ureia (Ref. 27; comprimento de onda 600 nm) de fêmeas prenhes, líquido uterino e embriões foram determinadas em amostras diluídas em água ultrapura (1:50). O lactato circulante (Ref. 131/50; comprimento de onda 550 nm) de fêmeas prenhes, líquido uterino e embriões foi determinado em amostras diluídas em solução de NaCl 85% (150 mmol / L) (1:10). As concentrações de fósforo (Ref. 42; comprimento de onda 650 nm) de fêmeas prenhes e do líquido uterino foram determinadas em amostras não diluídas. Para os embriões, foi utilizada uma diluição de 1:10 em água ultrapura. As concentrações de glicose, triglicerídeos e colesterol total circulantes (Ref. 133 - comprimento de onda 505 nm; Ref. 87 - comprimento de onda 505 nm; Ref. 76 - comprimento de onda 500 nm, respectivamente) foram determinadas em amostras não diluídas de fêmeas prenhes e líquido uterino. Para os embriões, foi utilizada diluição de 1:10 em água ultrapura para glicose e colesterol total. Para triglicerídeos, as concentrações dos embriões foram determinadas em amostras não diluídas.

2.5 Análises estatísticas

Visto que os eventos de aborto, parto prematuro e retenção são fundamentalmente diferentes, inicialmente foi avaliado se havia diferença estatística entre os parâmetros fisiológicos (ureia, lactato, fósforo, glicose, triglicerídeos e colesterol total), individualmente para as mães, líquido uterino e, por fim, nos embriões nas três categorias observadas (AB, PB e RT). Posteriormente, a fim de avaliar e comparar se havia diferença nas respostas fisiológicas entre as mães, líquido uterino e embriões, todos foram testados juntos para cada categoria (AB, PB e RT).

Os dados foram tratados por transformação logarítmica ($\log 10$) ou, quando necessário, por meio de raiz quadrada. Posteriormente, a normalidade e homogeneidade foram verificadas com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Foi utilizada One way ANOVA com *post hoc* de Tukey para verificar diferenças entre os grupos. Quando necessário, o teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn foi aplicado para os dados não paramétricos.

O teste-t de Student foi aplicado para avaliar as alterações nas concentrações de oxigênio dissolvido no líquido uterino, utilizando sempre a água do mar como grupo controle. Todos os testes foram realizados com limite de significância de 0,05, utilizando o software Sigma Plot® versão 11.0 (Systat Software, Inc - USA). Os gráficos foram gerados no software RStudio Team (2020) usando o pacote ggplot2.

3 RESULTADOS

3.1 Estágios de desenvolvimento embrionário

No total, dez estágios de desenvolvimento embrionário foram observados durante os eventos de abortos, partos prematuros e retenção (Figura 2) sendo classificados da seguinte forma:

Estágios iniciais

Estágio 1 - Ovo fertilizado, com a cápsula ovígera totalmente formada. Embriões milimétricos, indiferenciados e frágeis. Visíveis dentro da cápsula ovígera com a presença de grandes porções de vitelo (Figura 2A).

Estágio 2 - Embriões de até 4 cm de comprimento total, com nadadeiras peitorais pouco desenvolvidas, corpo translúcido, pigmentação cutânea rosada e derme gelatinosa, brânquias expostas e altamente vascularizadas, saco vitelínico íntegro e com grandes porções de vitelo (Figura 2B).

Estágio 3 - Embriões com aproximadamente 7 cm de comprimento total, com nadadeiras peitorais bem desenvolvidas, pigmentação cutânea rosada, derme menos gelatinosa, brânquias ainda expostas e considerável quantidade de vitelo (Figura 2C).

Estágios intermediários

Estágio 4 - Embriões com aproximadamente 10 cm de comprimento total, corpo idêntico ao do adulto, brânquias internalizadas, corpo menos translúcido, mas ainda é possível observar a vascularização, pigmentação cutânea amarronzada com manchas marrons claras e saco vitelínico reduzido (Figura 2D).

Estágio 5 - Embriões com aproximadamente 12 cm de comprimento total, formato do corpo idêntico ao adulto, brânquias internalizadas, corpo menos translúcido, mas ainda é possível observar a vascularização, pigmentação cutânea amarronzada com manchas marrons claras mais evidentes, presença de espinhos na linha dorsal e saco vitelínico reduzido (Figura 2E).

Estágio 6 - Embriões com aproximadamente 12 cm de comprimento total. Corpo idêntico ao do adulto, brânquias internalizadas, derme um pouco mais rígida e não translúcida, coloração marrom com manchas marrons claras evidentes. Presença de espinhos na linha dorsal. Neste estágio já é possível identificar o sexo. O saco vitelínico é reduzido, com cerca de 3,5 g de vitelo (Figura 2F).

Estágios finais

Estágio 7 - Embriões com aproximadamente 12 cm de comprimento total. Formato do corpo idêntico ao do adulto, brânquias internalizadas, a derme é um pouco mais rígida que a fase anterior e já é possível identificar o sexo. O saco vitelínico é reduzido, com cerca de 2,5 g de vitelo (Figura 2G).

Estágio 8- Embriões com aproximadamente 13-14 cm de comprimento total. Idênticos aos adultos, a derme é um pouco mais rígida que na fase anterior e é possível sentir os dentículos dérmicos. Observa-se discreto dimorfismo sexual na forma corporal. O saco vitelínico é reduzido, com cerca de 1,5-2 g de vitelo (Figura 2H).

Estágio 9- Mesmas características da fase anterior, no entanto, o saco vitelínico está quase totalmente absorvido com ≤ 1 g de vitelo ainda externalizado (Figura 1I).

Estágio 10 - Embriões a termo, apresentando comprimento total entre 13 a 14cm, derme com coloração marrom com manchas acastanhadas menos marcadas e total absorção do vitelo (Figura 2J).

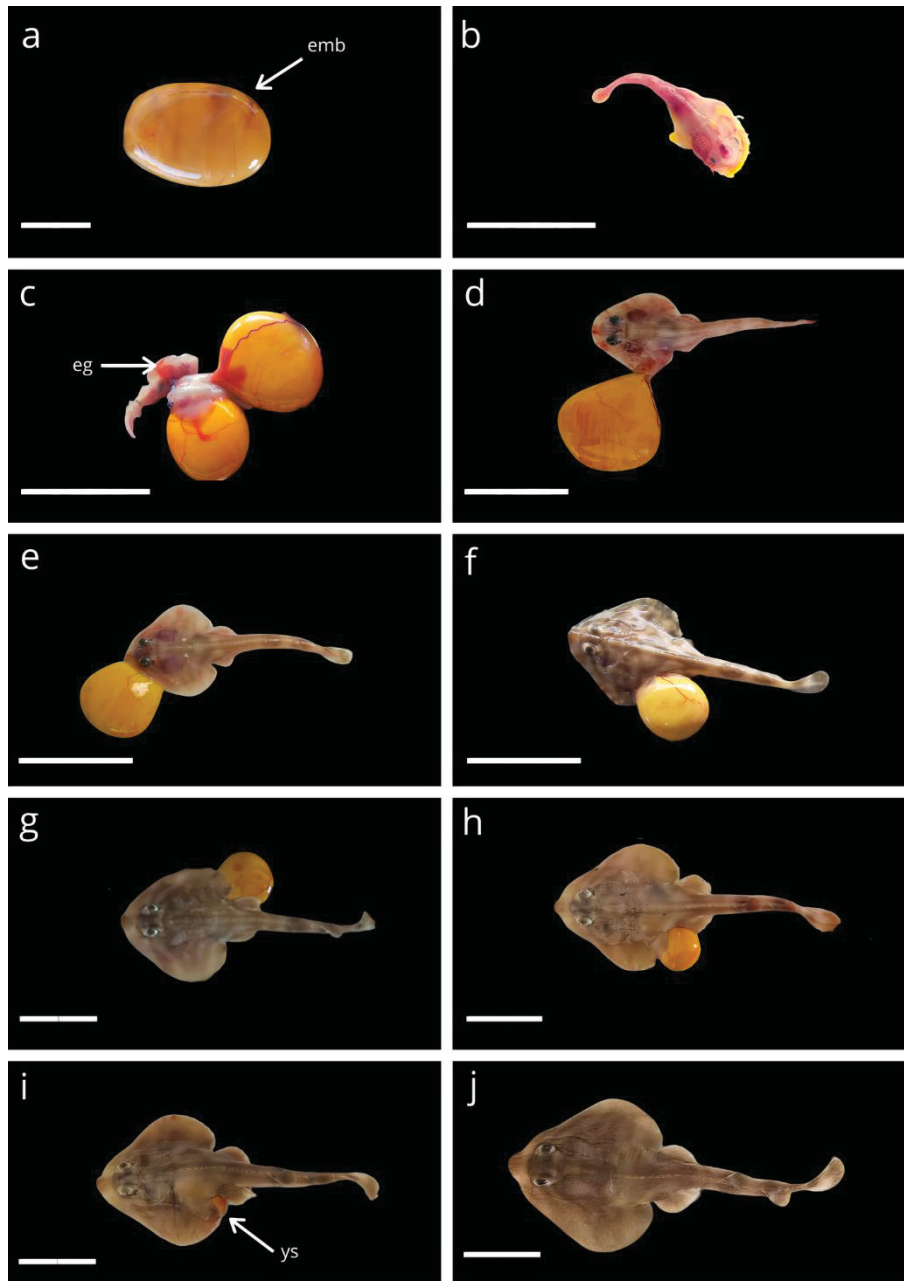


Figura 2. Estágios de desenvolvimento embrionário de *Zapteryx brevirostris* observados durante os eventos de aborto, parto prematuro e retenção. A) Estágio 1. B) Estágio 2. C) Estágio 3, dois embriões. D) Estágio 4. E) Estágio 5. F) Estágio 6. G) Estágio 7. H) Estágio 8. I) Estágio 9. J) Estágio 10. Os embriões são representados por "emb", as brânquias externalizadas por "eg" e o saco vitelínico por "ys", todos indicados pelas setas brancas. Escala: 5cm, 3cm e 2cm.

No total, dezesseis fêmeas sofreram parto induzido por captura durante o período de monitoramento, com uma média de quatro embriões expulsos por vez. Vinte e uma gestantes não apresentaram evidências de parto induzido por captura durante o monitoramento e não foram consideradas no presente estudo. Durante o monitoramento, foram acessados 82 embriões, dos quais 73% ($n = 60$) foram abortados, 12% ($n = 10$) nasceram prematuramente (vivos) e 14% ($n = 12$) foram retidos devido a mortalidade

materna. Embriões de todos os estágios de desenvolvimento foram abortados, com predomínio de embriões nos estágios 2-6. Apenas três fêmeas apresentaram parto prematuro, com uma fêmea expulsando toda a ninhada ainda viva e as outras duas fêmeas expulsando apenas um embrião vivo cada. Os embriões expelidos prematuramente foram classificados nos estágios 2 e 5. Os embriões no estágio 2 permaneceram vivos entre 17 e 28 horas. Em contraste, os embriões no estágio 5 sobreviveram por até 72 horas. Todos os estágios do desenvolvimento embrionário foram observadas na condição de retenção, com predomínio dos estágios finais (7 a 10).

3.2 Respostas fisiológicas maternas ao aborto, parto prematuro e retenção

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações sorológicas maternas de ureia entre fêmeas que sofreram aborto, parto prematuro ou retenção (ANOVA, $p = 0,931$; Figura 3A). O lactato e fósforo também não apresentaram diferenças entre as condições (ANOVA; $p = 0,628$ e $p = 0,483$; Figura 3B-C). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas para nenhum dos marcadores energéticos maternos testados (ANOVA, glicose, $p = 0,599$; Kruskal-Wallis; triglicerídeos, $p = 0,055$ e colesterol total, $p = 0,109$; Figura 3D-F).

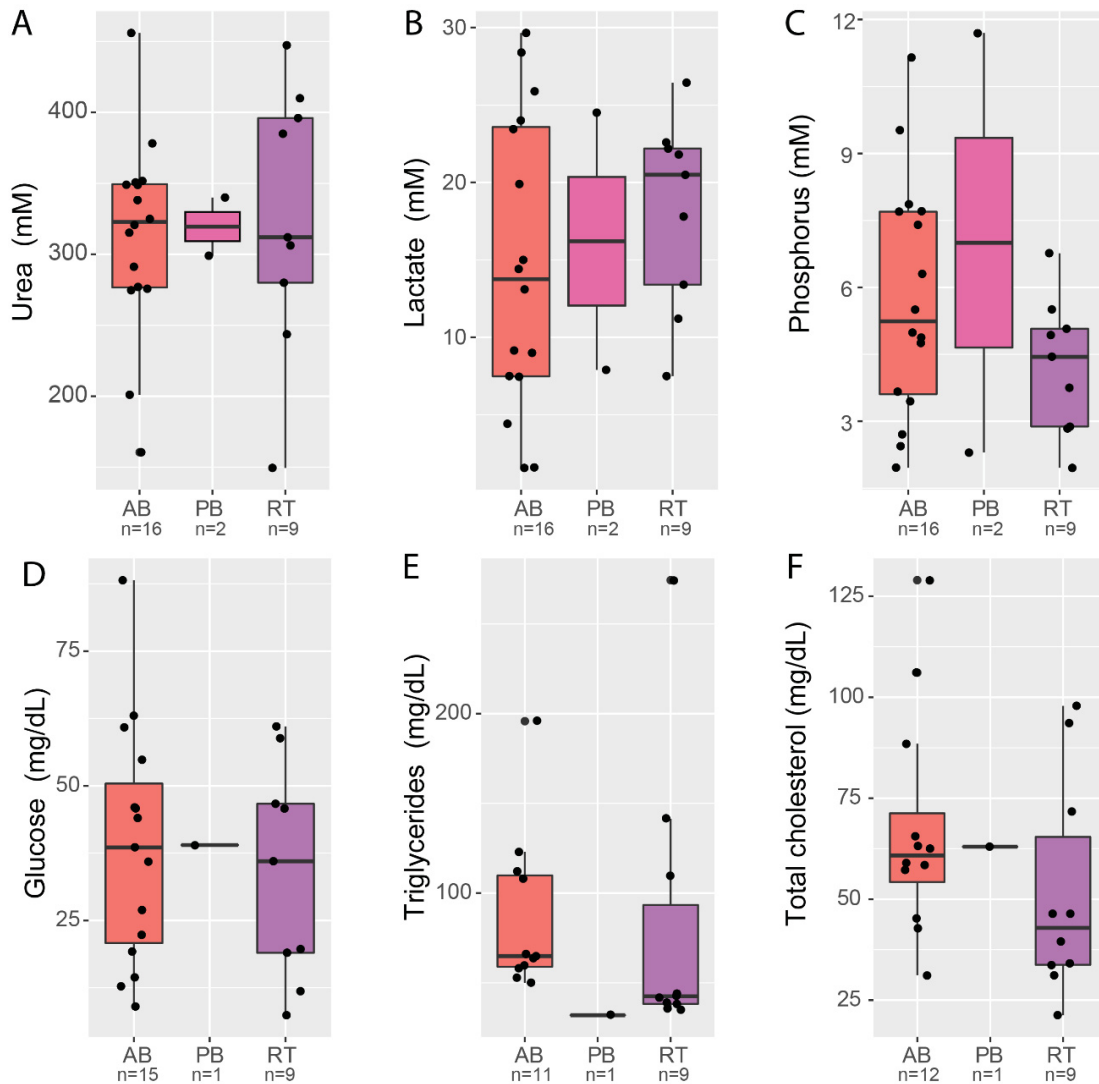


Figura 3. Concentrações sorológicas de fêmeas grávidas de *Z. brevisstris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no soro de fêmeas que sofreram aborto (AB), parto prematuro (PB) ou morreram retendo os embriões (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n).

3.3 Respostas fisiológicas do líquido uterino ao aborto, parto prematuro e retenção

As concentrações de ureia, lactato e fósforo no líquido uterino das fêmeas que sofreram abortos, partos prematuros ou morreram retendo os embriões não demonstraram diferença significativa (ANOVA, $p = 0,906$; $p = 0,488$; $p = 0,355$, respectivamente) (Figura 4A-C). Além disso, também não foi observada diferença significativa para os marcadores energéticos testados (Kruskal-Wallis, glicose, $p = 0,473$; ANOVA; triglicerídeos, $p = 0,900$; colesterol total, $p = 0,506$, respectivamente; Figura 4D-F).

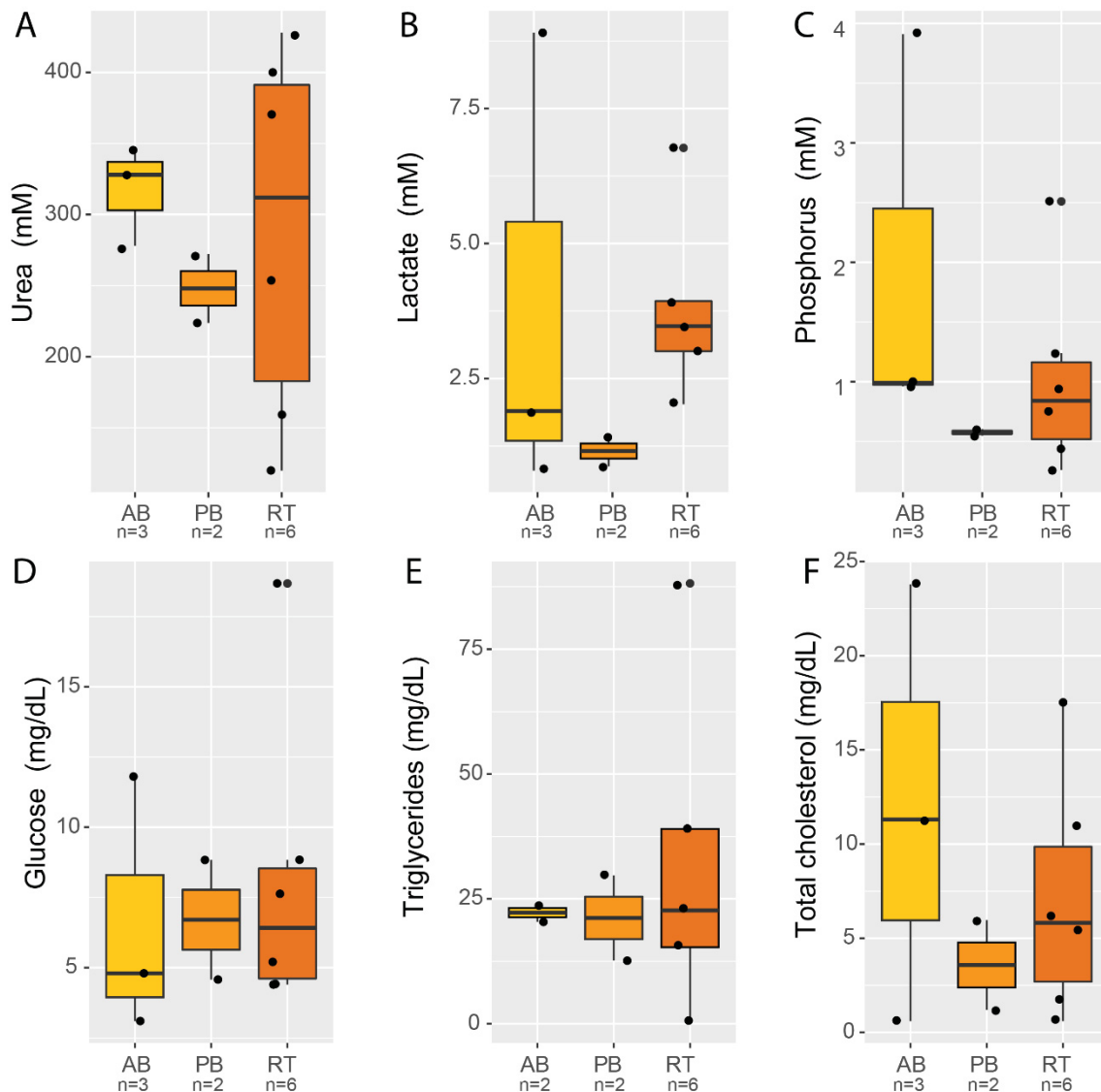


Figura 4. Concentrações no líquido uterino de fêmeas grávidas de *Z. brevirostris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no líquido uterino de fêmeas que sofreram aborto (AB), parto prematuro (PB) ou morreram retendo os embriões (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n).

3.4 Respostas fisiológicas da prole ao aborto, parto prematuro e retenção

As concentrações sorológicas da ureia dos embriões não apresentaram diferença significativa entre as condições (ANOVA; $p = 0,136$; Figura 5A). Em contraste, as concentrações de lactato foram maiores em embriões abortados quando comparados a embriões nascidos prematuramente e retidos (ANOVA; $p = 0,023$; Figura 5B). O mesmo foi observado para o fósforo, com maiores concentrações nos embriões abortados (Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Figura 5C). As concentrações de glicose e triglicerídeos não demonstraram diferença significativa entre embriões abortados, nascidos

prematuramente ou retidos (ANOVA; glicose - $p = 0,698$; triglicerídeos - $p = 0,672$, Figura 5D-E). Em contraste, as concentrações de colesterol total foram maiores em embriões retidos em comparação com embriões abortados e nascidos prematuramente (ANOVA; $p = 0,002$; Figura 5F).

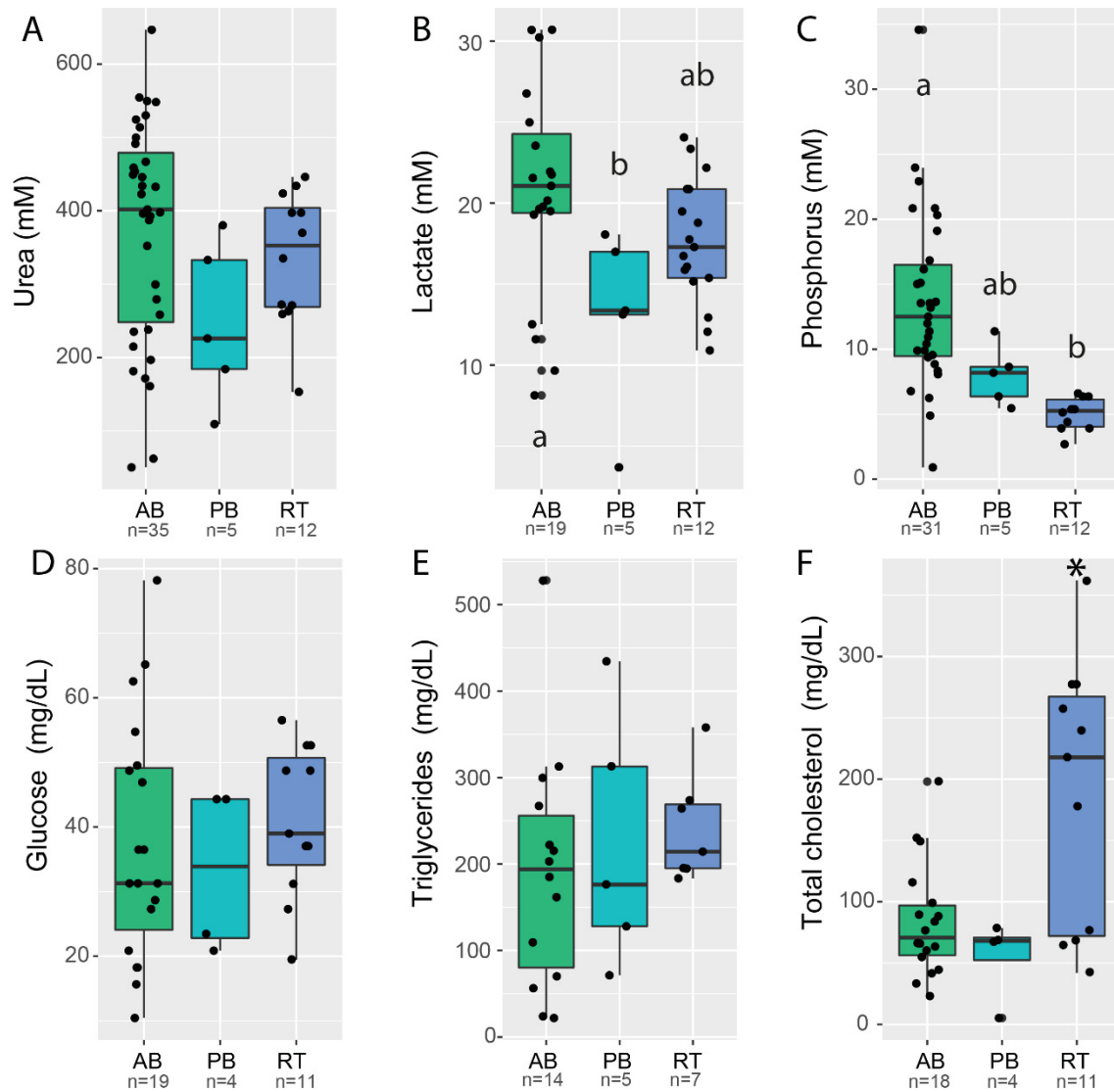


Figura 5. Concentrações sorológicas dos embriões de *Z. brevivirostris*. Concentrações de (A) ureia, (B) lactato e (C) fósforo, (D) glicose, (E) triglicerídeos e (F) colesterol total no soro dos embriões abortados (AB), nascidos prematuramente (PB) e retidos (RT). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas pelas letras minúsculas e por (*).

3.5 Respostas fisiológicas das mães, líquido uterino e prole ao estresse em cada grupo

Aqui apresentamos os resultados comparativos agrupados das mães, líquido uterino e embriões em cada condição (abortos, parto prematuro ou retenção). Não foi detectada diferença estatística entre os níveis de ureia circulante no soro das mães, no líquido uterino e no soro dos embriões em nenhuma das condições (ANOVA, aborto, $p = 0,090$; parto prematuro, $p = 0,641$; retenção, $p = 0,648$) (Figura 6)

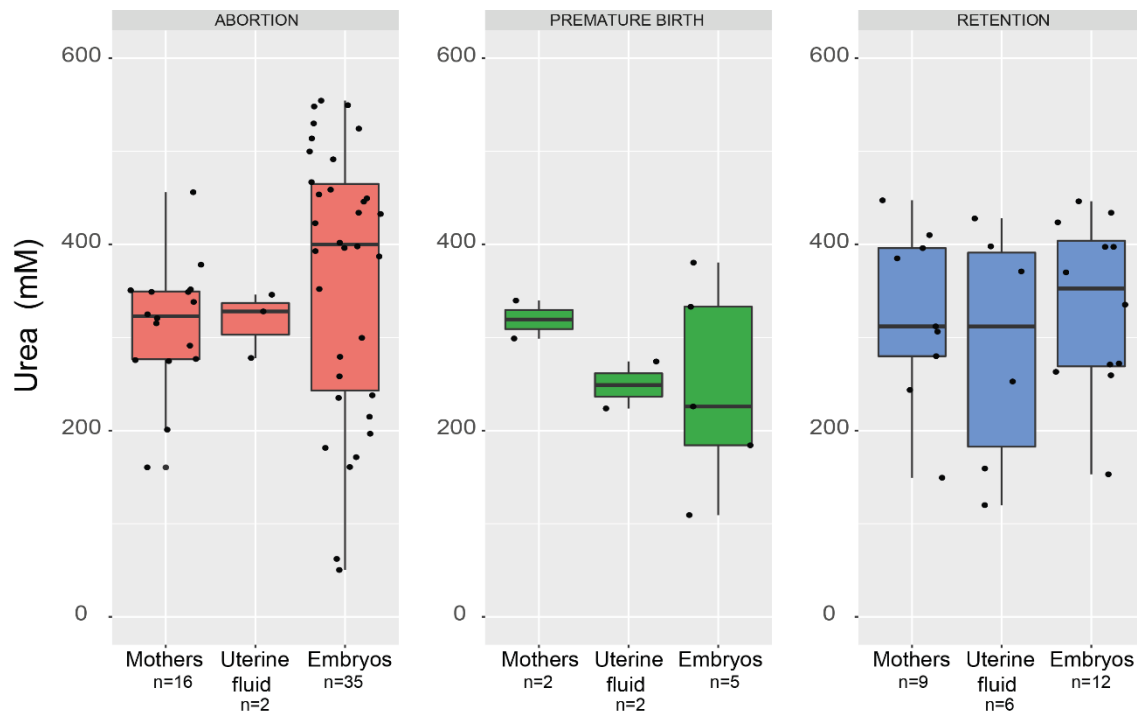


Figura 6. Comparação das concentrações sorológicas de ureia das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n).

Durante o aborto, foi observada diferença significativa para o lactato entre o líquido uterino e os embriões (ANOVA, $p = 0,003$). Na retenção, foi detectada diferença no líquido uterino quando comparado às mães e embriões (ANOVA, $p < 0,001$), com o líquido uterino apresentando valores intermediários (Figura 7). Nenhuma diferença significativa foi observada para o parto prematuro (ANOVA, $p = 0,313$).

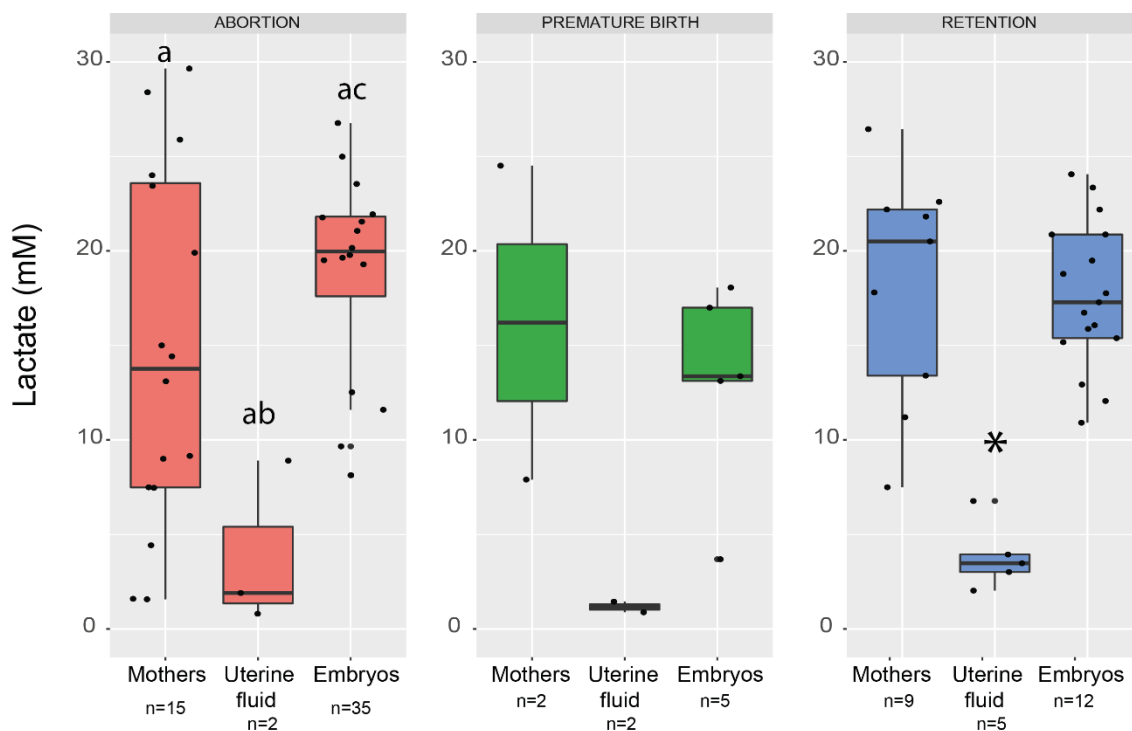


Figura 7. Comparação das concentrações sorológicas do lactato das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*).

Para o aborto, foi observada diferença significativa para o fósforo entre as mães e embriões (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), sendo maior no soro dos embriões. Na retenção, foi detectada diferença estatística para líquido uterino quando comparado ao soro das mães e soro dos embriões (ANOVA, $p < 0,001$), com concentrações menores no líquido uterino (Figura 8). Nenhuma diferença significativa foi observada para o parto prematuro (Kruskal-Wallis, $p = 0,138$).

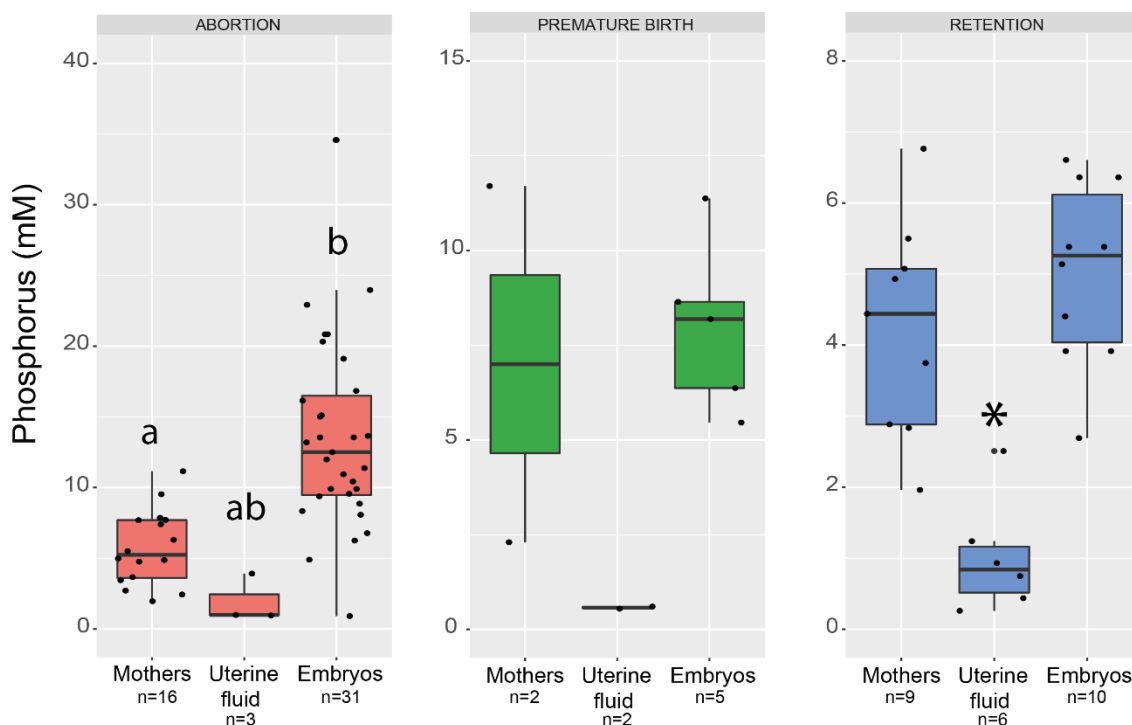


Figura 8. Comparação das concentrações sorológicas do fósforo das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*).

As concentrações de glicose foram significativamente menores no líquido uterino quando comparadas ao soro das mães e ao soro dos embriões tanto no aborto (ANOVA, $p = 0,039$) quanto na retenção (ANOVA, $p < 0,001$) (Figura 9). Os níveis circulantes foram muito semelhantes entre o soro das mães e o soro dos embriões em ambas as condições. Nenhuma diferença significativa foi observada para o parto prematuro (Kruskal-Wallis, $p = 0,133$).

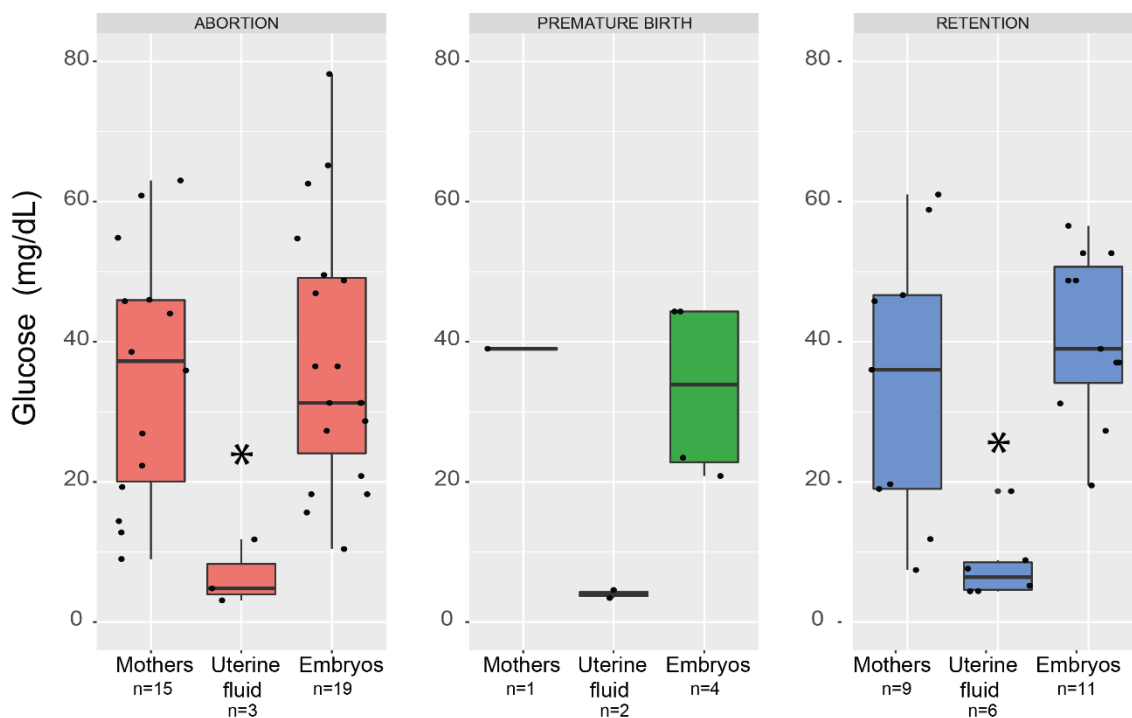


Figura 9. Comparação das concentrações sorológicas de glicose das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*).

As concentrações de triglicerídeos circulantes foram maiores no soro dos embriões quando comparados ao líquido uterino no aborto (ANOVA, $p = 0,009$; Figura 10). Nenhuma diferença foi detectada entre mães e embriões. Para retenção, a concentração de triglicerídeos foi maior no soro dos embriões quando comparada ao líquido uterino e às mães (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi observada no parto prematuro (ANOVA, $p = 0,098$).

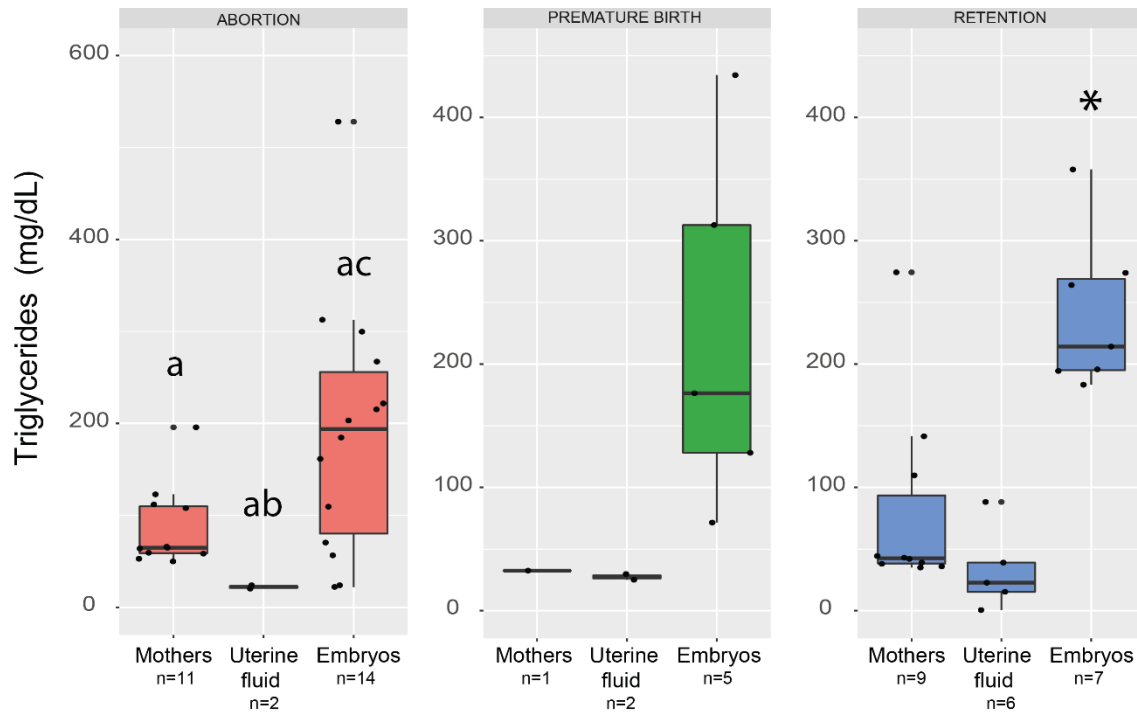


Figura 10. Comparação das concentrações sorológicas dos triglicérides das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*).

No aborto, foi observada diferença significativa nas concentrações de colesterol total entre o soro das mães, do líquido uterino e do soro dos embriões (ANOVA, $p < 0,001$), sendo menor no líquido uterino. Na retenção, os níveis circulantes também foram menores no líquido uterino (ANOVA, $p < 0,001$). Nenhuma diferença foi detectada entre mães e embriões. Não foi observada diferença significativa no parto prematuro (Kruskal-Wallis, $p = 0,305$; Figura 11).

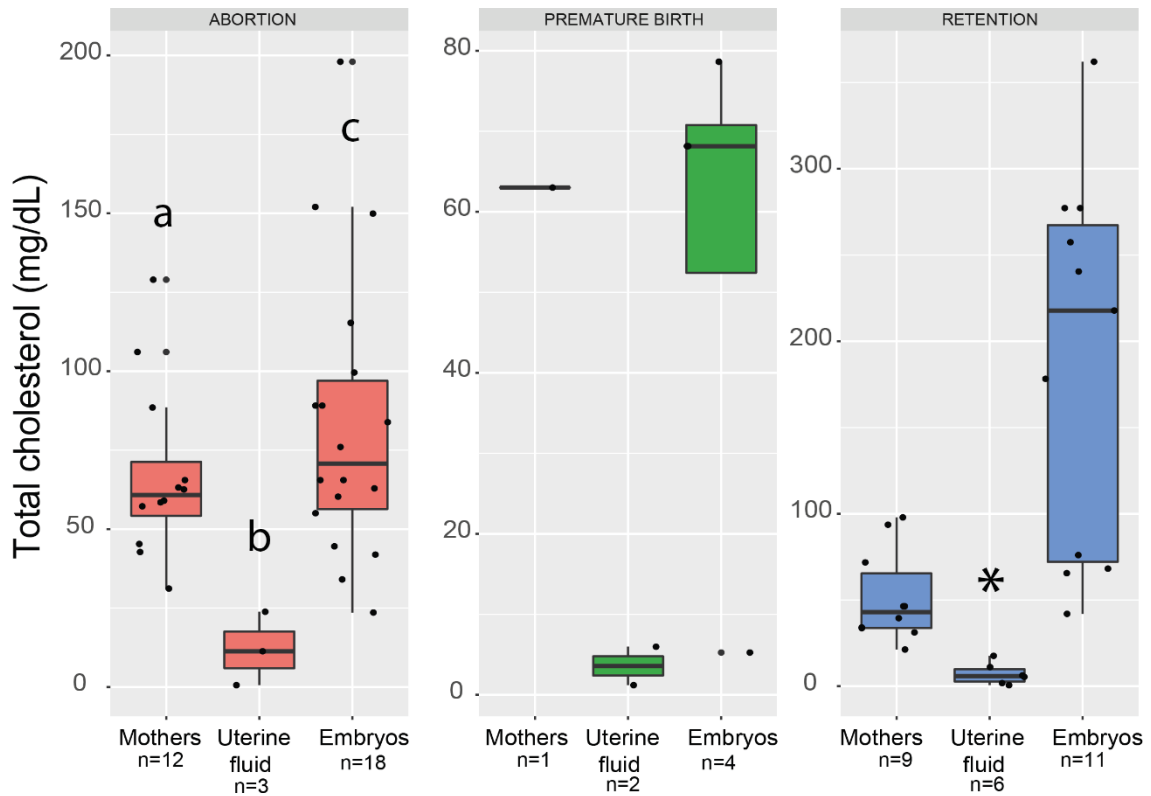


Figura 11. Comparação das concentrações sorológicas do colesterol total das mães, líquido uterino e embriões de *Z. brevis* em cada grupo: Aborto (box rosa), parto prematuro (box verde) e retenção (box azul). O tamanho da amostra de cada grupo, para cada marcador, é fornecido no eixo X, abaixo da abreviatura do nome do grupo (n). As diferenças estatísticas são representadas por letras minúsculas e por (*).

3.6 Concentração de oxigênio dissolvido no líquido uterino

As concentrações de oxigênio dissolvido no líquido uterino tanto das fêmeas que abortaram quanto nas fêmeas que morreram retendo os embriões foram menores quando comparadas ao grupo controle (água do mar - 8 mg/dL; $p = 0,006$). Além disso, o oxigênio dissolvido no líquido uterino foi ligeiramente menor nas fêmeas que abortaram (3 mg/dL) quando comparado às fêmeas que morreram retendo os embriões (4 mg/dL) (Figura 12).

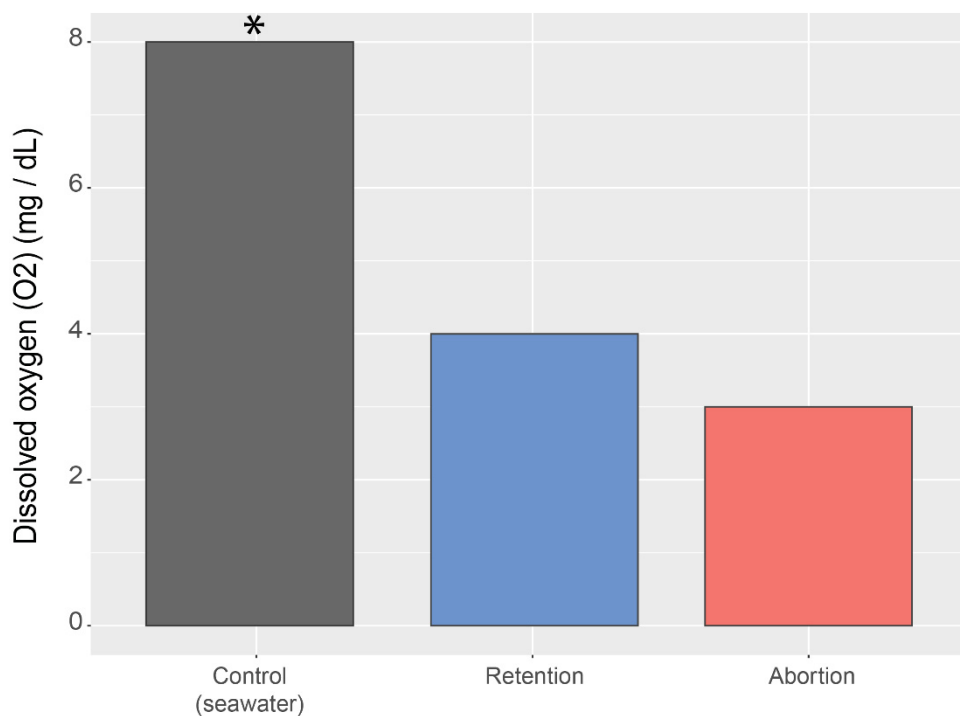


Figura 12. Concentração de oxigênio dissolvido (mg/dL) na água do mar (grupo controle, n = 3; box cinza) e líquido uterino de fêmeas *Z. brevirostris* que retiveram (n = 2; box azul) e abortaram seus embriões (n = 1; box rosa). A diferença estatística está representada por (*).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo trouxe uma avaliação detalhada dos impactos do parto induzido pela captura na prole de *Zapteryx brevirostris*, com enfoque nos estágios do desenvolvimento embrionário mais susceptíveis à mortalidade devido à exposição materna à um estressor. Somado a isso, as alterações fisiológicas sofrida pelos embriões quando são expostos indiretamente à sobrecarga alostática materna são apresentadas. Além disso, de acordo com os resultados, as alterações fisiológicas maternas parecem ocorrer na mesma magnitude em todas as condições (aborto, parto prematuro e retenção). Porém, para a prole, as alterações fisiológicas de ordem metabólica são mais pronunciadas nos eventos de retenção. Os resultados também indicam que o estresse vivenciado pela prole é semelhante ao estresse sofrido pela mãe, mesmo que alterações no líquido uterino não sejam observadas prontamente. Ademais, são apresentadas pela primeira vez, evidências compatíveis com a hipótese de que a hipóxia uterina é o fator determinante envolvido na expulsão prematura dos embriões.

4.1 Estágios de desenvolvimento embrionário e taxas de sobrevivência da prole

Observou-se que os eventos de parto induzido pela captura ocorrem e são críticos em todos os estágios de desenvolvimento para *Zapteryx brevirostris*, contribuindo fortemente para a redução do recrutamento populacional da espécie. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, dentro dos efeitos subletais de ordem reprodutiva (i.e., aborto e parto prematuro), existe outra categoria que deve ser considerada: a retenção da prole devido à mortalidade materna. Observou-se que os estágios de desenvolvimento inicial e intermediário (2-6) foram os mais críticos para a prole, tanto durante o aborto quanto no parto prematuro. Em contrapartida, a retenção ocorreu principalmente nos estágios finais de desenvolvimento (7-10), provavelmente devido ao maior tamanho dos filhotes.

O aborto foi a condição mais observada, sendo vivenciado por 73% dos embriões, corroborando dados publicados anteriormente para a espécie (Wosnick et al., 2019a). Em contraste, o parto prematuro, que poderia aumentar as chances de sobrevivência dos embriões, é raro (14%) e foi predominante durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Isso é particularmente preocupante, uma vez os embriões em estágio inicial não têm a capacidade morfofisiológica para lidar com os desafios ambientais, indicando que mesmo que as fêmeas de *Z. brevirostris* realizem o auto-sacrifício, os filhotes não teriam chances significativas de sobrevivência na natureza. Mesmo quando o PB ocorreu no estágio intermediário de desenvolvimento, foi observada a ruptura do saco vitelínico dos embriões. Visto que a estrutura é fundamental para a sobrevivência de espécies vivíparas lecitotróficas, como *Z. brevirostris*, a ruptura pode ter contribuído para a mortalidade dos filhotes nascidos prematuramente observada durante o monitoramento. O mesmo foi observado para embriões de *Orectolobus ornatus* e *Squalus acanthias*, os quais acabaram morrendo após a ruptura do saco vitelínico durante experimentação (Ellis e Otway, 2011; Jones e Price, 1967). Desta forma, mesmo que os embriões sobrevivam por algum tempo à expulsão uterina de forma prematura, provavelmente esses filhotes morrerão por desnutrição devido à ruptura do vitelo, serão predados ou morrerão acometidos por infecções (Ellis e Otway, 2011; Jones e Price, 1967; Gilbert, 1958). De fato, embriões são mais vulneráveis após eventos de estresse, apresentando alterações de mobilidade (i.e., natação) e comportamentais (i.e., atraso no hábito de se enterrar e na fuga contra predadores) (Finotto et al., 2021). Um padrão diferente do obtido no presente estudo foi observado na raia-de-água-doce (*Potamotrygon amandae*), onde o parto

prematureo prevaleceu nos estágios finais do desenvolvimento embrionário (Rangel et al., 2020). Essas diferenças fortalecem a teoria de que o parto induzido pela captura  espécie-específico e dependente da estratégia reprodutiva dos animais (Adams et al., 2018). Portanto, novas investigações devem ser realizadas para estabelecer protocolos de manejo específicos para cada espécie.

Todas as condições observadas no presente estudo (AB, PB e RT) refutam as hipóteses de autopreservação e auto-sacrficio, pelo menos para *Z. brevirostris*. Isso porque se a expulsão uterina prematura fosse uma boa estratégia adaptativa para garantir a sobrevivência das fêmeas (autopreservação), as taxas de sobrevivência materna seriam maiores (apenas 40% em curto prazo - para mais detalhes ver Wosnick et al., 2019a). Em contraste, se fosse uma estratégia para garantir a sobrevivência da prole (auto-sacrficio), a retenção seria menos comum e pelo menos alguns embriões sobreviveriam  expulsão uterina (mortalidade de 100% observada no nascimento prematuro).

4.2 Respostas fisiológicas maternas ao aborto, parto prematuro e retenção

Os níveis circulantes de ureia permaneceram relativamente estáveis durante os abortos, partos prematuros ou retenção da prole. As concentrações observadas foram semelhantes às relatadas para fêmeas grávidas de *Z. brevirostris* que morreram após abortos consecutivos (Wosnick et al., 2019a), indicando que a perda do equilíbrio homeostático ocorre no mesmo nível, independentemente do destino dos filhotes. As concentrações de lactato foram compatíveis com sobrecarga alostática em todas as condições, com níveis circulantes próximos aos relatados para outros elasmobrânquios, incluindo animais mortos (Gallagher et al., 2014; Manire et al., 2001; Moyes et al., 2006; Prado, 2018; Wosnick et al., 2019a). O aumento do lactato era esperado, pois em situações de estresse esse marcador tende a se acumular, levando à acidose metabólica (Skomal e Bernal, 2010; Skomal e Mandelman, 2012). Os níveis circulantes de fósforo também foram estáveis (apesar de marcadamente altos) entre as condições, indicando variação relacionada à sobrecarga alostática (Wosnick et al., 2019a), independentemente do destino dos embriões. A hiperfosfatemia observada também pode ser resultado de acidose metabólica relacionada ao aumento do lactato (i.e. quebra de ATP e AMP e liberação de fosfato inorgânico) (DiBartola, 2011) ou mesmo tetnia (Neves et al., 2004) devido à contração involuntária da musculatura uterina.

Os marcadores energéticos, glicose, triglicerídeos e colesterol total também foram estáveis entre as condições, com concentrações maternas compatíveis com aquelas relatadas para outros elasmobrânquios em condições nutricionais e energéticas satisfatórias (Gallagher et al., 2017; Garcia-Garrido et al., 1990; Manire et al., 2001; Prado, 2018). Além disso, os níveis circulantes de triglicerídeos e colesterol total observados são compatíveis com valores relatados para fêmeas durante o período reprodutivo (Garcia-Garrido et al., 1990). Esses resultados apontam para dois cenários distintos. As fêmeas que sobreviveram, apesar de estressadas, ainda tinham condições energéticas para restaurar o equilíbrio homeostático, porém, ao custo de perder sua prole. Em contraste, as fêmeas que morreram após o aborto ou mesmo antes de serem capazes de expulsar os embriões (retenção), estavam sob uma sobrecarga alostática tão alta que sucumbiram antes mesmo de qualquer mobilização energética efetiva.

4.3 Respostas fisiológicas do líquido uterino ao aborto, parto prematuro e retenção

No presente estudo, não foi observada diferença significativa nos marcadores testados no líquido uterino para nenhuma condição. À primeira vista, essa aparente inalteração dos marcadores entre as condições poderia ser interpretada como uma alta estabilidade do LU, mesmo diante da exposição das mães a um estressor. No entanto, com base em dados publicados anteriormente, alguns padrões interessantes foram observados. Um estudo realizado com o tubarão *Squalus acanthias*, também vivíparo lecitotrófico, mostrou que a concentração de ureia no LU é semelhante ao soro materno (~ 300 mOsm / Kg H₂O) nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Evans et al. 1982). Em contraste, a concentração de ureia no LU no final da gestação é significativamente menor (~ 8,5 mOsm / Kg H₂O), visto que a lavagem uterina é realizada com frequência durante esse estágio. Aliado a isso, a composição do LU durante esse período é semelhante à da água do mar (Evans et al. 1982). Diante disso, como apenas embriões nos estágios mais avançados de desenvolvimento foram retidos no presente estudo, as concentrações de ureia no LU deveriam ser mais baixas nesta condição (assumindo que *Z. brevirostris* realize lavagem uterina). Desta forma, o fato das concentrações de ureia na retenção serem semelhantes às observadas nas outras condições (representados por estágios embrionários anteriores), indica que sem a lavagem uterina, (pois as mães morreram antes de conseguirem expelir os embriões), o LU pode se tornar potencialmente tóxico, devido a um possível acúmulo de ureia e de outros compostos nitrogenados provenientes do metabolismo dos embriões.

Outro padrão interessante foi observado para os níveis de lactato do LU em todas as condições. Um estudo anterior também realizado com *Squalus acanthias*, indica que as concentrações de lactato no LU precisam ser altas (116 mM) para garantir um pH uterino mais ácido durante a gravidez (Kormanik, 1988). Segundo o autor, a acidificação do LU converte a amônia (NH_3) em amônio (NH_4^+), protegendo os embriões dos efeitos tóxicos das alta concentração de amônia. No presente estudo, os níveis circulantes de lactato no LU foram baixos (variando de 1,2 mM a 3,9 mM). Logo, concentrações mais baixas de lactato poderiam levar ao aumento do pH do LU, expondo os embriões a um ambiente mais básico e cada vez mais tóxico. Diante disso, a redução observada pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pelas altas taxas de mortalidade embrionária observadas em todas as condições. No entanto, estudos futuros são necessários para compreender adequadamente quais mecanismos bioquímicos são responsáveis pela diminuição observada do lactato uterino.

As baixas concentrações do fósforo e dos marcadores energéticos (glicose, triglicerídeos e colesterol total) no LU foram semelhantes às concentrações encontradas no LU de outros elasmobrânquios em condições normais (Ellis e Otway, 2011; Evans et al., 1982; Files e Lombardi, 1993; Kormanik e Evans, 1986; Thorson e Gerst, 1976). Desta forma, a presença dessas moléculas no LU pode ser derivada de secreções epidérmicas e excretas dos embriões em estágios avançados (Files e Lombardi, 1993). A presença discreta dessas moléculas energéticas via excreção embrionária faz sentido. Isso porque, energeticamente, não faria sentido produzir moléculas de alto custo energético, para posteriormente descartá-las através da lavagem uterina.

4.4 Respostas fisiológicas da prole ao aborto, parto prematuro e retenção

O estresse experimentado pelos embriões parece ser maior durante os eventos de aborto. Para a ureia, os níveis circulantes foram semelhantes às concentrações observadas tanto no soro das mães quanto no LU (~ 350 mOsm / Kg H_2O). Embora os resultados apontem para uma redução na capacidade de reabsorção de ureia (compatível com sobrecarga alostática - Wosnick et al., 2019a), é possível que os valores abaixo do esperado (~ 450 mOsm / Kg H_2O para a espécie em condições normais e em ambiente marinho - Wosnick e Freire 2013) estejam relacionados ao aumento da concentração de ureia ao longo do desenvolvimento embrionário (Read, 1968; Needham e Needam, 1930), com embriões em estágios de desenvolvimento iniciais e intermediários apresentando

níveis circulantes mais baixos. O lactato e o fósforo foram ligeiramente maiores nos embriões abortados e tal diferença pode estar relacionada ao tempo de expulsão uterina. Visto que no parto prematuro os embriões acabam sendo expelidos mais rápido, o período de exposição às alterações uterinas acaba sendo reduzido. Em contraste, na retenção, as mães morrem antes mesmo que os embriões tenham a chance de serem liberados, e provavelmente morrem por asfixia e aumento do pH. Como uma situação intermediária, o aborto pode expor os filhotes às alterações uterinas (por exemplo, hipóxia) enquanto esses embriões estão se movimentando para tentar deixar o útero. Essa combinação (hipóxia uterina e exercícios extenuantes) pode ser responsável pela acidose metabólica observada e consequente aumento dos níveis de fosfato inorgânico.

Os níveis circulantes de glicose e triglicerídeos no soro dos embriões foram compatíveis com o encontrado em elasmobrânquios adultos (Gallagher et al., 2017; Garcia-Garrido et al., 1990; Manire et al., 2001; Prado, 2018). De fato, adultos também dependem de uma dieta rica em proteínas e lipídios, e os corpos cetônicos são a principal fonte de combustível metabólico (Ballantyne, 1997; Leigh, Papastamatiou e German, 2017). No entanto, como durante a gestação os embriões dependem de altas reservas energéticas do vitelo (Conrath e Musick, 2012), esperava-se que as concentrações de triglicerídeos fossem maiores do que nos adultos (Kormanik e Evans, 1986). Até o momento, a presença de carboidratos no vitelo de elasmobrânquios não foi confirmada. No entanto, considerando que os embriões avaliados no presente estudo apresentaram níveis circulantes de glicose significativos, é plausível inferir que pelo menos uma parte do vitelo deve ser composta por carboidratos. Além disso, possivelmente a glicose também poderia estar sendo utilizada como substrato energético pelos embriões. Portanto, os resultados obtidos sugerem que, possivelmente, houve mobilização energética e utilização dessas reservas para lidar com a sobrecarga alostática imposta a esses embriões. Além disso, as demandas energéticas para lidar com o estresse parecem semelhantes em todas as condições. A concentração de colesterol total foi maior nos embriões retidos no útero quando comparadas às outras condições. Na raia-ticonha (*Rhinoptera bonasus*), que apresenta viviparidade histotrófica, o colesterol mostrou uma correlação negativa com o tamanho corporal em jovens do ano, indicando níveis circulantes derivados de provisionamento materno ao invés de produção embrionária direta (Rangel et al., 2020). Nossos resultados mostraram um padrão oposto, no qual embriões mais desenvolvidos (retenção; estágios 7-10) exibiram as maiores concentrações séricas. Como o colesterol

desempenha um papel importante na retenção de ureia, reduzindo a permeabilidade da membrana branquial (Hammerschlag, 2006), é possível que os níveis circulantes observados nos embriões retidos estejam mais relacionados à degeneração da membrana branquial devido à acidose metabólica, do que como um indicativo de qualidade nutricional e condição energética. No entanto, como elasmobrânquios possuem baixa capacidade de transportar colesterol, os altos níveis observados também podem ser um indicativo de catabolismo tecidual (Gallagher et al., 2017; Larsson e Fange, 1977).

4.5 Impactos gerais do aborto, parto prematuro e retenção nas mães e suas proles

Além de concentrações séricas elevadas de fósforo circulante nos embriões abortados e dos níveis mais elevados de triglicerídeos nos embriões retidos, todos os marcadores se comportaram de maneira muito semelhante tanto nas mães quanto nos embriões em ambas as condições. Tal padrão indica que a magnitude do estresse experimentado é semelhante para mães e filhotes, dando suporte à hipótese inicial de que os embriões, embora não diretamente expostos ao estresse da captura, são afetados da mesma forma que as mães. Impactos negativos (i.e., redução da massa corporal e do comprimento total, comprometimento da resposta imunológica, alteração da natação e de comportamento) na prole de fêmeas grávidas expostas ao estresse de captura também foram relatados para a raia *Trygonorrhina dumerilii* (Finotto et al., 2021; Guida et al. 2017). De fato, embriões de espécies vivíparas possuem alta dependência materna, uma vez que a fêmea regula as respostas ao estresse, realocação de energia e automanutenção (Guida et al., 2017; Meylan et al., 2012). Logo, se a mãe está sob estresse, vias fisiológicas serão ativadas e sinais serão transmitidos aos embriões a fim de aumentar as chances de sobrevivência (Kapoor et al., 2006). No entanto, em um caso extremo como o experimentado pelas fêmeas grávidas avaliadas no presente estudo (i.e., capturadas pela pesca comercial e transportadas para o local de desembarque fora da água por cerca de 3 horas - para mais detalhes ver Wosnick et al., 2019a), mesmo que as mães ativem vias fisiológicas para tentar salvar seus filhotes, o estresse vivenciado é tão alto que se torna uma situação sem saída.

Em relação a alguns marcadores estarem mais altos nos embriões, há dois cenários possíveis. Para embriões abortados que exibiram níveis mais elevados de fósforo circulante, é possível que a acidose metabólica (tanto por hipóxia uterina quanto por exercícios extenuantes pela tentativa de saída do útero) tenha sido responsável pelo

aumento dos níveis circulantes observado neste grupo. Quanto aos triglicerídeos nos embriões retidos, os níveis elevados podem ser explicados pela mobilização energética das reservas hepáticas (já internalizadas pela absorção do vitelo em embriões mais desenvolvidos) como forma de lidar com o estresse de confinamento em condições extremas. Isso porque ao contrário dos embriões abortados, ou seja, onde a fêmea ainda está viva e era capaz de realizar a contração uterina e expulsar os filhotes, na retenção os embriões são retidos, provavelmente sendo incapazes de deixar o útero por conta própria. Assim, maiores demandas energéticas seriam necessárias para lidar com tal condição.

4.6 Impactos gerais do estresse materno devido à captura no líquido uterino

Apesar de apresentar grande importância para as trocas gasosas, remoção de excretas, balanço hídrico e transferência de minerais em espécies vivíparas lecitotróficas, pouco se sabe sobre a composição e dinâmicas fisiológicas do LU para a maioria das espécies de elasmobrânquios (Ellis e Otway, 2011; Evans et al., 1982; Thorson e Gerst, 1976). Além disso, não se tem conhecimento de avaliações prévias sobre os efeitos da sobrecarga alostática no LU, havendo uma grande lacuna sobre o tema. Como já mencionado, em espécies vivíparas lecitotróficas, a cápsula ovígera é banhada pelo LU, o qual no início da gestação é semelhante ao plasma materno (Kormanik, 1993). Em contraste, no final da gravidez, a lavagem uterina parece prevalecer, garantindo a manutenção do ambiente uterino (Ellis e Otway, 2011; Kormanik, 1993; Tomita, Cotton e Toda, 2016). No presente estudo, com exceção da ureia, todos os marcadores apresentaram baixas concentrações no LU quando comparados ao soro das mães e dos embriões. Tais resultados indicam que o LU, de fato, exibe concentrações semelhantes ao soro materno para algumas moléculas (i.e., sódio, potássio e ureia) (Evans et al., 1982; Files e Lombardi, 1993; Kormanik e Evans, 1986; Kormanik, 1993; Thorson e Gerst, 1976). No entanto, o mesmo parece não ocorrer com outras moléculas com funções fisiológicas não relacionadas diretamente à osmorregulação. Como discutido acima, os níveis circulantes de ureia e lactato no LU parecem sofrer alterações relacionadas tanto as respostas das mães quanto dos embriões. Em contrapartida, não há evidências de alterações causadas pela sobrecarga alostática materna ou embrionária nos níveis circulantes dos marcadores energéticos. É possível que tal padrão esteja relacionado à falta de função ou função desconhecida dos marcadores energéticos no LU, diferente dos marcadores que demonstraram alterações, visto suas funções na regulação osmo-iônica e

ácido-básica. No entanto, mais estudos são necessários, uma vez que o LU parece apresentar alta complexidade fisiológica.

Em elasmobrânquios vivíparos, até onde se sabe, o LU é a única fonte de oxigênio disponível, proveniente da difusão com a parede uterina (Tomita et al., 2012). Além disso, para algumas espécies, a lavagem uterina fornece suprimento adicional de oxigênio nos estágios gestacionais mais avançados (Ellis e Otway, 2011; Kormanik, 1993; Tomita, Cotton e Toda, 2016). No presente estudo, foi observada uma baixa concentração de oxigênio dissolvido no LU nas condições avaliadas (retenção e aborto) quando comparado à água do mar. Esse resultado corrobora a hipótese de Rincon e Vooren (2007) de que a hipóxia uterina poderia ser o gatilho para a movimentação dos embriões e posterior expulsão uterina. De fato, os efeitos da hipóxia uterina podem ser altamente deletérios. Em humanos, nas fases gestacionais tardias, a hipóxia uterina está associada a distúrbios fetais crônicos, sofrimento, asfíxia e aumento de até 10 vezes na mortalidade perinatal (Pollack e Divon, 1992; Moon-Grady et al., 2010). Além disso, em peixes, a hipóxia pode ter um efeito teratogênico, atrasar o desenvolvimento embrionário e alterar a dinâmica hormonal (Shang e Hu, 2004). A menor concentração foi detectada nos embriões abortados (3 mg/dL), indicando que a falta de oxigênio pode ser a principal causa da mortalidade da prole em todos os estágios de desenvolvimento. Nos embriões retidos, as concentrações também foram baixas (4 mg/dL). No entanto, como o oxigênio dissolvido foi ligeiramente superior nesta condição, a mortalidade da prole pode estar relacionada também a outros fatores, como toxicidade uterina devido às altas concentrações de compostos nitrogenados e aumento do pH diante da morte das mães antes da expulsão uterina.

5 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que, no caso de *Z. brevirostris*, uma nova hipótese quanto à causa do parto induzido por captura pode ser formulada. De acordo com as evidências fisiológicas expostas, o auto-sacrifício e a autopreservação não explicam os efeitos sub-letais observados. Ao que parece, as alterações fisiológicas da prole aliadas à hipóxia uterina devido ao estresse de captura materno agem em sinergia, levando à mortalidade dos embriões. Assim, nossa hipótese é que o parto induzido pela captura, na verdade, é uma combinação de alterações fisiológicas de origem materna e embrionária, sendo a hipóxia uterina, o aumento do pH

e o conseqüente acúmulo de compostos nitrogenados, os agentes propulsores da expulsão uterina. Além disso, enquanto a hipóxia parece afetar todos os estágios do desenvolvimento embrionário (visto que os embriões de ambos os estágios são abortados), a intoxicação por compostos nitrogenados parece afetar embriões mais desenvolvidos (já que as demandas energéticas são maiores, bem como os resíduos metabólicos). Portanto, estudos futuros devem avaliar as concentrações de pH e compostos nitrogenados no líquido uterino durante esses eventos. Ademais, mais estudos são necessários para avaliar o papel potencial dos hormônios esteróides na expulsão da prole, uma vez que o aumento da liberação de glicocorticoides pelos embriões levam à ativação miométrial e do trabalho de parto em vertebrados com fertilização e desenvolvimento interno (Young et al., 2011).

Como as fêmeas do presente estudo foram transportadas pelos pescadores fora d'água, os efeitos aqui observados provavelmente foram causados não apenas pelo estresse de captura, mas também pelo transporte. Diante disso, considerando que a espécie possui baixo valor comercial, os efeitos sub-letais podem ser evitados e/ou reduzidos se boas práticas de pesca e manejo forem adotadas. Muitos pescadores já adotam medidas compensatórias ao impacto da pesca, como por exemplo soltar os filhotes expulsos prematuramente. Porém, como apontado, a mortalidade pós-parto prematuro é de 100%, indicando que essa medida, apesar de representar o compromisso dos pescadores, é pouco eficiente para garantir a conservação da espécie. Desta forma, são necessárias medidas educativas com os pescadores para incentivar e garantir a liberação imediata das mães em casos de captura incidental, a fim de garantir estresse mínimo, sobrevivência das mesmas e conseqüente manutenção da gravidez e recrutamento populacional.

REFERÊNCIAS

- Abilhoa, V., Bornatowski, H. Freitas, M.O. (2007). Some information on reproduction and embryonic development of the lesser guitarfish *Zapteryx brevirostris* in Southern Brazil. *Acta Adriatica*, 48, 89–94.
- Adams, K. R., Fetterplace, L. C., Davis, A. R., Taylor, M. D., & Knott, N. A. (2018). Sharks, rays and abortion: the prevalence of capture-induced parturition in elasmobranchs. *Biological Conservation*, 217, 11-27.
- Alomar, C., & Deudero, S. (2017). Evidence of microplastic ingestion in the shark *Galeus melastomus* Rafinesque, 1810 in the continental shelf off the western Mediterranean Sea. *Environmental pollution*, 223, 223-229.

Awruch, C. A., Pankhurst, N. W., Frusher, S. D., & Stevens, J. D. (2008). Endocrine and morphological correlates of reproduction in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps* (Elasmobranchii: Scyliorhinidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(4), 184-197.

Awruch, C. A. (2013). Reproductive endocrinology in chondrichthyans: the present and the future. *General and comparative endocrinology*, 192, 60-70.

Ballantyne, J. S. (1997). Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(4), 703-742.

Barbini, S. A., Lucifora, L. O., & Hozbor, N. M. (2011). Feeding habits and habitat selectivity of the shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes, Rhinobatidae), off north Argentina and Uruguay. *Marine Biology Research*, 7(4), 365-377.

Barreto, R. R., Bornatowski, H., Motta, F. S., Santander-Neto, J., Vianna, G. M. S., & Lessa, R. (2017). Rethinking use and trade of pelagic sharks from Brazil. *Marine Policy*, 85, 114-122.

Batista, V. S. Aspectos quantitativos da fecundidade e do desenvolvimento embrionário da raia *Zapteryx brevirostris* Müller and Henle, 1841 (Pisces, Rhinobatidae) da Enseada de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Biologia*, 51(3), 495-501, 1991.

Bezerra, M. F., Lacerda, L. D., & Lai, C. T. (2019). Trace metals and persistent organic pollutants contamination in batoids (Chondrichthyes: Batoidea): A systematic review. *Environmental Pollution*, 248, 684-695.

Bornatowski, H., Abilhoa, V., & Freitas, M. O. (2005). Alimentação da raia-viola *Zapteryx brevirostris* na baía de Ubatuba-Enseada, São Francisco do sul, Santa Catarina, Brasil. *Estudos de Biologia*, 27(61).

Bornatowski H, Braga RR, Vitule JRS (2014). Threats to sharks in a developing country: the need for effective simple conservation measures. *Natureza e Conservação*, 12(1):11–18

Bornatowski H., Braga R.R., Barreto R.P. (2018) Elasmobranchs Consumption in Brazil: Impacts and Consequences. In: Rossi-Santos M., Finkl C. (eds) *Advances in Marine Vertebrate Research in Latin America*. Coastal Research Library, vol 22. Springer, Cham.

Braccini, J. M., Hamlett, W. C., Gillanders, B. M., & Walker, T. I. (2007). Embryo development and maternal–embryo nutritional relationships of piked spurdog (*Squalus megalops*). *Marine Biology*, 150, 727–737.

Buddle, A. L., Otway, N. M., Van Dyke, J. U., Thompson, M. B., Murphy, C. R., Dowland, S. N., ... Whittington, C. M. (2020). Structural changes to the uterus of the dwarf ornate wobbegong shark (*Orectolobus ornatus*) during pregnancy. *Journal of Morphology*.

- Callard, I. P., & Koob, T. J. (1993). Endocrine regulation of the elasmobranch reproductive tract. *Journal of Experimental Zoology*, 266(5), 368-377.
- Caltabellotta, F. P., Siders, Z. A., Murie, D. J., Motta, F. S., Cailliet, G. M., & Gadig, O. B. (2019). Age and growth of three endemic threatened guitarfishes *Pseudobatos horkelii*, *P. percellens* and *Zapteryx brevirostris* in the western South Atlantic Ocean. *Journal of fish biology*, 95(5), 1236-1248.
- Camhi, M. (1998). *Sharks and their relatives: ecology and conservation* (No. 20). IUCN.
- Carmo, W. P., Fávaro, L. F., & Coelho, R. (2018). Age and growth of *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii: Rhinobatidae) in southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 16(1).
- Chaves, P. D. T. D. C., Almeida, M. P. D., & Platner, M. (2019). Tubarões e raias como captura incidental na pesca artesanal do litoral do Paraná: condição reprodutiva e variações sazonais em composição e abundância. LABOMAR Arquivos de Ciências do Mar.
- Charvet-Almeida, P., Araújo, M. D., & Almeida, M. P. D. (2005). Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 165-171.
- Cisneros-Montemayor, A. M., Barnes-Mauthe, M., Al-Abdulrazzak, D., Navarro-Holm, E., & Sumaila, U. R. (2013). Global economic value of shark ecotourism: implications for conservation. *Oryx*, 47(3), 381-388.
- Colonello, J. C.; García, M. L.; Menni, R. C. (2011). Reproductive biology of the lesser guitarfish *Zapteryx brevirostris* from the south - western Atlantic Ocean. *Journal of Fish Biology*, v. 78, n. 1, p. 287-302.
- Compagno, L. J. V., Dando, M., & Fowler, S. (2005). A field guide to the Sharks of the World. Save Our Seas Foundation.
- Conrath, C. L., & Musick, J. A. (2012). Reproductive biology of elasmobranchs. *Biology of sharks and their relatives*, 2, 291-311.
- Cortés, E. (2000). Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299–344.
- Cortés, E. (2004). Life history patterns, demography, and population dynamics. *Biology of sharks and their relatives*, Jeffrey E. Carrier, John A. Musick and Michael R. Heithaus (eds). 449-469.
- Costa, L., & Chaves, P. D. T. D. C. (2006). Elasmobrânquios capturados pela pesca artesanal na costa sul do Paraná e norte de Santa Catarina, Brasil. *Biota Neotropica*, 6(3), 0-0.
- D'Alberto, B. M., Carlson, J. K., Pardo, S. A., & Simpfendorfer, C. A. (2019). Population productivity of shovelnose rays: Inferring the potential for recovery. *PloS one*, 14(11), e0225183.

- Demski, L. S. (1989). Pathways for GnRH control of elasmobranch reproductive physiology and behavior. *Journal of Experimental Zoology*, 252(S2), 4-11.
- Dent, F & Clarke, S. (2015). State of the global market for shark products. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 590*. FAO, Rome. p 187. <http://www.fao.org/3/a-i4795e.pdf>.
- DiBartola, S. P. (2011). *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Didier, D. A., Kemper, J. M., & Ebert, D. A. (2012). Phylogeny, biology, and classification of extant holocephalans. J.C. Carrier, J.A. Musick, M.R. Heithaus (Eds.), *Biology of Sharks and their Relatives*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 97-122.
- Di Santo V, Tran AH, Svendsen JC (2016a) Progressive hypoxia decouples activity and aerobic performance of skate embryos. *Conservation Physiology*, 4(1): cov067.
- Di Santo, V. (2016b). Ocean acidification exacerbates the impacts of global warming on embryonic little skate, *Leucoraja erinacea* (Mitchill). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 463, 72-78.
- Di Santo, V. (2016c). Intraspecific variation in physiological performance of a benthic elasmobranch challenged by ocean acidification and warming. *Journal of Experimental Biology*, 219(11), 1725-1733.
- Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. A., Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., ... & Pollock, C. M. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *elife*, 3, e00590.
- Dulvy, N. K., Simpfendorfer, C. A., Davidson, L. N. K., Fordham, S. V., Bräutigam, A., Sant, G., & Welch, D. J. (2017). Challenges and Priorities in Shark and Ray Conservation. *Current Biology*, 27(11), R565–R572.
- Elisio, M., Awruch, C. A., Massa, A. M., Macchi, G. J., & Somoza, G. M. (2019). Effects of temperature on the reproductive physiology of female elasmobranchs: The case of the narrownose smooth-hound shark (*Mustelus schmitti*). *General and comparative endocrinology*, 284, 113242.
- Ellis, M. T., & Otway, N. M. (2011). Uterine fluid composition of the dwarf ornate wobbegong shark (*Orectolobus ornatus*) during gestation. *Marine and Freshwater Research*, 62, 576–582.
- Evans, D. H., Oikari, A., Kormanik, G. A., & Mansberger, L. (1982). Osmoregulation by the prenatal spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *Journal of Experimental Biology*, 101(1), 295-305.
- Farese Jr, R. V., & Herz, J. (1998). Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends in genetics*, 14(3), 115-120.
- Fasano, S., d'Antonio, M., Pierantoni, R., & Chieffi, G. (1992). Plasma and follicular tissue steroid levels in the elasmobranch fish, *Torpedo marmorata*. *General and comparative Endocrinology*, 85(2), 327-333.

- Ferretti, F., Jacoby, D. M., Pflieger, M. O., White, T. D., Dent, F., Micheli, F., ... & Block, B. A. (2020). Shark fin trade bans and sustainable shark fisheries. *Conservation Letters*, 13(3), e12708.
- Figueiredo J. L. (1997). Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. I. Introdução: Cações, raias e quimeras. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.
- Files, T., & Lombardi, J. (1993). Free amino acids in the uterine fluids of four species of viviparous sharks (*Squalus acanthias*, *Carcharhinus plumbeus*, *Mustelus Canis* and *Rhizoprionodon terraenovae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 104(3), 583–588.
- Finotto, L., Walker, T. I., & Reina, R. D. (2021). Prolonged alteration of neonate traits following maternal exposure to fishing-capture stress during late pregnancy in a chondrichthyan species. *Frontiers in Marine Science*, 8, 117.
- Fishbase, (2020). Froese, R. e D. Pauly. Editores. 2019.FishBase.Publicação eletrônica na World Wide Web. www.fishbase.org, (12/2019). Acessado em 25 de Junho de 2020: <https://www.fishbase.se/summary/14141>
- Fujinami, Y., & Semba, Y. (2020). Non-lethal assessment of reproductive stage for female blue sharks *Prionace glauca* using sex steroid hormones. *Journal of Fish Biology*.
- Gallagher, A. J., & Hammerschlag, N. (2011). Global shark currency: the distribution, frequency, and economic value of shark ecotourism. *Current Issues in Tourism*, 14(8), 797–812.
- Gallagher, A. J., Serafy, J. E., Cooke, S. J., & Hammerschlag, N. (2014). Physiological stress response, reflex impairment, and survival of five sympatric shark species following experimental capture and release. *Marine Ecology Progress Series*, 496, 207-218.
- Gallagher, A. J., Skubel, R. A., Pethybridge, H. R., & Hammerschlag, N. (2017). Energy metabolism in mobile, wild-sampled sharks inferred by plasma lipids. *Conservation physiology*, 5(1).
- Garcia-Garrido, L., Munoz-Chapuli, R., & Andres, A. V. (1990). Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *Journal of Fish Biology*, 36(4), 499–509.
- Gelsleichter, J., Walsh, C. J., Szabo, N. J., & Rasmussen, L. E. (2006). Organochlorine concentrations, reproductive physiology, and immune function in unique populations of freshwater Atlantic stingrays (*Dasyatis sabina*) from Florida's St. Johns River. *Chemosphere*, 63(9), 1506-1522.
- Gervais, C. R., Nay, T. J., Renshaw, G., Johansen, J. L., Steffensen, J. F., & Rummer, J. L. (2018). Too hot to handle? Using movement to alleviate effects of elevated temperatures in a benthic elasmobranch, *Hemiscyllium ocellatum*. *Marine Biology*, 165(11), 162.
- Gervais, C. R., Nay, T. J., Renshaw, G., Johansen, J. L., Steffensen, J. F., & Rummer, J. L. (2018). Too hot to handle? Using movement to alleviate effects of elevated

temperatures in a benthic elasmobranch, *Hemiscyllium ocellatum*. *Marine Biology*, 165(11), 162.

Gilbert, P. W. 1958. The ability of yolk-sac stage dogfish pups to survive outside the uterus. *Bull. Mt. Desert Is. Biol. Lab.*, 1959:68

Guida, L., Awruch, C., Walker, T. I., & Reina, R. D. (2017). Prenatal stress from trawl capture affects mothers and neonates: a case study using the southern fiddler ray (*Trygonorrhina dumerilii*). *Scientific Reports*, 7, 46300.

Gupta, T., Booth, H., Arlidge, W., Rao, C., Manoharakrishnan, M., Namboothri, N., ... & Milner-Gulland, E. J. (2020). Mitigation of elasmobranch bycatch in trawlers: A case study in Indian fisheries. *Frontiers in Marine Science*, 7, 571.

Haas, A. R., Fedler, T., & Brooks, E. J. (2017). The contemporary economic value of elasmobranchs in The Bahamas: Reaping the rewards of 25 years of stewardship and conservation. *Biological conservation*, 207, 55-63.

Hamlett, W. C., & Hysell, M. K. (1998). Uterine specializations in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 282, 438–459.

Hamlett, W. C., Hysell, M. K., Galvin, J., & Spieler, R. (1998). Reproductive accommodations for gestation in the atlantic guitarfish, *Rhinobatos lentiginosus*, Rhinobatidae. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 199-208.

Hammerschlag, N. (2006). Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39(3), 209-228.

Hedges, S. B.; Kumar, S (Editors). (2009). *The Timetree of Life*. Heinicke, M.P., Gavin, J.P.N., Hedges, B . *Cartilaginous Fishes (Chondrichthyes)*. Foreword by James D. Watson Oxford University Press, New York. 551 pages.

Heithaus MR, Frid A, Wirsing AJ, Worm B (2008) Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4):202–210

Henningsen, A. D., Murru, F. L., Rasmussen, L. E. L., Whitaker, B. R., & Violetta, G. C. (2008). Serum levels of reproductive steroid hormones in captive sand tiger sharks, *Carcharias taurus* (Rafinesque), and comments on their relation to sexual conflicts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(4), 437.

Hoffmayer, E. R., Sulikowski, J. A., Hendon, J. M., & Parsons, G. R. (2010). Plasma steroid concentrations of adult male Atlantic sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the northern Gulf of Mexico, with notes on potential long-term shifts in reproductive timing. *Environmental biology of fishes*, 88(1), 1-7.

Hoffmayer, E. R., Hendon, J. M., Parsons, G. R., Driggers, W. B., & Campbell, M. D. (2015). A comparison of single and multiple stressor protocols to assess acute stress in a coastal shark species, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish physiology and biochemistry*, 41(5), 1253-1260.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (2016). Avaliação do risco de extinção dos elasmobrânquios e quimeras no Brasil: 2010-2012. https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/trabalhos_tecnico_s/pub_2016_avaliacao_elasmo_2010_2012.pdf. Acessado em 12 de Setembro de 2020.

IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>. Download em 29 de Março de 2021.

Johnson, M. S., Kraver, D. W., Renshaw, G. M., & Rummer, J. L. (2016). Will ocean acidification affect the early ontogeny of a tropical oviparous elasmobranch (*Hemiscyllium ocellatum*)?. *Conservation physiology*, 4(1), cow003.

Jones, R. T., & Price, K. S. (1967). *A Method for Maintaining Spiny Dogfish, Squalus acanthias, Pups Artificially*. *Copeia*, 1967(2), 471.

Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., & Matthews, S. G. (2006). Fetal programming of hypothalamo - pituitary - adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of physiology*, 572(1), 31-44.

Kormanik, G. A., & Evans, D. H. (1986). The acid-base status of prenatal pups of the dogfish, *Squalus acanthias*, in the uterine environment. *Journal of experimental biology*, 125(1), 173-179.

Kormanik, G. A. (1988). Time course of the establishment of uterine seawater conditions in late-term pregnant spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Journal of Experimental Biology*, 137(1), 443-456.

Kormanik, G. A. (1993). Ionic and osmotic environment of developing elasmobranch embryos. *Environmental Biology of Fishes*, 38(1-3), 233-240.

Larsson, Å., & Fänge, R. (1977). Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 57(3), 191-196.

Last, P., Naylor, G., Séret, B., White, W., de Carvalho, M., & Stehmann, M. (Eds.). (2016). *Rays of the World*. CSIRO publishing.

Leigh, S. C., Papastamatiou, Y., & German, D. P. (2017). The nutritional physiology of sharks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27(3), 561-585.

Lessa, R.P.T, Vooren, C.M, Araújo, M.L.G, Kotas J.E, Almeida, P.C, Rincón, G, Santana, F.M, Gadig, O.B.F, Sampaio, C. (2005). Plano Nacional de ação para a conservação de o manejo dos estoques de peixes elasmobrânquios no Brasil. Recife, 100.

Lyons, K., & Wynne-Edwards, K. E. (2019). Steroid concentrations in maternal serum and uterine histotroph in round stingrays (*Urolophus halleri*). *General and comparative endocrinology*, 274, 8-16.

Manire CA, Rasmussen LEL, Gross TS. (1999). Serum steroid hormones including 11-ketotestosterone, 11-ketoandrostenedione, and dihydroprogesterone in juvenile and adult bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *Journal of Experimental Zoology*, 284(5):595-603.

- Manire, C., Hueter, R., Hull, E., & Spieler, R. (2001). Serological changes associated with gill-net capture and restraint in three species of sharks. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130(6), 1038-1048.
- Manire CA, Rasmussen LEL, Maruska KP, Tricas TC. (2007). Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148(4):926-935.
- Marion, C., Vaske-Junior, T., Gadig, O. B. F., & Martins, I. A. (2011). Feeding habits of the shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Müller and Henle, 1841) (Elasmobranchii, Rhinobatidae) in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 71(1), 83-89.
- Martins, M. F., Costa, P. G., & Bianchini, A. Maternal transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in an endangered elasmobranch, the Brazilian guitarfish. *Chemosphere*, 263, 128275.
- Myers, R. A., Baum, J. K., Shepherd, T. D., Powers, S. P., & Peterson, C. H. (2007). Cascading Effects of the Loss of Apex Predatory Sharks from a Coastal Ocean. *Science*, 315(5820), 1846–1850.
- Meylan, S., Miles, D. B. & Clobert, J.(2012). Hormonally mediated maternal effects, individual strategy and global change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 367.
- Moon-Grady, A. J., Hirose, S., Kesby, G., Menahem, S., & Tworetzky, W. (2010). The fetus as a cardiac patient: assessment and therapy of cardiovascular pathology before birth. *International journal of pediatrics*.
- Moore, A. B. (2017). Are guitarfishes the next sawfishes? Extinction risk and an urgent call for conservation action. *Endangered Species Research*, 34, 75-88.
- Moyes, C. D., Fragoso, N., Musyl, M. K., Brill, R. W. Predicting postrelease survival in large pelagic fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135(5), 1389-1397, 2006.
- Mull CG, Lowe CG, Young KA. (2010). Seasonal reproduction of female round stingrays (*Urobatis halleri*): steroid hormone profiles and assessing reproductive state. *General and Comparative Endocrinology* 166(2):379-387.
- Navia, A. F., Cruz-Escalona, V. H., Giraldo, A., & Barausse, A. (2016). The structure of a marine tropical food web, and its implications for ecosystem-based fisheries management. *Ecological modelling*, 328, 23-33.
- Needham, J., & D. M. Needham, 1930. Nitrogen excretion in selachian ontogeny ontogeny. *Journal of Experimental Biology.*, 7: 7-18.
- Neves KR, Graciolli FG, Dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moyses RM, Jorgetti V (2004) Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int*, 66(6):2237–2244.
- Pacoureau, N., Rigby, C.L., Kyne, P.M. *et al.* (2021). Half a century of global decline in oceanic sharks and rays. *Nature* **589**, 567–571.

Pasquino, F.A & O.B. Gadig (2018). Embryonic development of the shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841) (Chondrichthyes, Trygonorrhinidae), from southeastern Brazil, western South Atlantic. p 320. Sharks International Conference (2018 : João Pessoa-PB). Abstract book Sharks International Conference, de 03 a 08 de junho de 2018 / Cyntia Rafaela Ferreira de Moraes ... [et al.]. - João Pessoa : Editora UFPB, 2018. 468 p. ISBN: 978-85-237-1396-6.

Plano Nacional para Conservação de Tubarões e Raias Marinhos Ameaçados de Extinção (PAN-Tubarões/ICMBio 2014). <http://www.fao.org/3/a-az634o.pdf>. Acessado em 12 de Setembro de 2020.

Pollack, RN & Divon, MY.(1992). "Intrauterine growth retard: definition, rating, and etiology", *Clinical Obstetrics and Gynecology* , vol. 35, não. 1, pp. 99–107.

Portaria MMA N° 445, de 17 de Dezembro DE 2014. https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao-ARQUIVO/00-saiba-mais/05_-_PORTARIA_MMA_N%C2%BA_445_DE_17_DE_DEZ_DE_2014.pdf. Acessado em 12 de Setembro de 2020.

Prado, A.C. (2018). Estresse de captura em *Zapteryx brevirostris* (Muller e Henle, 1841) (Elasmobranchii, Rhinobatidae) machos durante o período reprodutivo: consequências nutricionais e reprodutivas e impactos para uma conservação. Monografia, Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Price, K. S., Jr, and Daiber, F. C. (1967). Osmotic environments during fetal development of dogfish, *Mustelus canis* (Mitchill) and *Squalus acanthias* Linnaeus, and some comparisons with skates and rays. *Physiological Zoology*, 40, 248–260.

Rangel, B., Hussey, N. E., Niella, Y., Martinelli, L. A., Gomes, A. D. O., & Moreira, R. G. (2020a). Neonatal nutritional strategy of a viviparous elasmobranch with extremely low reproductive output. *Marine Ecology Progress Series*, 638, 107-121.

Rangel, B., de Castro Ribeiro, D., Chagas, J. M. A., Spada, L., Moreira, R. G., & da Silva Ribeiro, C. (2020b). Effects of biological traits on capture-induced parturition in a freshwater stingray and perspectives for species management. *Journal of Fish Biology*, 97(2), 546-551.

Read, L. J. (1968). Urea and Trimethylamine oxide levels in elasmobranch embryos. *The Biological Bulletin*, 135(3), 537–547.

Rincon, G., & Vooren, C. M. (2007). A record of abortion in the school shark *Galeorhinus galeus* (Carcharhiniformes, Triakidae) captured on the continental shelf off southern Brazil. *Journal of Aquatic Sciences*, 2, 53-54.

Rolim, F. A., Rotundo, M. M., & Vaske-Júnior, T. (2015). Notes on the reproductive biology of the Brazilian electric ray *Narcine brasiliensis* (Elasmobranchii: Narcinidae). *Journal of Fish Biology*, 89(1), 1105–1111.

Rodrigues, A. F. S., de Sousa Rangel, B., Wosnick, N., Bornatowski, H., Santos, J. L., Moreira, R. G., & de Amorim, A. F. (2018). Report of injuries in batoids caught in small-scale fisheries: implications for management plans. *Oecologia Australis*, 23(1).

- Rosa, R., Baptista, M., Lopes, V. M., Pegado, M. R., Ricardo Paula, J., Trübenbach, K., ... & Repolho, T. (2014). Early-life exposure to climate change impairs tropical shark survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1793), 20141738.
- Santos, C., Cortellete, G. M., Araújo, 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 Biologica Leopondensia*, 28(1), 32-37.
- Schluessel, V., Giles, J., & Kyne, P. M. (2015). Notes on female reproductive biology and embryos of the brown guitarfish *Rhinobatos schlegelii* from the Penghu Islands, Taiwan. *Ichthyological Research*, 62(3), 347-350.
- Shang, E. H., & Wu, R. S. (2004). Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environmental science & technology*, 38(18), 4763-4767.
- Shiffman, D. S., & Hammerschlag, N. (2016). Shark conservation and management policy: a review and primer for non-specialists. *Animal Conservation*, 19(5), 401-412.
- Simpfendorfer, C. A., & Dulvy, N. K. (2017). Bright spots of sustainable shark fishing. *Current Biology*, 27(3), R97-R98.
- Skomal, G. B. (2007). Evaluating the physiological and physical consequences of capture on post-release survivorship in large pelagic fishes. *Fisheries Management and Ecology*, 14, 81-89.
- Skomal, G., & Bernal, D. (2010). Physiological responses to stress in sharks. *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, 459-490.
- Skomal, G. B., Mandelman, J. W. (2012). The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: a review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 162, 146–155.
- Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K., & Walker, P. A. (2000). The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 476-494.
- Takatsuka, V., dos Santos, A. P., de Souza, S. H., Sonne, L., de Azevedo, V. G., & Sanches, E. G. (2019). Resilience of the shortnose guitarfish (*Zapteryx brevirostris*): complete compensatory gain, hematology and histopathology. *Boletim do Instituto de Pesca*, 45(2).
- Thorson, T. B., & Gerst, J. W. (1976). Comparison of some parameters of serum and uterine fluid of pregnant, viviparous sharks (*Carcharhinus leucas*) and serum of their near-term young. *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes*, 46.
- Tolotti, M. T., Filmler, J. D., Bach, P., Travassos, P., Seret, B., & Dagorn, L. (2015). Banning is not enough: The complexities of oceanic shark management by tuna regional fisheries management organizations. *Global Ecology and Conservation*, 4, 1-7.

- Tomita, T., Cotton, C. F., & Toda, M. (2016). Ultrasound and physical models shed light on the respiratory system of embryonic dogfishes. *Zoology*, *119*(1), 36-41.
- Tricas, T. C., Maruska, K. P., & Rasmussen, L. E. L. (2000). Annual cycles of steroid hormone production, gonad development, and reproductive behavior in the Atlantic stingray. *General and comparative endocrinology*, *118*(2), 209-225.
- Vooren, C.M., Lamónaca, A.F., Massa, A. & Hozbor, N. (2006). *Zapteryx brevirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006: e.T61419A12478303. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T61419A12478303.en>
- Weigmann, S. (2016). Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, *88*(3), 837-1037.
- Wilson, S. M., Raby, G. D., Burnett, N. J., Hinch, S. G. & Cooke, S. J.(2014). Looking beyond the mortality of bycatch: sublethal effects of incidental capture on marine animals. *Biology Conservation*. 171, 61–72.
- Worm, B. Davis, L. Ketteimer, C.A. Ward-Paige, D. Chapman, M.R. Heithaus, S.T. Kesseld, S.H. Gruber. (2013). Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy*, *40*, pp. 194-204
- Wosnick, N., & Freire, C. A. (2013). Some euryhalinity may be more common than expected in marine elasmobranchs: The example of the South American skate *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii, Rajiformes, Rhinobatidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *166*(1), 36-43, 2013.
- Wosnick, N., Adams, K. R., & Freire, C. A. (2018). Ultrasonography as a promising methodology to indicate captured - induced abortion in viviparous elasmobranchs. *Journal of fish biology*, *93*(6), 1033-1037.
- Wosnick, N., Awruch, C. A., Adams, K. R., Gutierrez, S. M. M., Bornatowski, H., Prado, A. C., & Freire, C. A. (2019a). Impacts of fisheries on elasmobranch reproduction: high rates of abortion and subsequent maternal mortality in the shortnose guitarfish. *Animal Conservation*, *22*(2), 198-206.
- Wosnick, N., Moro Rios, R., Rincon, G., & Silva Nunes, J. L. (2019b). Evidence of tide pool use by a viviparous elasmobranch as a parturition. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *49*(1).
- Wourms, J. P. (1994). The challenges of piscine viviparity. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, *40*(3-4), 551-568.
- Wourms, J. P., & Demski, L. S. (1993). The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future prospects. In *The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes* (pp. 7-21). Springer, Dordrecht.
- Young, I. R., Renfree, M. B., Mesiano, S., Shaw, G., Jenkin, G., & Smith, R. (2011). The comparative physiology of parturition in mammals: hormones and parturition in mammals. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 95-116). Academic Press.

Zagaglia, C. R., Damiano, C., Hazin, F. H. V., & Broadhurst, M. K. (2010). Reproduction in *Mustelus canis* (Chondrichthyes: Triakidae) from an unexploited population off northern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(1), 25–29.