UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

NATALIA CARVALHO FABRICIO DA SILVA

Análise de substratos energéticos de filhotes de *Potamotrygon amandae* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) em diferentes estágios de desenvolvimento

Ilha Solteira
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

NATALIA CARVALHO FABRICIO DA SILVA

Análise de substratos energéticos de filhotes de *Potamotrygon amandae* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) em diferentes estágios de desenvolvimento

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Profª. Drª. Cristiéle da Silva Ribeiro
Orientadora

Ilha Solteira
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Silva, Natalia Carvalho Fabricio da.
S586a Análise de substratos energéticos de filhotes de Potamotrygon amandae (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) em diferentes estágios de desenvolvimento / Natalia Carvalho Fabricio da Silva. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
30 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Cristiéle da Silva Ribeiro
Inclui bibliografia

1. Metabolismo. 2. Histotrofia lipídica. 3. Raias dulciaquícolas. 4. Transferência materno-fetal.

Erika Renata Bocchi Lomba
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Supervisora Técnica de Seção
CRB/8 -10792

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

"Análise de substratos energéticos de filhotes de *Potamotrygon amandae* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) em diferentes estágios de desenvolvimento"

NATALIA CARVALHO FABRICIO DA SILVA

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

ARTIGO 25° - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máximo de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo, o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

ARTIGO 24° - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO ou REPROVADO.

COMISSÃO EXAMINADORA

1º EXAMINADOR (Orientador-Presidente)
Nome: Profa Dra Cristiéle da Silva Ribeiro

2º EXAMINADOR
Nome: Prof. Dr. Igor Paiva Ramos

3º EXAMINADOR
Nome: Doutoranda Laís Pedroso Borges

CONCEITO

X APROVADO

REPROVADO

Ilha Solteira-SP, 09 de janeiro de 2023.

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
Cursos: Engª Agronômica, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabx (18) 3743 1000 fax (18) 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

Scanned with CamScanner

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas avós, Guilhermina e Rosa (*in memoriam*). Sei que de onde as senhoras estiverem, sentem muito orgulho de mim e estão sempre guiando meus passos. As senhoras sempre estarão comigo no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre escrever certo por linhas tortas. Hoje entendo que tudo tem seu tempo, que estou onde deveria estar e é tudo graças à Ele.

Aos meus pais, Marina e Adelino: vocês sempre foram minha maior força e fonte de inspiração, se hoje sou quem sou devo tudo a vocês. Obrigada por não desistirem de mim nunca, sempre apoiarem meus sonhos e aplaudirem as minhas conquistas. Eu amo vocês incondicionalmente!

À minha tia Irene e minha irmã Amanda, sem dúvidas vocês são grande parte do meu processo de vida. Obrigada por todo apoio, seja financeiro ou emocional. Vocês sempre serão extremamente importantes para mim.

Ao meu namorado, Deyvid: serei sempre grata por todo amor, apoio, incentivo, carinho, colo e comidinhas. Mas, principalmente, agradeço por sempre me colocar para cima nos momentos difíceis e por toda sua fé em mim (mesmo quando nem eu mesma acreditava). Vida, eu te amo muito!

Minha eterna gratidão à a minha orientadora, Cristiéle. Obrigada por toda orientação, paciência e sempre estar disponível para me ajudar no que fosse. Você é meu maior exemplo profissional e sem dúvidas é um grande exemplo pessoal para mim, graças a você me apaixonei por fisiologia e encontrei o que quero fazer para o resto da vida.

Aos amigos de Ilha Solteira, em especial ao Vitor (Iskizito), Paulo, Maria Carolina (Ruela) e Bharbara (Damares): obrigada por sempre estarem ali por mim e para mim, seja com um ombro amigo, uma conversa boa, uma cervejinha gelada e até mesmo uma bronca. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil e menos divertida. Onde quer que eu vá, levarei vocês no meu coração sempre.

Aos amigos de Andradina, em especial a Fernanda e a tia Elaine: vocês são parte da família que eu escolhi. Obrigada por mesmo distantes, estarem sempre presentes. Vocês são meus maiores exemplos que família nem sempre tem a ver com laços sanguíneos e sim laços de alma.

Aos companheiros de república, Letícia e Vinícius: obrigada por todos os cafés e fofocas na mesa de casa, por todas as risadas e conselhos. Essa jornada foi muito mais leve com a presença constante de vocês.

Agradeço a todos os integrantes do LEFISA, ao Me. Douglas Castro Ribeiro e a Guarda Municipal de Ilha Solteira (em especial ao Luís): obrigada por toda ajuda nas coletas, por sempre estarem dispostos a ajudar. Vocês são parte desse trabalho.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

(Confúcio)

RESUMO

O estudo do metabolismo de filhotes é essencial para o entendimento do desenvolvimento de uma espécie. Sendo assim, é necessário analisar as estratégias neonatais, interações tróficas e dependência materna; bem como a análise proteica, lipídica e de carboidratos destes filhotes. O objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de armazenamento de substratos energéticos em filhotes de *Potamotrygon amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento. Foram realizadas duas coletas no ano de 2021, em novembro e dezembro, os espécimes foram coletados utilizando rede do tipo tarrafa e posteriormente armazenados em compartimentos contendo água do rio, os dados biométricos dos filhotes foram aferidos e os tecidos retirados. Glicogênio, proteínas e lipídeos dos tecidos vitelínico, hepático e muscular foram analisados por métodos colorimétricos em espectrofotometria. O desenvolvimento dos filhotes foi evidente entre os meses de novembro e dezembro, independentemente do tamanho materno. O aumento de massa dos filhotes evidenciado em dezembro em relação à novembro coincidiu com o aumento da concentração de proteínas no tecido muscular. O tecido hepático mostrou-se como a principal fonte de armazenamento lipídico dos filhotes, além de um aumento significativo da massa seca e glicogênio hepáticos, sinal claro de preparo para a vida extrauterina dos filhotes. A ausência do tecido vitelínico em dezembro evidencia o consumo do vitelo pelos filhotes e o início da histrotofia lipídica, sendo possível evidenciar o desenvolvimento dos filhotes.

Palavras-chave: Metabolismo. Histotrofia lipídica. Raias dulciaquícolas. Transferência materno-fetal.

ABSTRACT

The study of embryo metabolism is essential for understanding the development of the species. Therefore, it is necessary to analyze neonatal strategies, trophic interactions and maternal dependence; as well as protein, lipid and carbohydrate analysis of these puppies. The objective of this work was to investigate the storage pattern of energy substrates in *Potamotrygon amandae* at different stages of development. Two collections were carried out in 2021, in November and December, the specimens were collected using fishing nets and later stored in compartments containing river water, the biometric data of the puppies were measured and the tissues extracted. The energetic substrates of vitelline, hepatic and muscular tissues were analyzed by colorimetric methods in spectrophotometry. The development of the pups was evident between the months of November and December, regardless of maternal size. The increase in pup mass seen in December compared to November coincided with an increase in protein concentration in muscle tissue. The liver tissue was shown to be the main source of lipid storage in the pups, in addition to a significant increase in dry weight and liver glycogen, a clear sign of preparation for the extrauterine life of the pups. The absence of vitelline tissue in December shows the consumption of calf by the pups and the beginning of lipid histrotrophy, making it possible to show the development of the pups.

Keywords: Metabolism. Lipid histotrophy. Freshwater stingrays. Maternal-fetal transfer.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	10
2	**OBJETIVOS**	13
3	**METODOLOGIA**	13
3.1	*Coletas*	13
3.2	*Análise de substratos energéticos*	15
3.3	*Forma de análise dos resultados*	15
4	**RESULTADOS E DISCUSSÕES**	16
4.1	*Coletas e biometria*	16
4.2	*Fisiologia metabólica*	19
4.2.1	*Tecido hepático*	19
4.2.2	*Tecido muscular*	21
4.2.3	*Tecido vitelínico*	22
5	**CONCLUSÃO**	25
6	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	26

1. INTRODUÇÃO

A Classe Chondrichthyes, que compreendem os animais aquáticos que possuem esqueleto cartilaginoso, se divide em duas subclasses: Holocephali, das quimeras e Elasmobranchii, que abrange tubarões e raias (RICHTER et al., 2000). A classificação das raias se estende à Subdivisão Batoidea e Ordem Myliobatiformes (LOVEJOY, 1996), a que pertence a família Potamotrygonidae, únicos elasmobrânquios que possuem adaptações que os tornam capazes de viver em ambiente dulcícola; com 30 espécies (LUCIFORA et al., 2015; CARVALHO, 2016). Os representantes desta família são naturalmente encontrados somente na América do Sul (ROSA, 1985), em rios que drenam o oceano Atlântico e o mar Caribenho, estando ausentes na bacia do rio São Francisco, nos rios que drenam a mata Atlântica no nordeste e sudeste brasileiro, nos rios da alta bacia do Paraná e nos rios argentinos localizados abaixo da drenagem do rio de La Plata (CARVALHO et al., 2003).

A adaptação do ancestral da família Potamotrygonidae em ambientes dulcícolas ocorreu há cerca de 20 milhões de anos, com análises filogenéticas e genéticas populacionais que apresentaram ao menos cinco linhagens evolutivas distintas, ao analisarem conjuntamente as espécies *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina* (RIBEIRO, 2007). As adaptações para o ambiente de água doce englobam especializações morfológicas e fisiológicas, incluindo glândula retal reduzida e captação ativa de eletrólitos através dos rins e brânquias, além de baixas concentrações de ureia plasmática. Tais adaptações fazem com que as espécies dulcícolas apresentem sistema osmorregulatório comparado aos peixes teleósteos de água doce (LUCIFORA et al., 2015).

Apesar da família Potamotrygonidae contar com espécimes em abundância, a escassez de informações acerca desta família é evidente, o que torna inviável a criação de um plano de conservação (MARTINS e JARDIM, 2018). *Potamotrygon amandae*, espécie estudada neste trabalho, é classificada na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature) como “data deficient”, faltando dados para a classificação de seu estado de conservação. Ainda, de acordo com Whitney e Gabler (2008), estudar o papel desempenhado por espécies introduzidas, como as raias, acaba por ser pertinente, pois as informações obtidas ajudarão a implementar

sistemas de manejo adequados para esses ecossistemas e preservar as espécies em seus ambientes nativos.

A ocorrência de espécies da família Potamotrygonidae no alto rio Paraná teve início na década de 70, devido à construção da usina de Itaipu e a inundação do Salto das Sete Quedas em Guaíra, no estado do Paraná, que atuava como barreira natural impedindo que esses animais atingissem a região do alto rio Paraná (GARRONE NETO et. al, 2007). Dentre as espécies da família Potamotrygonidae presentes na região, temos a espécie *Potamotrygon amandae*, que é amplamente distribuída na bacia Paraná-Paraguai. *Potamotrygon amandae* é uma espécie descrita recentemente em estudo que revisou a sistemática de *P. motoro*. A espécie *P. amadae* apresenta coloração marrom-acinzentado e ocelos bicolores (cinza claro ou amarelo claro) com área central rodeada de um anel periférico preto na parte dorsal do disco, na parte ventral do disco há cobertura quase total de coloração predominantemente acinzentado ou marrom escuro (Figura 1). Os dentículos dérmicos são menores e distribuídos por quase toda porção dorsal do disco, e há ausência de placas coronais, apresenta também sulcos labiais bem desenvolvidos nos cantos póstero-laterais da boca (LOBODA e CARVALHO, 2013).

Figura 1 – Fêmea adulta de *Potamotrygon amandae* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). – escala de 5cm.

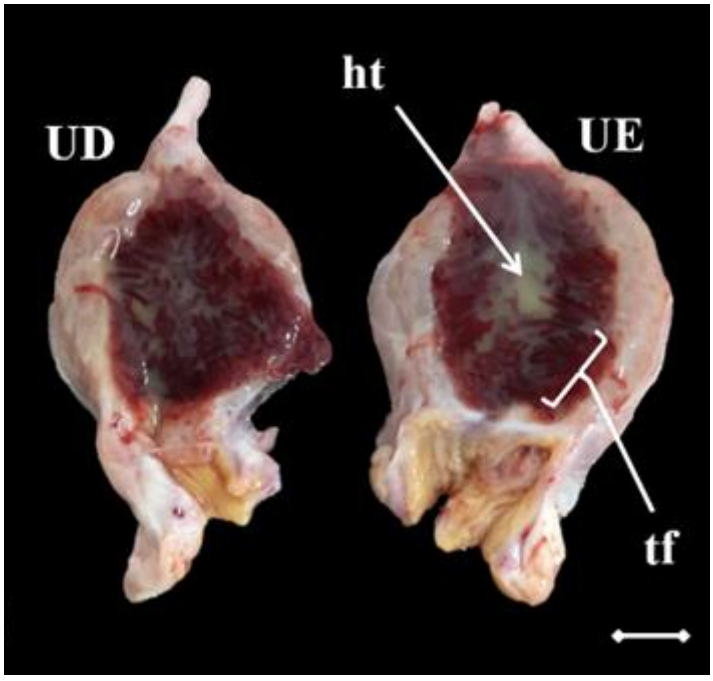
Fonte:Cristiéle Ribeiro.

A grande distribuição geográfica dos elasmobrânquios, se deu, entre outros motivos, pela diversificação das estratégias reprodutivas, classificadas de acordo com os tipos de desenvolvimento embrionário: ovíparo, ovoviviparo e vivíparo. A viviparidade ainda pode ser dividida em aplacentária e placentária, variando com a conexão uterina entre a mãe e o embrião (CARRIER et al., 2012). Por se tratar de um elasmobrânquio vivíparo aplacentário, todo o desenvolvimento fetal das espécies da família Potamotrygonidae ocorre dentro dos úteros (THORSON et al., 1983)

Raias da ordem Myliobatiliformes apresentam histotrofia lipídica, onde embrião já mais desenvolvido, após o esgotamento do saco vitelínico, tem sua nutrição através do histotrofo, um fluido lipídico secretado pela parede uterina, conhecido “leite uterino”. O histotrofo é produzido e liberado pelo trofonema presente no útero das mães, e é sabido que o fluido é produzido logo após a ovulação e continua sua produção até o parto (HAMLETT et al., 1998) (Figura 2). A composição bioquímica deste fluido é bastante específica para cada espécie, contém proteínas únicas que são sintetizadas e excretadas pelo útero, e sabe-se que a mudanças dessas proteínas estão correlacionada com diferentes concentrações de hormônios esteroides (AMESBURY et al., 1999).

A reprodução das raias *P. amandae* ocorrem em ciclos anuais, sendo o estágio de vitelogênese no mês de julho. A cópula ocorre entre os meses de agosto, setembro e outubro, e a gravidez juntamente com o período de partos ocorre entre novembro e março (SPADA, 2021).

Figura 2 – Úteros de fêmea adulta grávida de *Potamotrygon amandae*. Legenda–UD: útero direito; UE: útero esquerdo; ht: histotrofo; tf: trofonema. Barra = 1 cm.



Fonte: Évillyn Santos Zacheo.

O estudo do metabolismo de embriões é essencial para o entendimento do desenvolvimento da espécie. Sendo assim, é necessário analisar as estratégias neonatais, interações tróficas e transferência materno/fetal. Estudos apontam que em raias marinhas das espécies *Rhinoptera bonasus* e *Rhinoptera brasiliensis* há grande investimento energético materno aos filhotes antes do nascimento, consequentemente as condições nutricionais no nascimento são melhores que animais com diferentes estratégias reprodutivas (RANGEL, 2018). Ainda de acordo com Rangel (2018), *R. bonasus* nascem com reserva de ácidos graxos providos pela mãe, perdendo esta reserva gradualmente com o crescimento, o que dá ao filhote melhores condições nutricionais e habilidades de forrageio quando nascem.

Para que uma espécie tenha sucesso em um ambiente que não seja o seu nativo, dentre diversos fatores, ela deve sobreviver e se reproduzir. Portanto, acredita-se que caracterizar a fisiologia metabólica de filhotes de *P. amandae* em ambiente não nativo é importante para se entender o sucesso reprodutivo neste ambiente não natural, uma vez que os estudos envolvendo a espécie são recentes e podem ser importantes como ponto de partida para o conhecimento da biologia da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de armazenamento de substratos energéticos em filhotes de *P. amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento.

2.2 Específicos

- Analisar o perfil de deposição de substratos lipídicos, proteicos, de carboidratos e umidade de filhotes de *P. amandae*;
- Analisar o desenvolvimento de filhotes de *P. amandae* durante dois meses do ciclo de reprodução da espécie.

3. METODOLOGIA

3.1 Coletas

Foram realizadas duas coletas no ano de 2021, nos meses de novembro e dezembro (autorização pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO 81165-1 e cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen A001CBE). As coletas foram realizadas à montante do reservatório da UHE de Jupiá localizado no rio Paraná, especialmente na região da Ilha da Ferradura, que se localiza no munícipio de Itapura-SP (20°23'S; 51°22'O), (figura 3). Foram utilizadas tarrafas como arte de pesca, com esforço de coleta concentrado nos meses mais quentes e com maior pluviosidade do ano, com vistas a acompanhar o processo reprodutivo dos animais. Foram capturadas 3 fêmeas grávidas no mês de novembro e 4 em dezembro, totalizando 7 fêmeas. Dos abortos ocorridos, houve 18 filhotes em novembro e 12 em dezembro.

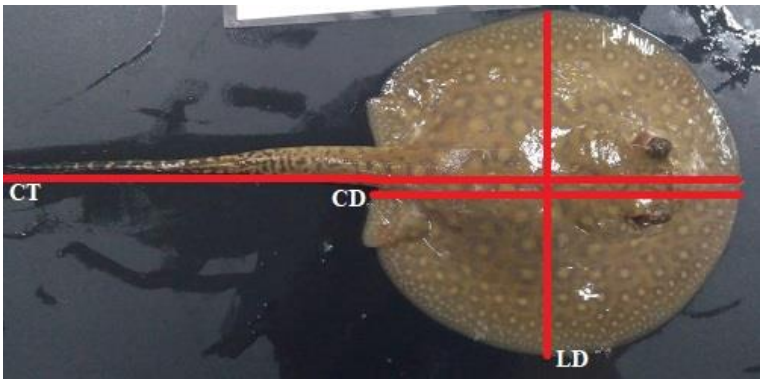
Figura 3 – Região da Ilha da Ferradura 20°23'S; 51°22'O), município de Itapura-SP

Fonte: Marcos Chiquitelli.

Os espécimes foram anestesiados com Eugenol 0,2 g.L-1 por via respiratória (CEUA FEIS 03/2021), individualizados em caixas de polietileno e transportados vivos para o Laboratório de Estudos em Fisiologia Animal (LEFISA) UNESP/Ilha Solteira. Foram aferidos dados biométricos de fêmeas adultas (mães) e dos filhotes coletados. Das mães foram aferidos massa (Kg), largura e comprimento de disco (cm) e comprimento total (cm); dos filhotes foram aferidos massa com e sem a presença saco

vitelino (g), largura e comprimento de disco (cm) e o comprimento total (cm) (figura 4). Os tecidos hepático e muscular dos filhotes foram coletados após eutanásia dos espécimes e acondicionados em microtubos, posteriormente armazenados em freezer -80 ºC até o momento das análises.

Figura 4 – Espécime em posição para aferição dos dados biométricos. (CT: comprimento total; CD: comprimento do disco; LD: largura do disco)



Fonte: Própria autora

3.2 Análise de substratos energéticos

Lipídios Totais: A concentração de lipídios totais foi aferida através do método de Frings et al., (1972). Para extração lipídica dos tecidos utilizou-se o método de Folch et al., (1957) adaptado por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos. Utilizou-se ±100 µg de tecido hepático, ±50 µg de tecido vitelínico e ±100 µg de tecido muscular.

Proteínas Totais: O teor proteico dos tecidos foi aferido pela metodologia proposta por Lowry et al., (1951), após precipitação e solubilização das proteínas totais, segundo metodologia de Milligan e Girard (1993). Utilizou-se ±50 µg de tecido hepático, ±50 µg de tecido vitelínico e ±100 µg de tecido muscular.

Glicogênio: Para a mensuração do teor de glicogênio total no músculo e fígado, foi utilizado o método de Dubois (1956). Esta determinação empregou-se após precipitação e solubilização do glicogênio total segundo metodologia empregada por Bidinotto; Moraes; Gouza (1997). Utilizou-se ±50 µg de tecido hepático, ±50 µg de tecido vitelínico e ±100 µg de tecido muscular.

Massa seca: Mediu-se a partir da remoção da água do tecido por aquecimento, deixando as amostras ainda frescas em estufa a 60 ºC por cerca de 24 horas, até

massa constante, utilizando-se balança analítica de precisão (0,0001 g) (AOAC, 1995). Utilizou-se ±100 µg de cada tecido (hepático, vitelínico e muscular).

3.3 Forma de análise dos resultados

Os dados dos filhotes obtidos em novembro e dezembro foram analisados usando o teste *t* de Student para dados paramétricos ou teste *u* de Mann-Whitney para dados não paramétricos, comparando-se as duas coletas realizadas. Foi utilizado o programa estatístico Sigma Stat for Windows (Version 3.10 Copyright©) para as análises. O nível de significância adotado foi de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coletas e Biometria

Sete fêmeas no período gestacional e com posteriores abortos de filhotes (Figura 5) foram capturadas, Adams et al. (2018), aborda a prevalência de abortos/partos induzidos por captura em elasmobrânquios, o fenômeno foi observado apenas em espécies vivíparas e com maior frequência na Ordem Myliobatiformes. Um artigo recente aborda os efeitos das características biométricas no evento de aborto em *P. amandae*, que apresentou altos índices durante as coletas, variando de estágios iniciais de gestação (presença de ovo) a estágios finais de gestação, com filhotes em diferentes estágios de desenvolvimento (RANGEL et al., 2020).

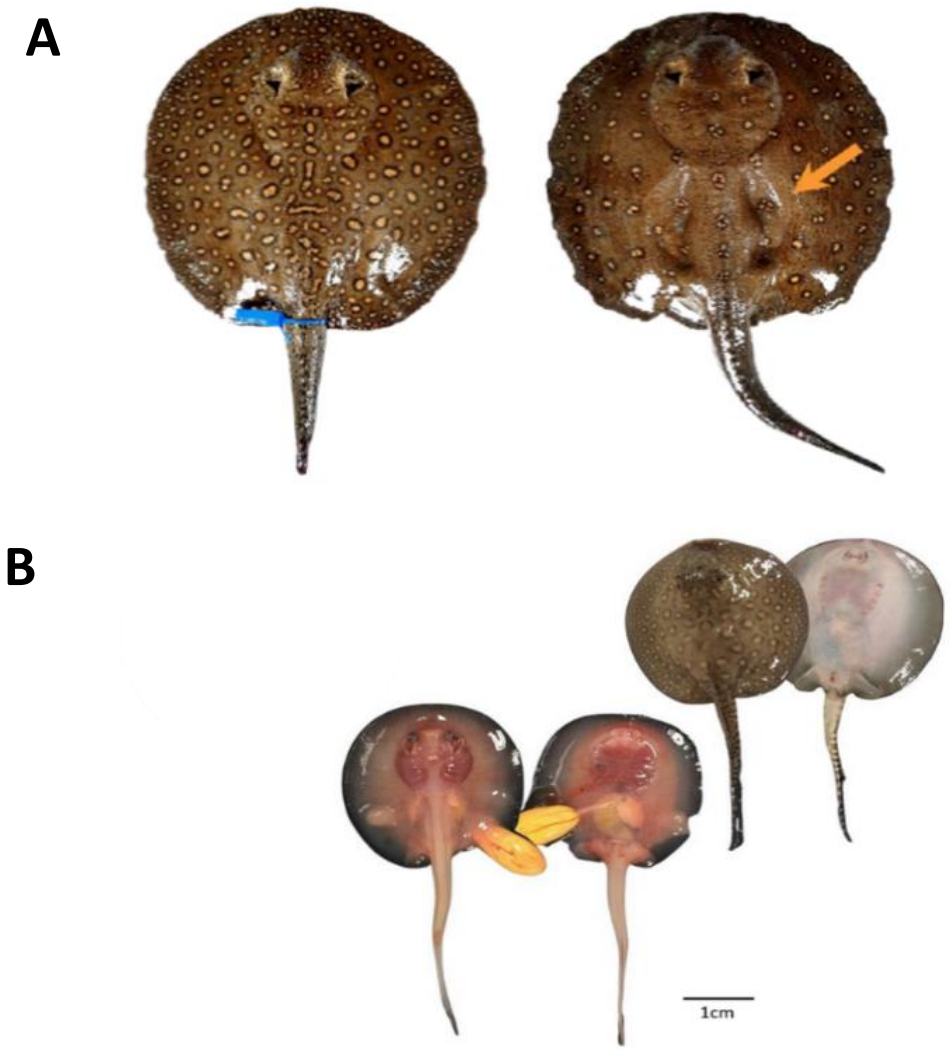
Embriões de raias de água doce nunca sobrevivem, independentemente do estágio de desenvolvimento. Ademais, fêmeas maiores gestaram maior número de filhotes e por consequência, apresentaram a expulsão dos filhotes mais rapidamente durante o final da gravidez. Tanto o aborto, como o parto induzido por captura são afetados por características reprodutivas importantes, tais como o tamanho da ninhada, tamanho materno e estágio de gestação (RANGEL et al., 2020) (figura 5). Neste trabalho o tamanho materno não mostrou diferença estatíststica entre os meses (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados biométricos das fêmeas adultas de *Potamotrygon amandae* (média±desvio padrão).

	Novembro/2021	Dezembro/2021

Número de Fêmeas	3	4
Massa (Kg)	2,8±1,38	2,9±1,94
Comprimento Total (cm)	57,6±10,01	55,0±13,39
Comprimento de Disco (cm)	39,6±7,23	40,313±7,13
Largura de Disco (cm)	35,5±6,5	35,8±7,051

Figura 5 – Fêmea grávida e após aborto/parto induzido por captura (A), seta amarela mostra diminuição do tamanho abdominal após o evento de aborto/parto induzido por captura; e filhotes de *Potamotrygon amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento (B), com saco vitelínico, lado esquerdo, e sem saco vitelínico, lado direito.



Fonte: própria autora

Para a biometria dos filhotes, a massa com saco vitelínico, os animais do mês de novembro apresentaram amplitude (entre o maior e menor animal) de 2,94 a 23,91 g, os animais de dezembro não apresentaram saco vitelínico. Para massa sem saco vitelínico, os animais de novembro apresentaram amplitude de 1,21 a 20,99g, já os animais de dezembro apresentaram amplitude de 23,06 a 56,27g. Para comprimento total, os animais de novembro apresentaram amplitude de 7,50 a 15,32cm, e os animais de dezembro apresentaram amplitude de 3,55 a 8,77cm. Para comprimento de disco, os animais de novembro apresentaram amplitude de 4,10 a 8,30cm, os animais de dezembro apresentaram amplitude de 3,15 a 4,5cm. Para largura de disco, os animais de novembro apresentaram amplitude de 4,10 a 7,46cm, e os animais de dezembro apresentaram amplitude de 3,1 a 4,15cm.

Foi possível observar que os filhotes apresentaram aumento de massa comparando-se os meses de novembro e dezembro (tabela 2). O mês de dezembro apresentou maiores índices de massa corporal, porém os dados de comprimento total, comprimento de disco e largura de disco foram menores estatísticamente; é provável que tal fato tenha ocorrido devido ao menor número de filhotes coletados neste mês ou pela grande amplitude de valores encontrada em todos os parâmetros mensurados.

Tabela 2 – Dados biométricos de filhotes de *Potamotrygon amandae* (média±desvio padrão). [a,b] mostram diferença estatística significativa (P <0,05) entre meses de coleta; * tecido não existente no mês.

	Novembro/2021	Dezembro/2021
Número de Filhotes	18	12
Massa sem vitelo (g)	14,73±7,13[a]	37,2±9,82[b]
Comprimento Total (cm)	10,26±2,31[a]	7,7±5,69[b]
Comprimento de Disco (cm)	6,1±1,53[a]	3,8±3,41[b]
Largura de Disco (cm)	5,8±1,3[a]	3,6±2,63[b]
Massa do Vitelo (g)	1,9±0,81	*

Ao comparar os dados obtidos com os do trabalho realizado por Oliveira et al., (2016), em que foram analisados os dados biométricos de filhotes das espécies *Potamotrygon wallacei*, *P. motoro* e *Paratrygon aiereba,* com relação ao comprimento total [*P. wallacei* (15,8 cm±1,9), *P. motoro* (25,7 cm±4,0) *e P. aiereba* (31,9 cm±6,3)],

é possível observar que os filhotes de *P. amandae* são menores que os filhotes das três espécies, mesmo padrão observado para comprimento de disco [*P. wallacei* (8,1 cm±0,8), *P. motoro* (12,9 cm±1,6) *e P. aiereba* (19,2 cm±2,3)]. Por fim, em relação à massa [*P. wallacei* (35,3 g±10,8), *P. motoro* (131,7 g±57,7) *e P. aiereba* (428,6 g±298,6)] os filhotes de *P. amandae* são, em média, mais pesados que filhotes de *P. wallacei*, e menores quando comparados com filhotes de *P. motoro* e *P. aiereba*.

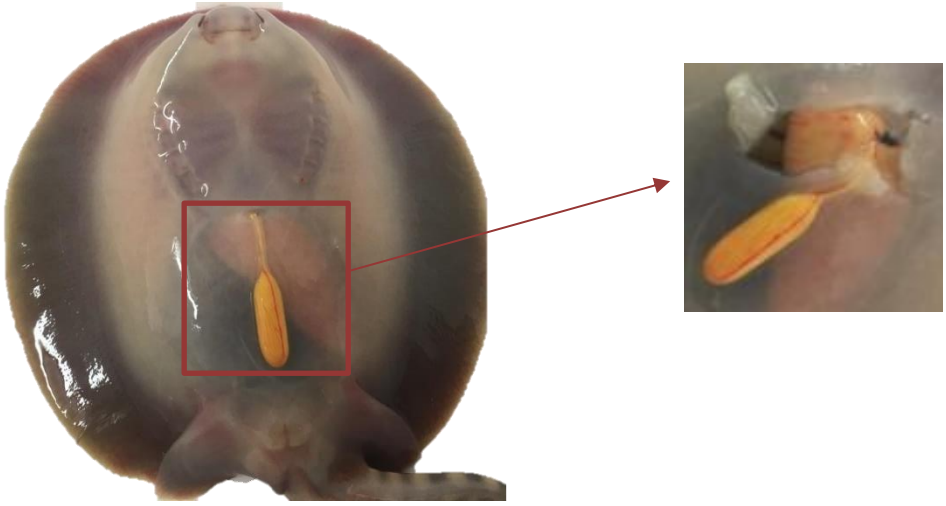
4.2 Fisiologia Metabólica

4.2.1 Tecido Hepático

O fígado é um tecido de reserva de energia rápida e plástica, em que os substratos são metabolizados rapidamente. A capacidade do tecido hepático de armazenar e regular o suprimento sistêmico de nutrientes é regulada por fatores locais e pelas demandas energéticas dos órgãos periféricos (SHERIDAN, 1994; SANTOS e LIMA, 2016). Segundo Ballantyne (1997), os elasmobrânquios são desprovidos de tecido adiposo, sendo o tecido hepático a maior reserva de lipídeos destes animais. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com tal informação, uma vez que a concentração lipídica foi maior no fígado em relação a concentração deste substrato no tecido muscular (ver gráfico comparativo na figura 7b).

Spada (2021), mostra que os índices de concentração de lipídeos no tecido hepático das fêmeas grávidas de *P. amandae* é elevado pois a manutenção energética na gravidez tem alto custo, sendo o fígado o local preferencial para a oxidação deste substrato, além de principal tecido sintetizador de vitelogenina. Adicionalmente, os dados também elevados deste substrato obtidos em filhotes da mesma espécie neste trabalho, são indicadores de investimento materno. Morfologicamente é possível observar que o saco vitelínico se conecta diretamente com o tecido hepático de embriões e filhotes (Figura 6), sendo este o local de recepção primária da vitelogenina, rica em lipídeos (ALABERT, 2009).

Figura 6 – Localização da inserção do saco vitelínico em filhotes de *Potamotrygon amandae*, detalhe da ligação entre o saco vitelínico e o fígado.



Fonte: própria autora

Houve diferença estatística (P=0,021) na concentração de glicogênio no fígado quando comparado os meses de novembro e dezembro, com maior concentração para o mês de dezembro (figura 7a). Mesmo padrão observado para massa seca do tecido hepático (P<0,001) (figura 7c), o que pode estar relacionado com a diferença estatística na concentração de glicogênio, uma vez que este é o substrato com maior concentração no fígado e pode ter contribuído com maiores valores de tecido e diminuição do conteúdo de água. A alta concentração de glicogênio nos animais de dezembro, mais maduros e aptos ao nascimento, pode estar relacionada à estratégia metabólica de preparo para grande atividade locomotora em futuro próximo, após o nascimento.

Concomitantemente, apesar de não existir diferença estatística para as concentrações de lipídeos e proteínas, o mês de dezembro apresentou maiores concentrações de ambos substratos. Uma possível explicação para este padrão de aumento de substratos no mês de dezembro por estar ligado à não existência de saco vitelínico, indicando que a fonte energética destes filhotes passou a ser o histrotofo produzido pela mãe (RANGEL, 2018).

4.2.2 Tecido Muscular

Houve diferença estatística (P=0,004) na concentração de proteínas entre os meses de novembro e dezembro, com dezembro apresentando maior concentração

(figura 7d). Nos peixes, a maior parte da massa corporal é formado por tecido muscular, a proporção deste tecido é muito maior do que em outros vertebrados. Em teleósteos, o músculo natatório corresponde a 60% da massa corporal total (SANTOS, 2007). É sabido que as proteínas formam a principal composição do tecido muscular e a forma mais correta de avaliar o crescimento de peixes é através do ganho proteico (BOMBARDELLI, MEURER E SYPERRECK, 2004; GASPAROTTO et al., 2011). Tais afirmações corroboram com o aumento da proteína muscular dos filhotes no mês de dezembro e seu maior desenvolvimento.

Adicionalmente, trabalhando com femeas grávidas de *P. amandae*, Spada (2021), verificou um padrão de diminuição de proteínas totais musculares em fêmeas ao final da gravidez e no tecido uterino na fase de nascimento dos filhotes, o que poderia reforçar a teoria de transferência materno-fetal, já que aqui observou-se um aumento significativo deste substrato em filhotes prontos para o nascimento.

A concentração de substrato lipídico muscular (figura 7b) foi bastante baixa, o que pode ser explicada por dois fatores: ausência das enzimas de oxidação Carnitina Palmitoil Transferase (CPT) e Hidroxiacil-CoA Desidrogenase (HOAD) no tecido muscular de elasmobrânquios (SPEERS-ROESCH e TREBERG, 2010); e o desenvolvimento do filhote, que conforme se desenvolve começa a se movimentar no útero e utilizar lipídeos primariamente como fonte energética (LIMA-SILVA et al, 2007).

O tecido muscular mostrou ser o tecido preferencial de armazenamento de glicogênio (ver gráfico comparativo na figura 7a), sabe-se que músculo obtém energia através da síntese de ATP, utilizando o glicogênio quando não há oxigênio disponível (LIMA-SILVA et al, 2007), situação comum de desenvolvimento dos filhotes de elasmobrânquios, que recebem baixo suprimento de oxigênio através de difusão uterina com trocas gasosas entre mãe e filhote (RÊGO, 2014).

Os níveis de glicogênio muscular dos animais analisados diminuíram levemente (figura 7a), sem diferença estatística detectada, em dezembro com relação à novembro, devido a utilização deste substrato para a síntese de ATP no desenvolvimento muscular até o nascimento (HOCHACHKA e SOMERO, 2002). Adicionalmente, no trabalho apresentado por Pastório (2014), neonatos da espécie *Potamotrygon cf. histrix* mantiveram os níveis de glicogênio muscular estáveis mesmo no estado de hipóxia, porém em animais juvenis ocorreu o aumento de glicogênio hepático e a diminuição de glicogênio muscular. Tanto este trabalho quanto o trabalho

de Pastório mostram que o mesmo substrato pode se comportar de diferentes maneiras em diferentes estágios de vida.

4.2.3 Tecido Vitelínico

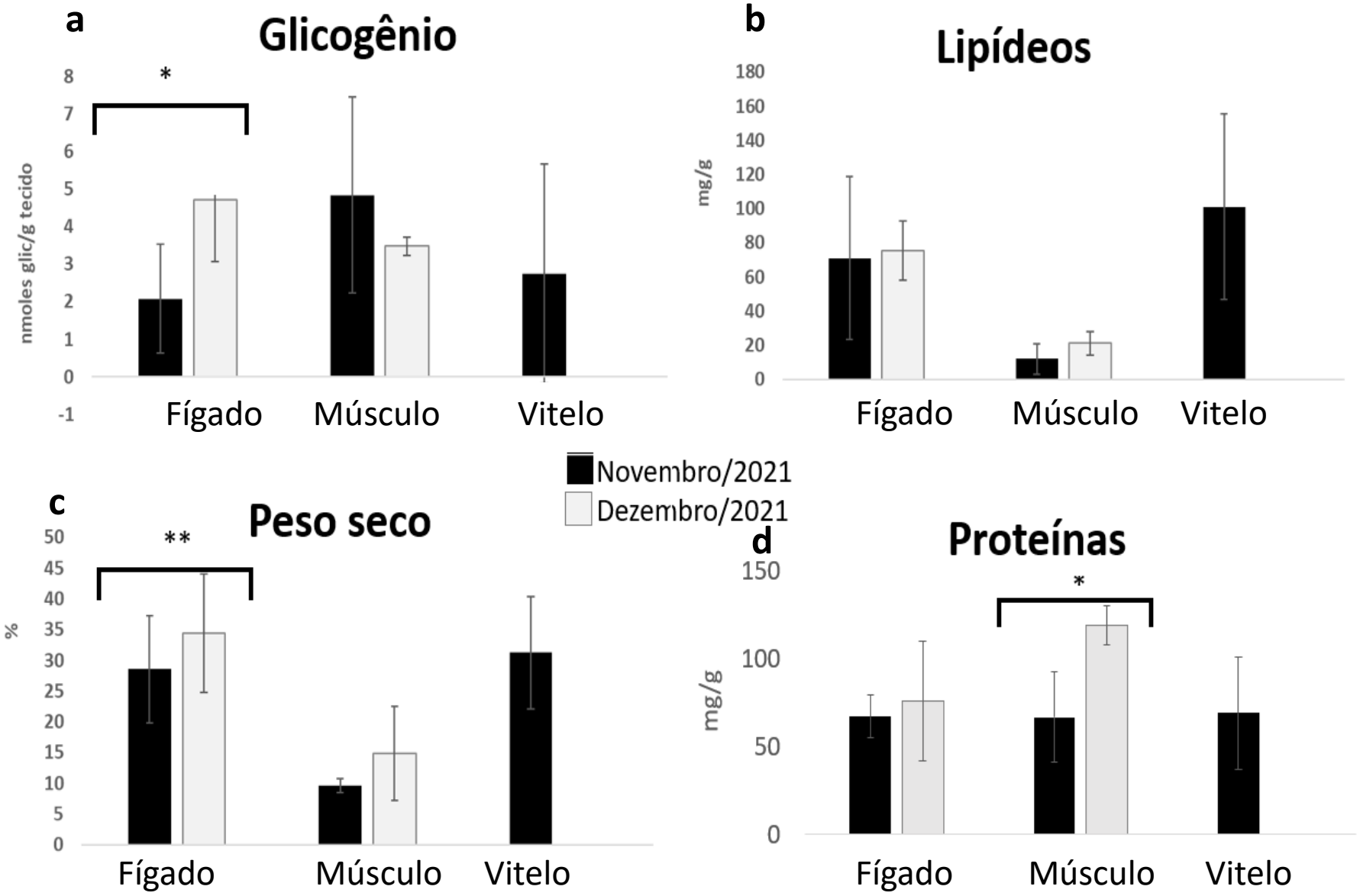
A ausência de saco vitelino devido ao desenvolvimento dos filhotes coletados em dezembro impossibilitou a comparação com os dados obtidos em novembro; porém nos dados de novembro é possível observar a grande concentração de lipídeos no tecido vitelino, seguido das proteínas como o substrato com segunda maior concentração e, por fim, a concentração de glicogênio (figura 7, a, b e d). Não houve diferença estatística na análise dos substratos ou massa seca, porém a alta massa seca possivelmente está relacionado com a alta concentração de lipídeos (figura 7c). É importante destacar a falta de trabalhos que analisam substratos energéticos no tecido vitelínico de elasmobrânquios, os trabalhos envolvendo saco vitelino tem foco principal na morfologia (HAMLETT e WOURMS, 1984; ORLANDO et al, 2015; ODONE e CAPAPÉ, 2022).

No trabalho desenvolvido por Finn, Fyhn e Evjen (1995) com saco vitelino de *Gadus morhua* (bacalhau-do-atlântico) em diferentes dias pós fecundação, o substrato com maior concentração em relação à porcentagem de massa seca foram as proteínas (33,68%), os lipídeos tiveram concentração muito inferior (11,98%) e o glicogênio não foi analisado neste trabalho. Resultados semelhantes também foram observados no trabalho desenvolvido por García-Guerrero, Racotta, e Villareal (2003) com o lagostim *Cherax quadricaniratus*, onde a conconcentração de proteínas nos ovos foi de 63,2%, seguida da concentração de lipídeos (32,3%) e a concentração de carboidratos com 4,4%; e também no trabalho desenvolvido por Ostrowski e Divakaran (1991) com ovos de *Coryphaena hippurus* (dourado-do-mar), em que a concentração de proteínas em relação ao peso seco foi de 35% e a de lipídeos 31,48%. Todos trabalhos divergem dos resultados encontrados neste trabalho, onde o substrato com maior concentração no tecido vitelino foram os lipídeos. Porém é importante destacar que os três trabalhos utilizados para comparação são de animais de clados diferentes e que possuem histórias evolutivas diferentes.

Adicionalmente, em relação aos três tecidos analisados (hepático, muscular e vitelínico), o vitelo foi o local com maior concentração de lipídeos (ver gráfico comparativo na figura 7b), pois o o vitelo é a fonte primária de nutrição do embrião e

posteriormente do filhote, onde o consumo de lipídeos é essencial para que o desenvolvimento fetal ocorra (THORSON; LANGHAMMER; OETINGER, 1983).

Figura 7 – Concentração de glicogênio (a), lipídeos (b), proteínas totais (c) e massa seca (d) nos tecidos hepático, muscular e vitelínico de filhotes de *Potamotrygon amandae* em diferentes estágios de desenvolvimento (média±desvio padrão). * P<0.05: ** P<0.001



5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluímos:

- O desenvolvimento dos filhotes foi evidente entre os meses de novembro e dezembro.
- O aumento de massa dos filhotes de dezembro coincidiu com o aumento da concentração de proteínas no tecido muscular.
- O tecido hepático é a principal fonte de armazenamento lipídico dos filhotes.
- O aumento significativo da massa seca e glicogênio hepáticos no mês de dezembro é uma evidência do preparo para a vida extrauterina dos filhotes.
- A preferência de armazenamento de glicogênio e proteínas no tecido muscular, sendo estes os dois principais substratos de desenvolvimento.
- A ausência do tecido vitelínico em dezembro evidencia o consumo do vitelo pelos filhotes e o início da histrotofia lipídica. De forma complementar, lipídeos são a fonte primária do tecido vitelínico, diferentemente dos teleósteos, que tem como fonte energética primária o conteúdo proteico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALABERT, B.J. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reproduction, nutrition, development, v. 45,p.261-279, 2009.

AMESBURY, E.B.; CRAINE, W.C.; GUILLETTE, L.J.; EVANS, D.H. Uterine fluid and serum protein composition and serum steroid hormone concentrations during gestation in the aplacental viviparous Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. AES Annual Meeting Abstracts, State College, Pennsylvania, 1999.

AOAC. Official Methods of Analysis of Aoac International. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists 1995.

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

BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G; SOUZA, R.H. S. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. Boletim Técnico do CEPTA. v.10, p. 53-60, 1997.

BOMBARDELLI, R. A.; MEURER, F.; SYPERRECK, M. A. Metabolismo protéico em peixes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar, Umuarama, v. 1, n. 7, p. 69-79, 2004.

CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.R.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae. In: Reis, R.E.; Feraris Jr., C.J. & Kullander, S.O. (Eds.), Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 22-29. 2003.

CARVALHO, M. R. de. Description of two extraordinary new species of freshwater stingrays of the genus *Potamotrygon* endemic to the Rio Tapajós basin, Brazil (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), with notes on other Tapajós stingrays. Zootaxa, 4167, 1-63, 2016.

CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. Biology of Sharks and Their Relatives. 2. ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. v. 28, n. 3,p. 350-356, 1956.

FINN, R. N.; FYHN, H. J.; EVJEN, M. S.. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. Marine Biology, [S.l], v. 214, n. 3, p. 355-369, dez. 1995.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry., v. 226, p. 496-503, 1957.

FRINGS, C.S.; FENDLY, T.W., DUNN, R.T., QUENN, C.A. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. Clinical Chemistry ,v.18, p.673-674, 1972.

GARCÍA-GUERRERO, M.; RACOTTA, I. S.; VILLARREAL, H. Variation in Lipid, Protein, and Carbohydrate Content During the Embryonic Development of the Crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: parastacidae). Journal Of Crustacean Biology, v. 23, n. 1, p. 1-6, 2003.

GARRONE NETO, D.; HADDAD JUNIOR; V.; VILELA, M. J. A.; UIEDA, V. S., Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. Biota Neotropica, v. 7, n. 1, p. 205-208, 2007.

GASPAROTTO, O. C.; SIEBERT, M. N.; HENNEMANN, M. C.; COELHO, C. M. R.; GRANUCCI, N.; SILVA, B. L.; SILVA, F. C. M. Fisiologia Animal Comparada. Florianópolis, 238 p. 2011

HAMLETT, W. C.; HYSELL, M. K.. Uterine specializations in elasmobranchs. The Journal Of Experimental Zoology, v. 282, n. 4-5, p. 438-459, 1998.

HAMLETT, W. C.; WOURMS, J. P. Ultrastructure of the pre-implantation shark yolk sac placenta. Tissue And Cell, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 613-625, Elsevier BV, 1984. http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166(84)90035-1.

HOCHACHKA P. W., SOMERO, G. N. Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, 466p. 2002.

LIMA-SILVA, A. E.; FERNANDES, T. C.; DE-OLIVEIRA, F. R.; NAKAMURA, F. Y.; GEVAERD, M. S. Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico: mecanismos de regulação. Revista de Nutrição, [v. 20, n. 4, p. 417-429, 2007.

LOBODA, T.; CARVALHO, M. R., Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: myliobatiformes. Neotropical Ichthyology, v. 11, n. 4, p. 693-737, 2013.

LOVEJOY, N. R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (*Potamotrygonidae*: Rajiformes). Zoological Journal of the Linnean Society, v.117, p.207–257, 1996.

LOWRY, O.H.., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A, L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, v. 193, p.265-275, 1951.

LUCIFORA, L O.; CARVALHO, M. R. de; KYNE, P. M.; WHITE, W. T. Freshwater sharks and rays. Current Biology, v.25, p. 971-973, 2015.

MARTINS, M.B.; JARDIM, M.A.G. Reflexões em Biologia da Conservação. Belém : Museu Paraense Emílio Goeldi, 2018.186p.

MILLIGAN, C.L.; GIRARD, S. S. Lactate metabolism in rainbow trout. Journal of Experimental Biology, v. 180, p.175-193, 1993.

ODDONE, M. C.; CAPAPÉ, C. Diversity of the egg tertiary membranes in some elasmobranch species and comments on the actual yolk-sac viviparous reproductive mode. Revista de Biología Marina y Oceanografía, [S.L.], v. 57, n. , p. 1-20, Universidad de Valparaiso Chile. 2022. http://dx.doi.org/10.22370/rbmo.2022.57.especial.3302.

OLIVEIRA, A. T.; SANTOS, M. Q. C.; ARAÚJO, M. L. G.; LEMOS, J. R. G.; SALES, R. S. A.; ARIDE, P. H. R.; PANTOJA-LIMA, J.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.. Hematological parameters of three freshwater stingray species (Chondrichthyes: *potamotrygonidae*) in the middle rio negro, amazonas state. Biochemical Systematics And Ecology, v. 69, p. 33-40, 2016.

ORLANDO, L.; PEREYRA, I.; SILVEIRA, S.; PAESCH, L.; ODDONE, M. C.; NORBIS, W. Determination of limited histotrophy as the reproductive mode in Mustelus schmitti Springer, 1939 (Chondrichthyes: triakidae). Neotropical Ichthyology, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 699-706, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20150001.

OSTROWSKI, A. C.; DIVAKARAN, S.. Energy substrates for eggs and prefeeding larvae of the dolphin *Coryphaena hippurus*. Marine Biology, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 149-155. Springer Science and Business Media LLC, fev. 1991. http://dx.doi.org/10.1007/bf01320242.

PASTÓRIO, P. C. C. Respostas fisiológicas à hipóxia gradual em neonatos e juvenis da arraia cururu *Potamotrygon cf. histrix*. 2014. 62 f. Tese (Doutorado) - Curso de

Diversidade Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

PARRISH, C.C. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. In: ARTS, M.T., WAINMAN, B.C. Lipids in freshwater ecosystem. New York: Springer-Verlag, p. 4-12, 1999.

RANGEL, B. S, Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas histotróficas. Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo, 2018. 74 f.

RANGEL, B. S.; RIBEIRO, D. C.; CHAGAS, J. M. A.; SPADA, L.; MOREIRA, R. G.; RIBEIRO, C.. Effects of biological traits on capture-induced parturition in a freshwater stingray and perspectives for species management. Journal Of Fish Biology, [S.L.], v. 97, n. 2, p. 546-551, 6 jul. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/jfb.14412.

RÊGO, M. G. Aspectos morfológicos do aparelho reprodutor de tubarões capturados no Nordeste brasileiro. 2014. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

RIBEIRO, D. T. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (*Potamotrygonidae*) na Bacia Amazônica. Dissertação (mestrado)--INPA/UFAM, Manaus, 2007.

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

ROSA, R.S. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Tese (Doutorado). Williamsburg College of William and Mary, 1985.

SANTOS, A. A.; LIMA, J. M. C. Fisiologia Hepática. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. (org.). Sistema Digestório: integração básico-clínica. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. Cap. 21. p. 575-602, 2016.

SANTOS, V. B. Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, p. 127-135, 2007.

SHERIDAN, M.A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol., v. 107, p. 495-508, 1994.

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

(Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. doi:10.11606/D.41.2021.tde-13092021-185148.

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

THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER M. I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *Potamotrygon motoro*. Environmental Biology of Fishes, v.9, p.3–24, 1983.

WHITNEY, K. D.; GABLER, C. A. Rapid evolution in introduced species, ‘invasive traits’ and recipient communities: challenges for predicting invasive potential. Diversity And Distributions, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 569-580, 15 abr. 2008. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00473.x.