



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA – PPG-DB

**Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e
ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de
arraias (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Médio Rio
Negro, Amazonas, Brasil**

ADRIANO TEIXEIRA DE OLIVEIRA

MANAUS
2013

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

ADRIANO TEIXEIRA DE OLIVEIRA

**Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e
ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de
arraias (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Médio Rio
Negro, Amazonas, Brasil**

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

Orientador: Prof. Doutor Jaydione Luiz Marcon

Co-orientador: Prof. Doutor Marcos Tavares-Dias

Financiamento: CAPES, CNPq, UFAM e FAPEAM

MANAUS
2013

Oliveira, Adriano Teixeira de

O48c Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil / Adriano Teixeira de Oliveira. - Manaus: UFAM, 2013.
31 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Diversidade Biológica) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Jaydione Luiz Marcon

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Tavares Dias

1. Hematologia 2. Arraias 3. Citoquímica

I. Marcon, Jaydione Luiz II. Tavares-Dias, Marcos III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 597.35(043.3)

Sinopse:

Foram estudados comparativamente os parâmetros hematológicos, os aspectos citoquímicos e as características ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias capturadas no Médio Rio Negro, AM. Os dados do presente estudo fornecem informações de populações naturais de arraias saudáveis que servirão de referências para comparação com animais que habitam áreas preferenciais nas águas do médio Rio Negro, contribuindo para auxiliar nas estratégias de manejo e conservação das espécies de arraias do Médio Rio Negro.

DEDICATÓRIA

A Marly Teixeira e a meus amados filhos,
Vinícius de Oliveira e Sofia de Oliveira
que foram incansáveis na arte de me fazerem feliz,
e as arraias de água doce que me forneceram
o material biológico necessário para a
execução dessa Tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus onipotente e unipresente, pois, em cada dificuldade me fortaleceu e me inspirou de idéias em cada sopro de ânimo cada vez que me deparava com os percalços nos labirintos da pesquisa científica.

A dona Maria Marly Martins Teixeira que é muito mais que uma mãe, é pai, avó, amiga, confidente e companheira para todas as horas e momentos.

Ao meu pai Jely Jelsimar Almeida de Oliveira, pela formação e pelo incentivo.

A Lizandra Vieira Martins pelo carinho, amor, apoio e incentivo desde a época de graduação.

As minhas fontes de inspiração e de alegria diária, meus filhos Vinícius Martins de Oliveira e Sofia Martins de Oliveira que sempre tinham um sorriso e um afago quando chegava em casa depois de um dia árduo de trabalho ou das exaustivas viagens de campo.

Ao meu irmão Alessandro Teixeira de Oliveira, pelas várias caronas até o aeroporto ou até os portos da cidade de Manaus.

A Franciane Silva de Andrade pela compreensão, atenção, disponibilidade em sempre ajudar e cobrança diária na etapa final para o fechamento da tese.

Ao meu orientador Doutor Jaydione Luiz Marcon, pelos ensinamentos ao longo de toda a minha formação como pesquisador no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), aos ensinamentos diversos principalmente sobre hematologia, aos vários bate papos, ao incentivo na fase final dessa árdua jornada. Meu muito obrigado.

Ao meu co-orientador Doutor Marcos Tavares-Dias, pelos bate papos sobre hematologia, citoquímica e ultraestruturais celulares, pelas identificações das reações citoquímicas, pela amizade, pelas sugestões na escrita dessa tese e, sobretudo, pelo grande exemplo que é aos pesquisadores em início de carreira.

A “rainha das arraias” Doutora Maria Lúcia Góes de Araújo, pioneira nos estudos em arraias de água doce no Amazonas, agradeço pelos bate papos, pelos ensinamentos sobre esse grupo de elasmobrânquios fascinantes, pelos ensinamentos sobre logísticas de excursão, pelo apoio financeiro nas primeiras coletas que foram essenciais para a execução desse trabalho.

A Doutora Elizabeth Gusmão Affonso, que sempre me recebeu de portas abertas no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), quando precisei realizar análises de água, de íons plasmáticos e aclimatar minhas arraias para as análises citoquímicas e coleta de material para microscopia eletrônica.

Ao Doutor José Fernando Marques Barcellos, pela sua disposição em sempre ajudar, pela disponibilidade de vários reagentes, protocolos no preparo de soluções, pela contribuição quando participou de minha banca de qualificação, pelos bate papos e também pela amizade constituída.

A Doutora Irani Quagio Grasioto, pela receptividade no Laboratório de Peixes Neotropicais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Botucatu - São Paulo que me permitiu realizar as análises de microscopia eletrônica das células sanguíneas das arraias que se tornaram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Ao Doutor Renato DaMatta, pela contribuição na minha aula de qualificação, pela receptividade e pelos ensinamentos no Laboratório de Cultura de Tecidos na Universidade Federal do Norte Fluminense (UENF) em Campos dos Goytacazes–RJ.

Ao Doutor Richard Phillip Brinn pelos auxílios nas traduções dos resumos em inglês, pela amizade, pelos momentos de aprendizagem e descontração e, sobretudo, pelos vários artigos que não tinha disponibilidade de consegui-los e você se disponibilizou e me enviou por e-mail.

A Doutora Cleusa Suzana de Oliveira Araújo, pela disponibilidade em me receber tão afetosamente para a obtenção de imagens microscópicas ópticas junto ao Laboratório de Zoologia Aplicada do Centro Universitário Nilton Lins (CUNL).

Ao Doutor Oscar da Costa, pela sua disponibilidade em participar e contribuir em minha banca de qualificação.

Ao Doutor Jansen Zuanon, pela sua riquíssima contribuição em visualizar de forma diferenciada a execução do projeto que permitiu escrever essa tese de doutorado.

Ao Doutor Wallice Duncan, um apaixonado pelas arraias de água doce, pelas suas contribuições em minha banca de qualificação, pelos enormes aprendizados durante as conversas que tivemos e pelos artigos enviados.

Aos Doutores Francisco Valentim e Akemi Shibuya, pelas trocas de informações sobre as arraias de água doce e pela amizade que constituímos durante a busca por informações científicas sobre as amigas arraias de água doce.

Ao amigo e Doutor Jackson Pantoja Lima, pelo enorme auxílio nas análises estatísticas e revisão da tese.

Ao amigo e Doutor Paulo Henrique Aride Rocha, pelos bates papos, sugestões, ensinamentos, incentivo e revisão da tese.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Claudio Inácio e especialmente a Rejane Sales pela enorme contribuição nos preparos de reagentes, triagem de materiais quando precisei ir a campo, ao processamento de material quando retornava de campo, aos ensinamentos e também pela bela amizade constituída.

As técnicas do Laboratório de Morfologia da UFAM, Maysa e especialmente a Rose pelas orientações nos preparos dos vários reagentes que permitiram os belos resultados nas reações citoquímicas das células sanguíneas, bem como na fixação de amostras biológicas para a microscopia eletrônica.

Ao técnico do Laboratório de Biologia de Peixes Neotropical da UNESP-Botucatu-SP Vicente, por me mostrar meus erros nas etapas da reação do glicogênio e por me mostrar a forma correta que me permitiu obter belos resultados na reação do ácido periódico Shiff (PAS).

Aos técnicos Claudete e Thiago do Núcleo de Microscopia Eletrônica da UNESP-Botucatu-SP, pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar durante as análises de microscopia eletrônica.

Aos amigos de jornada que elegi, Mestres Jefferson Lemos e Marcio Santos, como os quais fizemos votos de dividir a árdua jornada de buscar o conhecimento. Agradeço pelos ensinamentos, pelo companheirismo durante as atividades de campo, análises laboratoriais e pelo convívio harmonioso quase que diário no Laboratório de Fisiologia da UFAM.

As best's do Laboratório de Fisiologia Carmel Pereira e Rebeca Nascimento pelos auxílios nas atividades de campo e pela amizade durante os vários meses de convivência.

As professoras do Laboratório de Fisiologia, Doutora Rosany Picolloto, Doutora Thais Billalba e Mestre Alessandra pelo bom relacionamento vivido durante esses anos.

Ao ex-secretário do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da UFAM Igo Zany, pela sua atenção e disponibilidade.

Aos amigos de Botucatu-SP, pelo convívio harmonioso vivido durante minha estada naquela cidade, Mestres Marmoud, Clariane, Ricardo e especialmente a Júlio, Guilherme e Rodrigo por dispor abrigo em sua casa sempre que precisei realizar as análises laboratoriais no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP.

Aos amigos de Campos dos Goytacazes-RJ, Doutora Barbarella de Matos Macchi e especialmente ao Mestre Farlen José Bebber Miranda pela receptividade e pelos ensinamentos no Laboratório de Cultura de Tecidos na UENF.

Aos colegas do INPA, Yara e especialmente a Elenice Brasil pelo apoio durante as análises de água e de íons plasmáticos.

Aos colegas do Laboratório de Zoologia Aplicada do CUNL, Mestre Gabriela Viana e especialmente a Mestre Patrícia Prestes pela atenção dispensada, pela amizade constituída e pelo auxílio na obtenção das imagens em microscopia de luz.

Aos Mestres Fábio Magalhães e Sanny Andrade pela ótima receptividade no Laboratório de Zoologia Aplicada, quando tiver que estar para a obtenção de imagens de microscopia de luz.

A amiga e Mestre Dhane Albuquerque, pelos primeiros aprendizados em hematologia, pela amizade, pela doação de vários materiais de consumo e pela disponibilidade em sempre ajudar.

Ao antigo gestor da Escola Municipal Presidente João Goulard onde fui lotado, pela Secretaria Municipal de Educação de Manaus (SEMED) Sales de Oliveira Góis que SEMPRE compreendeu minhas ausências.

A ex-coordenadora pedagógica da Escola Municipal Presidente João Goulard Anne Célia, por sua eterna compreensão nas minhas ausências do dever de ministrar aula.

Ao meu orientador das canoas e das capturas de arraias o “melhor pescador do mundo” Alfredinho, por capturar mais de 80% das arraias do presente estudo, pelos serviços técnicos no manuseio desses animais e pelos bates papos sobre as arraias de água doce em meio às áreas de pesca nas noites e madrugadas pelo Médio Rio Negro, Amazonas.

Aos pescadores Walter, Santana, Romualdo, Frank, Adaulto e o “patrão Pinheiro” pela captura das arraias.

A dona Iracema, Ivonete e Rosimar, pelo preparo de nossas alimentações quando estivemos em coleta de campo.

As minhas eternas amigas “espinhosas”, as arraias de água doce que mesmo contra suas vontades me dispunham sangue e me permitiram retirar suas medidas biométricas ao logo de 7 anos como especialista em potamotrigonídeos, sem nenhum acidente ocorrido.

A UFAM, pelo apoio financeiro e pela infraestrutura.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFAM), Campus Presidente Figueiredo, por me apoiar na fase final dessa jornada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida que me deu tranquilidade, sustento e permitiu que pudesse concluir essa jornada de minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro nos projetos que apoiaram este estudo.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo financiamento de viagens e projetos de pesquisas que auxiliaram na execução dessa tese de doutorado.

A SEMED, por meio do programa QUALIFICA que me concedeu licença remunerada e me permitiu dedicação integral aos estudos.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pela licença fornecida que permitiu capturar e transportar as arraias de água doce.

A todos que contribuíram com esse trabalho e que por um lapso não inclui nesses agradecimentos.

LISTA DE SIGLAS

Capítulo 1

Ba: Basófilo

Ca⁺⁺: Cálcio

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild fauna and flora

Cl⁻: Cloreto

Eo: Eosinófilo

He: Heterófilo

Ht: Hematócrito

IN: Instrução normativa

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Kn: Fator de condição

K⁺: Potássio

LD_{max}: Largura do disco máxima

Li: Linfócito

Mo: Monócito

NE: Neutrófilo

NF: Número fundamental

Na⁺: Sódio

Tr: Trombócito

Capítulo 2

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEAM: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

ICMBIO: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

Capítulo 3

ACD: Ácido citrato dextrose

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CT: Comprimento total

DP: Desvio padrão

FAPEAM: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

Hb: Concentração de hemoglobina

HCM: Hemoglobina corpuscular média

Ht: Hematócrito
LD: Largura do disco
RBC: Contagem de eritrócitos
UFAM: Universidade Federal do Amazonas
VCM: Volume corpuscular médio

Capítulo 4

Er: Eritrócito
Erb: Eritroblasto
H: Heterófilo
L: Linfócito
M: Monócito
T: Trombócito

Capítulo 5

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT: Comprimento total
FAPEAM: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAFAP: Laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura
LD: Largura do disco
MET: Microscópio eletrônico de transmissão
PAS: Ácido periódico Schiff
UFAM: Universidade Federal do Amazonas
UNESP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Capítulo 6

ANOVA: Análise de Variância
CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl: Cloreto
CV: Coeficiente de variação
DP: Desvio padrão
Hb: Concentração de hemoglobina
HCM: Hemoglobina corpuscular média
Ht: Hematócrito
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
Renováveis
KW: Kruskal Wallis

LD: Largura do disco
CT: Comprimento total
K⁺: Potássio
Na⁺: Sódio
RBC: Contagem de eritrócitos
VCM: Volume corpuscular médio

Capítulo 7

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl⁻: Cloreto
Hb: Concentração de hemoglobina
HCM: Hemoglobina corpuscular média
Ht: Hematócrito
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
Renováveis
LD: Largura do disco
CT: Comprimento total
K⁺: Potássio
Na⁺: Sódio
PCA: Análise de componentes principais
RBC: Contagem de eritrócitos
VCM: Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Nada consta

Capítulo 2

Figura 1. Captura de arraias com o uso de puçá de mão	89
Figura 2. Contenção mecânica do ferrão de arraias com o uso da pinça Foster	91
Figura 3. Utilização de pinça de forster, pano e luva de couro para manusear arraias com segurança para o animal e para o manipulador	92
Figura 4. Local de punção caudal em arraias de água doce. (B) Vaso caudal por onde circula o sangue	93
Figura 5. (A) Local e posicionamento correto da seringa para a colheita sanguínea por punção cardíaca em arraia de água doce. (B) Câmara branquial aberta indicando a posição do coração (seta azul)	94
Figura 6. (A) Colheita do sangue por punção do vaso branquial. (B) Detalhe do vaso branquial em arraias de água doce, indicando pela agulha da seringa	95

Capítulo 3

Figura 1. Mapa do Arquipélago de Mariuá, local da coleta de <i>Potamotrygon</i> sp. no Médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil	102
--	-----

Capítulo 4

Figure 1 (I – VI). Blood cells of three stingray freshwater stained May Grunwald-Giemsa-Wright (I) (E) Erythrocyte and (Er) erythroblast of <i>Potamotrygon</i> sp.; (II) (E) Erythrocyte and (Er) erythroblast of <i>Potamotrygon motoro</i> ; (III) (L) Lymphocyte of <i>Paratrygon aiereba</i> ; (IV) (L) Lymphocyte of <i>Potamotrygon</i> sp.; (V) (T) Thrombocyte of <i>Potamotrygon motoro</i> ; (VI) (T) Thrombocyte and (M) monocyte of <i>Potamotrygon</i> sp.. Bar = 8µm.	115
Continuation Figure 1 (VII – XII). Blood cells of three stingray freshwater stained May Grunwald-Giemsa-Wright (VII) (M) Monocyte of <i>Paratrygon aiereba</i> ; (VIII) (M) Monocyte of <i>Potamotrygon motoro</i> ; (IX) (H) Heterophil and (T) thrombocyte of <i>Potamotrygon</i> sp.; (X) (H) Heterophil of <i>Paratrygon aiereba</i> ; (XI) (B) Basophil of <i>Potamotrygon</i> sp.; (XII) (B) Basophil of <i>Potamotrygon motoro</i> . Bar = 8µm.	116

Capítulo 5

Figura 1 (A-F). Reação PAS para demonstração do glicogênio em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Trombócito de <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Trombócito de <i>P. motoro</i> ; (C) Trombócito de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (D) Heterófilo de <i>Potamotrygon</i> sp.; (E) Heterófilo de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (F) Heterófilo de <i>Paratrygon aiereba</i> . Barra de escala 8 μ m	130
Figura 2 (A-D). Reação PAS-positiva para demonstração do glicogênio em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Linfócito de <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Linfócito de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (C) Linfócito de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (D) Monócito de <i>Potamotrygon motoro</i> . Barra de escala 8 μ m	131
Figura 3 (A-H). Marcações citoquímicas de lipídios em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central, usando coloração com Sudan Black B. (A) Heterófilo <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Heterófilo Trombócito de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (C) Trombócito de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (D) Trombócito de <i>Potamotrygon</i> sp.; (E, F) Linfócito de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (G) Linfócito de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (H) Linfócito de <i>Potamotrygon</i> sp.. Barra de escala 8 μ m	132
Figura 4 (A-F). Marcações citoquímicas de proteínas totais em células sanguíneas de arraias de água doce da Amazônia central, usando azul de bromofenol. (A, B) Heterófilo de <i>Potamotrygon</i> sp.; (C) Heterófilo de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (D) Heterófilo de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (E) Basófilo de <i>Potamotrygon</i> sp.; (F) Basófilo de <i>Potamotrygon motoro</i> . Barra de escala 8 μ m	133
Figura 5 (A-D). Identificação de reticulócitos e de metacromasia em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Reticulócitos de <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Reticulócitos em <i>Potamotrygon motoro</i> ; (C) Reticulócitos em <i>Paratrygon aiereba</i> ; (D) Metacromasia em basófilo de <i>Potamotrygon</i> sp. Barra de escala 10 μ m	134
Figura 6 (A-D). Ultraestruturais celulares das células sanguíneas de arraias de água doce. (A) Trombócitos de <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Trombócitos de <i>Potamotrygon motoro</i> ; (C) Linfócitos de <i>Paratrygon aiereba</i> ; (D) Linfócitos de <i>Potamotrygon</i> sp. Aumento de 4000 x	135
Figura 7. Ultraestruturais das células sanguíneas de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Heterófilo de <i>Potamotrygon</i> sp.; (B) Heterófilo de <i>Potamotrygon motoro</i> . Aumento de 4000 x.	136

Capítulo 6

Nada consta

Capítulo 7

Figura 1. Análise de PCA do hemograma de <i>Potamotrygon</i> sp. (PS), <i>Potamotrygon motoro</i> (PM) e <i>Paratrygon aiereba</i> (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	178
Figura 2. Análise de PCA da bioquímica plasmática de <i>Potamotrygon</i> sp. (PS), <i>Potamotrygon motoro</i> (PM) e <i>Paratrygon aiereba</i> (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	179
Figura 3. Análise de PCA dos íons de <i>Potamotrygon</i> sp. (PS), <i>Potamotrygon motoro</i> (PM) e <i>Paratrygon aiereba</i> (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	180
Figura 4. Análise de PCA do trombograma e leucograma de <i>Potamotrygon</i> sp. (PS), <i>Potamotrygon motoro</i> (PM) e <i>Paratrygon aiereba</i> (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	181
Figura 5. Análise de PCA das propriedades da água dos locais de ocorrência de <i>Potamotrygon</i> . sp. (PS), <i>Potamotrygon motoro</i> (PM) e <i>Paratrygon aiereba</i> (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	182

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Espécies de arraias Potamotrygonidae com permissão de exploração para fins de ornamentação e aquariofilia, cotas anuais por espécie e largura do disco máxima (LD_{max}) para exploração. Fonte: Instrução Normativa 204/2008 – IBAMA	53
Tabela 2. Dieta preferencial das espécies de Potamotrygonidae e locais de captura	63
Tabela 3. Aspectos da biologia reprodutiva das espécies de Potamotrygonidae de água doce	65
Tabela 4. Espécies descritas parasitando arraias Potamotrygonidae (LEMOS, 2011)	68
Tabela 5. Trombócitos e leucócitos do sangue de espécies de Potamotrygonidae	73

Capítulo 2

Tabela 1. Recomendações quanto ao uso de seringas, agulhas e concentração do anestésico eugenol de acordo com a massa corporal de arraias coletadas para colheita de sangue	91
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Valores do eritrograma da arraia cururu <i>Potamotrygon</i> sp. com diferentes anticoagulantes	104
Tabela 2. Valores de glicose e proteínas da arraia cururu <i>Potamotrygon</i> sp. com diferentes anticoagulantes	105

Capítulo 4

Table 1. Mean diameter (μm) \pm standard deviation of largest and smallest axis of blood cells (n= 50) of three freshwater stingrays species collected in the middle Rio Negro, Amazon, Brazil	113
---	-----

Capítulo 5

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis biométricas de <i>Potamotrygon</i> sp., <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Paratrygon aiereba</i> do Médio Rio Negro, Amazonas	128
---	-----

Tabela 2. Reações citoquímicas das células sanguíneas das arraiais <i>Potamotrygon</i> sp., <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Paratrygon aiereba</i> do Médio Rio Negro, Amazonas	129
---	-----

Capítulo 6

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de <i>Potamotrygon</i> sp. (arraia cururu) entre espécimes neonatos, jovens, subadultos e adultos (machos, fêmeas e prenhas) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	150
Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de <i>P. motoro</i> entre espécimes neonatos, jovens e adultos (machos, e fêmeas oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	151
Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de <i>P. aiereba</i> entre espécimes neonatos, jovens, subadultos e adultos (machos, fêmeas e prenhas) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	152
Tabela 4. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia <i>Potamotrygon</i> sp. oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de ANOVA)	153
Tabela 5. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia <i>Potamotrygon motoro</i> oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW)	155
Tabela 6. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia <i>Paratrygon aiereba</i> oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW)	157
Tabela 7. Comparação do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia <i>Potamotrygon</i> sp. (arraia cururu) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de ANOVA)	159
Tabela 8. Comparação do estágio de desenvolvimento, do dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia <i>Potamotrygon motoro</i> oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW)	160
Tabela 9. Comparação do estágio de desenvolvimento, do dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia <i>Paratrygon aiereba</i> oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW)	161
Tabela 10. Comparação hematológica das arraiais <i>Potamotrygon</i> sp., <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Paratrygon aiereba</i> capturadas no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	162
Tabela 11. Comparação dos parâmetros físicos e químicos dos locais de ocorrência das arraiais <i>Potamotrygon</i> sp., <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Paratrygon aiereba</i> capturadas no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	164

Capítulo 7

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão para a biometria em neonatos e jovens das arraias <i>Potamotrygon</i> sp. (arraia cururu), <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Paratrygon aiereba</i> do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	178
---	-----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE SIGLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVII
INTRODUÇÃO GERAL	23
Os potamotrigonídeos	23
Aspectos fisiológicos	27
Referências bibliográficas	34
OBJETIVO	38
Geral	38
Específicos	38
HIPÓTESES	40
RESUMO	42
ABSTRACT	43
ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO	44
Capítulo 1 – O estado atual sobre o conhecimento de arraias Potamotrygonidae	45
Resumo	46
Abstract	46
Introdução	46
Material e métodos	47
Resultados e discussão	48
Considerações finais	74
Referências bibliográficas	75
Capítulo 2 – Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias de água doce	86
Introdução	87
Captura na natureza	88
Contenção e manuseio de arraias	89
Colheita do sangue	92

Considerações finais	94
Agradecimentos	95
Referências bibliográficas	95
Capítulo 3 – Efeitos de anticoagulantes em parâmetros sanguíneos em população natural de <i>Potamotrygon</i> sp. (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)	97
Resumo	98
Abstract	98
Introdução	98
Material e métodos	100
Resultados	102
Discussão	104
Conclusão	106
Agradecimentos	106
Referências bibliográficas	106
Capítulo 4 – A morphological study of blood cells in three freshwater stingrays species (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from middle Rio Negro, central Amazon, Brazil	109
Abstract	110
Introduction	110
Material and methods	111
Results	112
Discussion	113
Acknowledgements	118
References	119
Capítulo 5 – Aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias de água doce (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil	122
Resumo	123
Abstract	123
Introdução	124
Material e métodos	125
Resultados	127

Discussão	135
Conclusão	137
Agradecimentos	138
Referências bibliográficas	138
Capítulo 6 – Parâmetros hematológicos, aspectos físicos e químicos da água de três espécies de arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Médio Rio Negro, Amazonas	141
Resumo	142
Abstract	142
Introdução	143
Material e métodos	144
Resultados	148
Discussão	165
Agradecimentos	169
Referências bibliográficas	169
Capítulo 7 – Interações ecofisiológicas e dos parâmetros físico-químicos da água em arraias de água doce	172
Resumo	173
Abstract	173
Introdução	174
Material e métodos	175
Resultados e discussão	177
Conclusão	182
Agradecimentos	182
Referências bibliográficas	182
CONCLUSÃO GERAL	185
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	188

INTRODUÇÃO GERAL

OS POTAMOTRIGONÍDEOS

A família Potamotrygonidae (Garman 1877) compreende as espécies de elasmobrânquios pertencentes à ordem Myliobatiformes (arraias com ferrão), um grupo bem sucedido e com status de predadores do topo de cadeia na região Neotropical (COMPAGNO; COOK, 1995). Os potamotrigonídeos são o único táxon dentro de Chondrichthyes que são adaptados exclusivamente à vida em água doce (COMPAGNO; COOK, 1995). Atualmente, esta família é composta por 24 a 25 espécies válidas distribuídas em quatro gêneros, *Heliotrygon*, *Plesiotrygon*, *Paratrygon* e *Potamotrygon* (CARVALHO et al., 2003).

Apesar desses avanços o *status* taxonômico e sistemático, bem como os padrões biogeográficos são ainda confusos e controversos para esta família, devido a descrições antigas e baseadas em poucos exemplares (CASTEX, 1963, 1964, 1967; ROSA, 1985). Além disso, os complexos padrões de policromatismo, a sobreposição de caracteres morfométricos e de padrões de cor com outras espécies indicam que os problemas taxonômicos e sistemáticos existentes na família Potamotrygonidae estão longe de serem elucidados e esforços nesse sentido são necessários.

Na região amazônica encontra-se a maior diversidade de espécies de potamotrigonídeos, algumas com distribuição ampla como as arraias *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi*, e outras com distribuição restrita como as espécies *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon* sp. (arraia jabuti), *Potamotrygon leopoldi* e *Potamotrygon henlei* que são endêmicas das bacias dos Rios Negro, Tapajós, Xingu e Tocantins, respectivamente (ROSA, 1985; ARAÚJO, 1998; CARVALHO et al., 2003; ARAÚJO, 2004). As arraias de água doce exploram diversos habitats, que vão desde praias, pequenas enseadas de fundo rochoso ou barrento, folhiço, lagos até as florestas inundadas (CARVALHO et al., 2003).

No Estado do Amazonas, as arraias de água doce são exploradas tanto pela pesca ornamental, usada como objeto de aquarismo e exportação para a Europa,

Estados Unidos e países asiáticos, como também pela pesca comercial, servindo de alimento em vários locais da bacia amazônica. As arraias de água doce são exploradas há mais de duas décadas como peixes ornamentais, sendo que apenas o Estado do Amazonas exporta aproximadamente 10.000 unidades/ano. Esse nicho de mercado iniciou-se sem nenhuma legislação específica que norteasse a exploração sustentada ou mesmo que incentivasse a avaliação do impacto sobre as populações dessas espécies pela pesca. Em 2005 o IBAMA lançou a IN 027/05 que permitiu a exportação de exemplares de *Potamotrygon* em sistemas de quotas por espécie/ano para o mercado internacional. Entretanto em 2006, por meio da IN 118/06 a pesca de arraias de água doce foi proibida em território nacional (IBAMA, 2006), fato que inviabilizou a continuidade da exportação e acabou incentivando a remessa ilegal de arraias para o mercado internacional. A proibição perdurou por dois anos e no início de novembro de 2008, por meio da instrução normativa 204/08, o comércio de arraias do gênero *Potamotrygon* foi novamente liberado para fins de aquarofilia para os estados do Pará e Amazonas.

Contrariamente à exploração ornamental dos potamotrigonídeos no médio Rio Negro, ao longo do sistema Solimões-Amazonas existe forte exploração pela pesca comercial, na qual as arraias são capturadas acidentalmente em redes malhadeiras (ARAÚJO et al., 2004). Entretanto, as arraias de água doce não sofrem apenas por sua captura para servir como fonte de subsistência ou geração de renda, mas também pela pesca indiscriminada no período da seca (janeiro a março), na qual a redução e isolamento de habitats tornam esses animais mais susceptíveis à captura e predação. Nesse período, na bacia do Rio Negro, é muito comum a prática da “limpeza”, isto é, a remoção de todas as arraias encontradas a fim de prevenir acidentes, com estimativas de captura de até 21 mil indivíduos num só ano (ARAÚJO, 2004). Existe grande temor a esses peixes por parte dos pescadores, pois em suas caudas encontram-se ferrões com toxinas que, em caso de acidentes, podem provocar ferimentos graves e bastantes dolorosos. Segundo Magalhães et al. (2006), estes acidentes causam dor intensa no local da ferroadá, edema e extensão variável de sangramento. Além disso, é muito comum encontrar esses animais mutilados pela retirada da extremidade da cauda. Isso

dificulta a natação e compromete todas as atividades dependentes deste comportamento.

Os potamotrigonídeos possuem ainda fecundação interna com o desenvolvimento de troponemata (ARAÚJO, 1998), além disso, após o nascimento as fêmeas exibem cuidado parental sobre a prole, que pode durar até um mês após o parto (Araújo, comunicação pessoal). Contudo, as arraias de água doce possuem algumas características comuns a outros elasmobrânquios, como crescimento lento e grande longevidade, padrões complexos de reprodução e maturação tardia, aspectos que determinam baixas taxas de renovação populacional e, conseqüentemente, maior vulnerabilidade aos impactos oriundos da exploração pesqueira a médio e longo prazo (ARAÚJO et al., 2004; CARRIER et al., 2004).

Do total de espécies existentes da família Potamotrygonidae cinco ocorrem na região do médio Rio Negro, nas proximidades do município de Barcelos (ARAÚJO et al., 2004), que é o principal centro exportador de peixes ornamentais do Brasil (CHAO et al., 2001). Dessas, destacam-se a arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) que é a principal espécie ornamental e responsável por aproximadamente 50% das exportações (IBAMA, 2008). Essa arraia apresenta pequeno porte e pode atingir no máximo 45 cm de largura do disco. É uma espécie ainda em processo de descrição científica, mas com sua identificação bem definida. *Potamotrygon* sp. apresenta segregação sexual com ciclo reprodutivo anual e regulado pelo nível do rio, envolvendo a cópula na vazante e parto na seca (ARAÚJO, 1998). Sua distribuição é endêmica e restrita ao médio Rio Negro, ocorrendo em ambientes de liteira, com baixo fluxo de água e correnteza, típicos das áreas marginais de igapó (BARCELLOS, 1997; ARAÚJO, 1998).

A segunda espécie de arraia de maior representatividade no mercado internacional é *Potamotrygon motoro*, responsável por 30% das exportações (IBAMA, 2008). Com ampla distribuição pela bacia Amazônica (CARVALHO et al., 2003), essa espécie atinge tamanho de 70 cm e possui segregação sexual. A espécie apresenta ciclo reprodutivo anual com período de cópula na seca, gravidez na enchente e parto no início da cheia. Durante esse período existe disputa de machos por fêmeas adultas

para a cópula (Araújo, comunicação pessoal). Seu habitat compreende áreas com fundo lamacento, onde existe a influência mais visível do fluxo de água (observação pessoal).

Além das espécies do gênero *Potamotrygon* outra espécie denominada *Paratrygon aiereba* também vem sendo importante comercialmente no estado do Amazonas. Essa espécie possui grande porte, atingindo até 130 cm de largura do disco e chegando a pesar mais de 60 Kg. Apresenta segregação sexual e segregação espacial por tamanhos, na qual jovens e subadultos de ambos os sexos tendem a ficar agregados na mesma área. Por outro lado, machos e fêmeas adultas encontram-se isolados em diferentes áreas (ARAÚJO, 1999; CHARVET-ALMEIDA et al, 2005). Esta espécie apresenta distribuição ampla ao longo da bacia Amazônica, sendo predominantemente explorada pela pesca comercial. Seu habitat preferencial se constitui de regiões de praias, com pouca intensidade de corrente de água (observação pessoal). Na bacia do rio Tapajós vem sendo observada redução dos estoques naturais dessa espécie, devido à exploração pesqueira em larga escala para obtenção de filé (Araújo, comunicação pessoal). No estado do Amazonas, alguns frigoríficos localizados no município de Iranduba também têm intensificado a compra desses animais para o processamento e comercialização de filés congelados, sem nenhum controle na exploração desse pescado. Esse cenário preocupa e desperta a necessidade de planos de manejo adequados para a conservação desse grupo de peixes oriundos da América do Sul (CARVALHO et al., 2003).

Estas três espécies de arraias, como mencionado anteriormente, não diferem apenas em suas características ecológicas, padrões de distribuição e uso de habitats. Em um estudo citogenético desenvolvido por Valentim et al. (2006), foi observado que os tipos cromossômicos são distintos entre as três espécies de arraias citadas, mesmo entre *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi* que apresentam o mesmo número diplóide ($2n=66$), diferente do que foi encontrado para *Paratrygon aiereba* ($2n=90$). Estes resultados reforçam as diferentes estratégias adaptativas adotadas por estas espécies em seus ambientes naturais.

Nas arraiais *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* da planície alagável do alto rio Paraná foram encontradas diferenças morfométricas relacionadas ao tamanho relativo dos olhos, boca e à cavidade oro-branquial, possivelmente associadas a diferenças na obtenção de alimentos (SILVA, 2006) e ao habitat, fatores que podem se refletir nas propriedades sanguíneas, principalmente na bioquímica plasmática. Lonardoni et al., (2006) observaram variação sazonal na quantidade e frequência de ocorrência dos recursos alimentares entre o período de seca e cheia no alto rio Paraná para *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*, demonstrando que o ambiente também pode ser um fator determinante nas distintas estratégias adotadas pelas arraiais. De acordo com Almeida et al., (2009) as arraiais de água doce apresentam preferências quanto à ocupação e uso de habitat associados às condições ambientais, assim como observados em outros elasmobrânquios. Apesar da importância ecológica e, principalmente econômica que a Família Potamotrygonidae tem dentro da diversidade da ictiofauna amazônica, as arraiais de água doce são ainda animais pouco conhecidos sob o aspecto científico. As informações na literatura sobre esses elasmobrânquios limitam-se aos aspectos relacionados à ecologia, reprodução, sistemática, citogenética, alimentação, descrição de habitat de espécie, distribuição e abundância (ARAÚJO, 1998; LONARDONI et al., 2006; RINCÓN, 2006; VALENTIM et al., 2006; ALMEIDA et al., 2009). Porém, são escassos estudos que fortaleçam o entendimento dos aspectos fisiológicos das arraiais de água doce vinculadas às variações do ambiente.

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Um aspecto característico dos peixes é a ampla variação hematológica interespecífica (PARMA-CROUX, 1994; TAVARES-DIAS et al., 2004; KORI-SIAKPERE et al., 2005; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007a), em geral atribuídas a fatores como variação genética, estado nutricional, sexo, idade, estresse de captura, procedimentos de manipulação e amostragem sanguínea (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; KORI-SIAKPERE et al., 2005; SVOBODOVÁ et al., 2008). Embora a hematologia de peixes

seja uma ferramenta valiosa, o progresso no estabelecimento de parâmetros hematológicos é lento e a literatura é fragmentada e freqüentemente incompleta (KORISIAKPERE et al., 2005), principalmente no que se refere aos elasmobrânquios de água doce, as arraias da América do Sul.

Devido aos poucos estudos sobre a biologia das arraias de água doce amazônicas, os conhecimentos de sua fisiologia, principalmente no que tange a hematologia, são muito reduzidos e até inexistentes para a maioria das espécies. O conhecimento dos parâmetros sanguíneos é importante na avaliação do estado fisiológico dos peixes. Assim, tem sido estudado o quadro hematológico de diferentes espécies de peixes teleósteos de água doce (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007a,b; VÁZQUEZ; Guerrero, 2007) e de elasmobrânquios marinhos (WILHELM FILHO et al., 1992; LUER et al., 2004; WALSH; LUER, 2004; CAIN et al., 2004; ARNOLD, 2005). Estes parâmetros constituem-se em uma importante ferramenta diagnóstica na identificação do estado de saúde em diversas populações de peixes (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004; WALSH; LUER, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007), tanto no ambiente natural como em cativeiro e pode ser também usada para comparação de espécies que vivem em condições ambientais distintas ou entre espécies distintas que compartilham do mesmo ambiente.

A literatura tem demonstrado que os elasmobrânquios apresentam menor quantidade de eritrócitos no sangue, porém, o tamanho desse tipo celular é de duas a três vezes maior que o observado em peixes teleósteos (SAUNDERS, 1966; LUER et al., 2004; WILHELM FILHO et al., 1992). Como consequência, os elasmobrânquios apresentam mais hemoglobina corpuscular média e menor concentração de hemoglobina que os teleósteos, diferenças que resultam em um sangue com baixa viscosidade (hemodiluído). Estes fatores coadunados apontam as arraias como animais com baixa demanda por oxigênio e baixa taxa metabólica sendo, portanto, peixes mais sedentários que os tubarões e os teleósteos (WILHELM FILHO et al., 1992).

A quantidade de aminoácidos na hemoglobina de elasmobrânquios é duas vezes maior que a encontrada nos peixes teleósteos (NIKINMAA, 1990). Esse aumento não se reflete na quantidade de oxigênio absorvido pelos eritrócitos, pois as arraias tradicionalmente possuem baixo aporte de energia, que está relacionado ao modesto trabalho cardíaco que esse grupo de peixes apresenta (WILHELM FILHO et al., 1992). Os teleósteos são peixes extremamente ativos, mas exibem pouca extração de oxigênio pelas brânquias, fato que não é observado nos elasmobrânquios, especialmente nas arraias (WILHELM FILHO et al., 1992).

Estudos comparativos do fluxo de sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{++}) e a excreção de uréia entre duas espécies de arraias do gênero *Potamotrygon* (*P. aff. hystrix* e *P. thorsoni*) aclimatadas em água com elevadas concentrações de eletrólitos e carbono orgânico dissolvido, concluíram que os potamotrigonídeos possuem características de regulação iônica semelhante aos teleósteos de água doce e diferente de seus relativos marinhos (WOOD et al., 2002). Independentemente da capacidade respiratória e do metabolismo diferenciado entre elasmobrânquios e teleósteos, ambos os grupos de peixes possuem seus organismos extremamente adaptados aos seus ambientes e seus respectivos modos de vida. Dentre as características em comum que determinam a inabilidade dos potamotrigonídeos em viver em ambiente marinho estão a redução da glândula retal e as baixas concentrações de uréia no sangue (THORSON, 1967). Assim como outras espécies do grupo, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) não possui órgãos respiratórios acessórios e retira o oxigênio da água através das brânquias. Contudo, quando em ambientes hipóxicos, esses animais nadam para a superfície e flutuam, dobrando as extremidades das nadadeiras laterais para explorar a camada mais oxigenada da coluna da água (BARCELLOS, 1997), uma estratégia adaptativa não observada entre os elasmobrânquios marinhos.

Em um estudo multidisciplinar realizado no médio Rio Negro, nosso grupo de pesquisa investigou o perfil dos hormônios esteróides em fêmeas grávidas de *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon motoro*, e observou a existência de transferência materna dos hormônios metabólicos placentários T3 e T4 para os embriões (McComb,

Brinn e Marcon, dados não publicados), a exemplo do que ocorre em fêmeas do tubarão martelo (*Sphyrna tiburus*); (MCCOMB et al., 2004), bem como confirmou a ausência completa de cortisol e presença de corticosterona no sangue de exemplares de vários tamanhos de *Potamotrygon* sp.. Este último hormônio, normalmente associado à reprodução e desenvolvimento da espécie (DUFTY et al., 2002; HAYWARD; WINGWELD, 2004), mostrou responder fisiologicamente a situações de estresse impostas pelo transporte, fato ainda inédito na literatura para esse grupo de animais (Brinn, McComb e Marcon, dados não publicados).

Oliveira (2008) estudando o eritrograma de *Potamotrygon* sp., concluiu que tais valores são inferiores aos observados em arraias marinhas, comprovando o modo de vida mais sedentário desta espécie. Por outro lado, o perfil bioquímico plasmático desta assemelha-se mais a dos teleósteos de água doce do que dos seus relativos marinhos. Outros resultados concludentes dessa mesma espécie revelaram não existir diferença entre indivíduos machos e fêmeas nos parâmetros hematológicos, entretanto, variações durante o desenvolvimento foram observadas. Os parâmetros do sangue desta espécie também demonstraram estreita relação com as mudanças no nível do rio; os valores do hematócrito e da contagem de eritrócitos foram menores nos períodos de vazante e seca, provavelmente devido à maior disponibilidade de oxigênio. Entretanto, nesses períodos, o volume corpuscular médio, a hemoglobina sanguínea, bem como a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média mostraram-se elevados, talvez como uma resposta fisiológica da espécie na tentativa obter uma troca gasosa mais eficiente, num período em que o metabolismo necessita ser aumentado.

Nos eritrócitos da arraia cururu foi constatada a presença de um parasita intraeritrocitário pertencente à família Hemogregarinidae. Esses hemoparasitas demonstram uma relação inversamente proporcional com o nível do Rio Negro, que atua como agente regulador na prevalência e na quantidade de hemoparasitas (OLIVEIRA, 2008). Portanto, conclui-se que o nível do Rio Negro também influencia a incidência desse hemoparasita nas arraias cururu.

Oliveira (2008) analisando as células sanguíneas da arraia cururu na natureza observou a presença de eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos, com características morfológicas semelhantes a outros elasmobrânquios marinhos. Porém os estudos indicaram a necessidade de conhecimentos sobre os aspectos citoquímicos e ultraestruturais para verificar a função imunológica desses tipos leucocitários em arraias de água doce e confirmar a verdadeira classificação dos diferentes tipos leucocitários existentes nas arraias de água doce, já que em outro estudo (GRIFFITH et al., 1973) foi relatada a presença de neutrófilos e eosinófilos no sangue de potamotrigonídeos.

Vários relatos descrevem a importância dos estudos citoquímicos para compreensão da função dos trombócitos e leucócitos no sangue de *Oreochromis niloticus* (UEDA et al., 2001), *Salminus maxilosus* (VEIGA et al., 2002), *Hoplosternum littorale* (TAVARES-DIAS; BARCELOS, 2005), *Aristichthys nobilis*, *Astronotus ocellatus*, *Hoplias malabaricus* e *Astyanax bimaculatus* (TAVARES-DIAS, 2006), *Brycon orbignyanus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006) e *Ictalurus punctatus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007a). Esses trabalhos demonstram que as marcações citoquímicas reagem independentemente da quantificação do tipo leucocitário, pois, em algumas situações um tipo leucocitário pode estar presente em baixa quantidade, mas ser a célula mais importante na defesa imunológica.

Devido às variações morfológicas dos granulócitos em peixes, uma análise baseada apenas na morfologia é insuficiente para identificação dos distintos tipos celulares em algumas espécies. Estudos dos diferentes constituintes químicos dos leucócitos podem ser de grande valia auxiliando na identificação e caracterização morfológica dessas células, uma vez que os constituintes enzimáticos e não enzimáticos leucocitários podem ser demonstrados por métodos citoquímicos (VEIGA et al., 2002; TAVARES-DIAS, 2006; TAVARES-DIAS; MORAES, 2006). Os leucócitos possuem proteínas no núcleo e no citoplasma, entre as proteínas citoplasmáticas, as enzimas são as mais importantes, estando ligadas às granulações das células. As proteínas não-enzimáticas são menos importantes, uma vez que não são usadas

durante a fagocitose e morte dos microorganismos, como ocorre com as enzimas. Os leucócitos possuem diversas enzimas como a peroxidase e a esterase inespecífica, além desses constituintes enzimáticos há também os carboidratos e os lipídeos.

Existe um grande número de métodos citoquímicos para a localização dessas substâncias e a maioria dos métodos baseia-se na produção de um precipitado corado. A presença de glicogênio e fosfatase alcalina em leucócitos está associada principalmente à fagocitose (TAVARES-DIAS, 2006; UEDA et al., 2001). A enzima lisossômica peroxidase participa da digestão intracelular e na modulação da atividade fagocítica em leucócitos (VALE et al., 2002; AZEVEDO; LUNARDI, 2003), enquanto que as esterases são enzimas envolvidas no processo de defesa celular, facilitando a diapedese (HAYHOE; QUAGLINO, 1994; CASALETTI-ROSA; LUNARDI, 1997). Apesar da importância dessas investigações imunológicas, não foi relatada até o momento na literatura associação das marcações citoquímicas e ultraestruturais com os aspectos ecofisiológicos de peixes em geral.

As arraias de água doce exercem grande importância ecológica dentro da ictiofauna amazônica, pois assumem o papel ecológico como predadores do topo de cadeia, contribuindo para o equilíbrio e a dinâmica de seus ambientes naturais. Além da importância ecológica esses animais são também valiosos economicamente para o Estado do Amazonas, devido a sua comercialização como peixes ornamentais, contribuindo desta forma, como um dos mais relevantes recursos pesqueiros para o município de Barcelos (AM).

Das cinco espécies existentes no Médio Rio Negro, Amazonas, três espécies foram escolhidas: *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. A arraia *Potamotrygon* sp. foi uma das espécies selecionadas para estes estudos por ser a principal espécie na exportação, por apresentar distribuição endêmica no médio Rio Negro (AM) e habitar os igapós, ambientes que possuem sua dinâmica ecológica com peculiaridades exclusivas. *Potamotrygon motoro* foi escolhida por ser a segunda espécie de maior representatividade na exportação, apresentar ampla distribuição e seu habitat ser uma área intermediária entre o igapó e a praia (regiões lamacentas) e

Paratrygon aiereba por também apresentar ampla distribuição por habitar as praias, mas principalmente devido à evidência recentes de redução de seus estoques naturais (Araújo, comunicação pessoal), o que pode colocar em risco a conservação dessa espécie naquela bacia.

A maximização de esforços visando à realização de estudos científicos entre diferentes espécies de potamotrigonídeos pode contribuir de forma significativa para a elaboração de planos de manejo e estratégias de conservação, para evitar a exploração desordenada das espécies e, conseqüentemente, a redução dos seus estoques naturais. Estes recursos pesqueiros são de grande importância para a manutenção dos povos ribeirinhos associados à atividade da pesca ornamental e comercial. Essas ações poderão também estimular a permanência desses povos em suas áreas naturais, desenvolvendo e desfrutando dessa atividade extrativista mantida a mais de cinquenta anos na região do médio Rio Negro (CHAO et al., 2001) e que pode ser mantida de forma sustentável.

Assim, os resultados desse trabalho também poderão contribuir para orientar e nortear as agências reguladoras na tomada de decisões, a exemplo do ocorrido com a proibição durante dois anos do comércio de arraias que foi decretado devido à falta de informações sobre a biologia desses peixes (IN N° 118/06-IBAMA), fato que prejudicou a utilização desse recurso de forma sustentável na região. Entretanto, apesar da liberação do sistema de cotas estabelecido por espécie/ano (IN N° 204/08-IBAMA) e da crescente preocupação dos órgãos responsáveis pela manutenção desse recurso, não se tem evitado a pesca negativa e a remessa ilegal desses animais para o mercado internacional, que são muitas vezes capturados na Amazônia brasileira de forma irregular por países vizinhos e comercializados, sem nenhum retorno e/ou benefício às populações ribeirinhas que tradicionalmente utilizam esse importante recurso natural que compõe a biodiversidade Amazônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.P.; BARTHEM, R.B.; VIANA, A.S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(1): 1-11, 2009.
- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. Dissertação Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 171 p, 1998.
- ARAÚJO, M.L.G. Resultados do Monitoramento da Pesca de Arraias de Água Doce Utilizadas Como Peixe Ornamental no Rio Tapajós. Relatório Técnico Nº 01. 39 p, 2004.
- ARAÚJO, M.L.G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20 info 08: 1-6, 2004. <http://cites.org/common/ctee/animals/20/E20-inf-08.pdf>
- ARAÚJO, M.L.G.; DUNCAN, W.L.P.; MELO, S.V. Plano de Monitoramento de Arraias de Água Doce. Relatório Final. 78 p, 2005.
- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Veterinary Clinical Pathology* 34, 115-123, 2005.
- AZEVEDO, A.; LUNARDI, L.O. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of turtle (*Chrysemys dorbignii*). *Acta Histochemica*, 105, 99-105, 2003.
- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, Uréia e Conteúdo de Oxigênio no Sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 67 p, 1997.
- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A. Plasma biochemistry reference values of wild caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35, 471-476, 2004.
- CARRIER, J; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press. 596 p, 2004.
- CASALETTI-ROSA, L.; LUNARDI, L.O. Comparative study of the localization of nonspecific esterase activity (Naphthyl butyrate) in leucocytes from reptiles, birds and fish. *Brazilian Journal of Morphology Science* 14, 72, 1997.
- CASTEX, M.N. Uma nueva espécie de raya fluvial: *P. labradori*. *Neotropica*, La plata, 9 (30). p. 117-121, 1963.
- CASTEX, M.N. Estado actual de los estudios sobre la raya fluvial neotropical. *Ver. Mus. Prov. Cs. Nat. Santa Fé. Número extraordinário del cincuentenario*, p. 9-34, 1964.
- CASTEX, M.N. Bases para el estudio de las rayas de água dulce del sistema Amazônico. Nuevas sinonímias de "*P. Motoro*" (M. H., 1841). *Atlas do Simpósio sobre a biota Amazônica*. Vol. 3 (Limnologia), p. 89-92, 1967.

- CARVALHO, M.R. DE; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América. Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (orgs.). Porto Alegre, Edipucrs, p. 22-28, 2003.
- CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba. EDUA, Manaus. 309 p, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R.S.; ALMEIDA, M.P. *Paratrygon aiereba*: A multi-species complex (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists. Tampa, Flórida. 92p, 2005.
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: The Biology of Freshwater Elasmobranchs. Oetinger, M. I.; Zorzi, G. D. (eds.). Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences, 7: 62-90, 1995.
- DUFTY, A.M.; CLOBERT, J.; MOLDER, A.P. Hormones, developmental plasticity and adaptation. Trends Ecol. Evol. 17, 190–196, 2002.
- GRIFFITH, R.W.; PANG, P.K.T.; SRIVASTAVA, A.K.; PICKFORD, G.E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and diluted sea water. Biology Bulletin 144, 304-320, 1973.
- HAYHOE, F.G.J.; QUALIGNO, D. Haematological Cytochemistry. London: Churchill Livingstone, 1994.
- HAYWARD, L.S.; WINGWELD, J.C. Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. Gen. Comp. Endocrinol. 135, 365–371, 2004.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2005. Instrução Normativa Nº. 027/2005.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. Instrução Normativa Nº. 118/2006.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Instrução Normativa Nº. 204/2008.
- KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J.E.G.; IDOGE, E. Haematological characteristics of the African snakehead, *Parachanna obscura*. African J. of Biotec., 4, 527-530, 2005.
- LONARDONI, A.P.; GOULART, E.; OLIVEIRA, E.F.; ABELHA, M.C.F. Hábitos alimentares e sobreposição trófica das raias *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. Acta Sci. Biol. Sci, 28 195-202, 2006.
- LUER, C.A.; WALSH, C.J.; BODINE, A.B. The Immune System of Sharks, Skates, and Rays. In: Biology of Sharks and Their Relatives. Carrier, J.C.; Musick, J.A.; Heithaus, M.R. (eds.) New York, CRC Marine Biology, p. 369-389, 2004.
- MAGALHÃES, K.W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A.A.; MARQUES, E.E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon orbignyi*. Toxicon, 47, 575-583, 2006.
- MCCOMB, D.M.; GELSLEICHTER, J.; MANIRE, C.A.; BRINN, R.; BROWN, C.L. Comparative thyroid hormone concentration in maternal serum and yolk of the

- bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*) from two sites along the coast of Florida. *General and Comparative Endocrinology*. 144: 67-173, 2004.
- NIKINMA, A. Vertebrate red blood cells. Springer-Verlag. 262 p, 1990.
- OLIVEIRA, A.T. Caracterização hematológica de *Potamotrygon* cf. *histrrix*: subsídios ao manejo e conservação da espécie. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 118 p, 2008.
- PARMA-CROUX, M.J. Some haematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Rev de Hydrobiologia Trop*. 27, 113-119, 1994.
- RINCÓN, G. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paraná-Tocantins. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro. 132 p, 2006.
- ROSA, R.S. A systematic revision of the South American stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). PhD Thesis. School of Marine Sciences. College of William and Mary, Virginia. University Microfilms International, Ann Arbor, Michigan. 523 p, 1985.
- SAUNDERS, D.C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Trans. Amer. Microsc. Soc*, 85(3): p. 427-449, 1966.
- SILVA, A.G.C. Morfometria e ecologia de *Potamotrygon motoro* (Natterer e Henle, 1841) e *Potamotrygon falkneri* Castex e Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da planície alagável do alto rio Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- SVOBODOVÁ, Z.; KROUPOVÁ, H.; MODRÁ, H.; FLAJSHANS, M.; RANDÁK, T.; SAVINA, L.V.; GELA, D. Haematological profile of common carp spawners of various breeds. *J App Ichth* 24, 55-59, 2008.
- TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 68, 1822–1833, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J.F.M. Peripheral blood cells of the armored Catfish *Hoplosternum littorale* HANCOCK, 1828: A morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 26, 157-162, 2005.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scientiarum* 26, 157-162, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia em peixes teleósteos*. Villimpress: Ribeirão Preto, SP, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus*, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica*, 16(3): 273-276, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 49-54, 2007a.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology* 71, 383–388, 2007b.

- TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenosômica de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Scientiarum* 26, 73–80, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M.; REZENDE, P.C.B. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Veterinarski Arhiv* 77, 355-363, 2007.
- THORSON, T.B. Osmoregulation in fresh-water elasmobranchs. In: Skates and Rays, Gilbert, P.W.; Mathewson, R. F.; Rall, D. P. The Johns Hopkins, p. 265-270, 1967.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277, 2001.
- VÁZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell* 39, 151-160, 2007.
- VALE, A.; AFFONSO, A.; SILVA, M.T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 183-198, 2002.
- VALENTIM, F.C.A.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromossomes of three freshwater stingrays (Rakiformes Potamotrygonidae) from the Rio Negro basin, Amazon, Brazil. *Genetica*, 128: 33-39, 2006.
- VEIGA, M.L.; EGAMI, M.I.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. & RODRIGUES, E.L. Morphological and ultrastructural study of the thrombocytes and leukocytes granulocytes of *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 34: 397-402, 2002.
- WALSH, C.J.; LUER, C.A. Elasmobranch Hematology: Identification of Cell Types and Practical Applications. In: *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Smith, M.; Warmolts, D.; Thoney, D.; Hueter, R. Columbus (eds.), Ohio Biological Survey. p. 307-323, 2004.
- WILHELM FILHO, D.; EBLE, G.J.; KASSNER, G.; CAPRARIO, F.X.; DAFRÉ, A.L.; OHIRA, M. Comparative Hematology in Marine Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 102A, p. 311-321, 1992.
- WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y.O.; GONZALEZ, R.J.; WILSON, R.W.; PATRICK, M.L.; VAL, A.L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology* 205, 3039- 3054, 2002.

OBJETIVOS

GERAL

Estudar as características hematológicas, citoquímicas e ultraestruturais das células do sangue de três arraiais (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon* sp.) do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

ESPECÍFICOS

1. Indicar procedimentos de manuseio e de coletas sanguíneas em arraiais de água doce;
2. Avaliar qual anticoagulante (EDTA, citrato de sódio e heparina) tem menos alterações na determinação dos parâmetros sanguíneos;
3. Descrever se o estágio de desenvolvimento, o dimorfismo sexual e o estado de gravidez provocam alterações nos parâmetros hematológicos de arraiais de água doce;
4. Comparar os valores dos metabólitos plasmáticos (glicose, triglicerídeos, colesterol total, uréia e proteínas totais) de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.
5. Comparar as concentrações dos principais eletrólitos plasmáticos (sódio, potássio e cloreto) de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.
6. Comparar o número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) entre as três espécies estudadas;
7. Comparar quantitativamente e morfológicamente as células sanguíneas em *Potamotrygon* sp. , *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.

8. Descrever as reações citoquímicas de eritrócitos, trombócitos e leucócitos do sangue das três espécies estudadas;

9. Determinar os parâmetros físico-químicos da água do local de coleta de cada espécie de arraia;

10. Avaliar os efeitos das características físicas e químicas da água nos parâmetros hematológicos para cada espécie de arraia.

HIPÓTESES

- A)** H₁: A principal localidade de retirada de amostras de sangue é a punção do vaso branquial em arraias do gênero *Potamotrygon*;
- B)** H₁: Anticoagulantes diferentes exercem influência no hemograma da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu);
- C)** H₁: Anticoagulantes diferentes exercem influência na bioquímica plasmática da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu);
- D)** H₁: Os aspectos morfológicos das células sanguíneas das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, apresentam caráter conservador;
- E)** H₁: As marcações citoquímicas das células do sangue das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, são diferenciadas;
- F)** H₁: Os aspectos ultraestruturais das células do sangue das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, são diferenciadas;
- G)** H₁: O estado de gravidez e o dimorfismo sexual exerce influência sobre o hemograma e a bioquímica plasmática das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;
- H)** H₁: O estado de gravidez e o dimorfismo sexual exerce influência sobre o trombograma e leucograma das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;
- I)** H₁: O estágio de desenvolvimento exerce influência sobre o hemograma e a bioquímica plasmática das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;
- J)** H₁: O estágio de desenvolvimento exerce influência sobre o trombograma e leucograma das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;

K) H₁: As características biológicas diferenciadas exercem influência no hemograma e bioquímica plasmática das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;

L) H₁: As características biológicas diferenciadas exercem influência no trombograma e leucograma das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;

M) H₁: As propriedades físicas e químicas da água é diferentes nos locais de ocorrência nas arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*;

N) H₁: A partir dos parâmetros hematológicos é possível agrupar as arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.

RESUMO

As arraias de água doce constituem-se em importantes recursos na Amazônia principal sobre os aspectos de aquariofilia, entretanto, algumas espécies também vêm se destacando como peixes comestíveis. O presente trabalho tem por objetivo estabelecer as características hematológicas, citoquímicas e ultraestruturais das células do sangue de três arraias (*Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*) com habitats diferenciados em seus ambientes naturais ao longo do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil. É notório que nos últimos anos houve um aumento significativo das informações científicas sobre as arraias de água doce, entretanto, sobre os aspectos ecofisiológicos as informações ainda são escassas e/ou ausentes. Para as amostragens de sangue em arraias de água doce a punção do vaso branquial é a mais viável, devido à maior segurança para o manipulador, facilidade, precisão e rapidez. Para a determinação da glicose plasmática e do eritrograma os anticoagulantes usados (EDTA e Heparina) não influenciaram os parâmetros analisados, devendo um desses ser empregado em análises hematológicas de arraias de água doce. Os tipos celulares e as características morfológicas e morfométricas das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* apresentam um caráter conservador. A composição citoquímica revelou que os heterófilos são as células mais importantes do sistema imunológico dos potamotrigonídeos, uma vez que apresentaram glicogênio, lipídios e proteínas básicas, sendo estas diretamente relacionadas à atividade fagocítica. Os aspectos ultraestruturais revelam que trombócitos e principalmente os heterófilos são células ricas em organelas, além do mais existe um padrão conservador nos aspectos ultraestruturais das células das arraias. Na arraia cururu o estágio de desenvolvimento é um fator importante para diferenciar as propriedades hematológicas bem como as propriedades da água, portanto, deve-se ter cuidado ao fazer comparações com outras espécies. Entretanto em *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* essa característica biológica não exerce influência tanto sobre as características hematológicas quanto sobre as propriedades da água. Ao confrontar os aspectos hematológicos e as características da água entre *Potamotrygon* sp, *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, pode-se observar um caráter conservador entre as espécies, principalmente sobre as características do leucograma e trombograma. Em relação às propriedades da água apenas indivíduos subadultos e grávidas possuem diferenças nas propriedades da água, esses resultados ressaltam que dentro de uma mesma bacia a hematologia e as propriedades físicas e químicas da água não são diferenciadas entre as arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. Existe uma integração entre os aspectos biológicos, ecológicos, hematológicos e das propriedades das águas dos locais de ocorrência de arraias de água doce da Amazônia. Conclui-se que *Potamotrygon* sp., apresenta padrões diferenciados de *Paratrygon aiereba*, além do mais *Potamotrygon motoro* é mesmo uma espécie que apresenta características intermediárias entre as descritas, o qual pode ser considerada uma espécie com distribuição mais ampla em seus aspectos ecofisiológicos, que podem ser empregados em investigações que evidenciem o manejo e a conservação.

ABSTRACT

The freshwater stingrays are important resources in the Amazon on the main aspects of aquarium, however, some species have also been highlighted as edible fish. This work aims to establish hematologic characteristics, cytochemical and ultrastructural blood cells three stingrays (*Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*) with different habitats in their natural environments throughout Middle River Black, Amazonas, Brazil. It is clear that in recent years there has been a significant increase in scientific information on freshwater stingrays, however, about the ecophysiological aspects information is scarce and/or missing. For blood sampling in freshwater stingrays puncture the vessel gill is the most feasible, due to increased security for the manipulator, easily, accurately and quickly. For the determination of glucose plasma and erythrocyte used anticoagulants (EDTA and heparin) did not influence the parameters, one of these should be used in hematological analysis of freshwater stingrays. The cell types and morphological and morphometric characteristics of stingrays *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba* present a conservative character. The composition cytochemistry revealed that heterophils are the most important cells of the immune system potamotrygonids, once showed glycogen, lipids and basic proteins, which are directly related to phagocytic activity. The ultrastructural aspects reveal that thrombocytes and especially rich in heterophilic cell organelles are furthermore there is a conservative standard cell ultrastructural aspect of rays. In stingray cururu stage of development is an important factor to differentiate hematologic properties as well as properties of water, so you must be careful when making comparisons with other species. However in *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba* this biological trait has no influence on both hematologic characteristics as on the properties of water. When we compare the hematological aspects and characteristics of water between *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*, one can observe a conservative character between species, mainly on the characteristics of the leucogram and thrombogram. Regarding the properties of water only subadult and pregnant individuals have differences in the properties of water, these findings underscore that within the same basin hematology and physical and chemical properties of water are not differentiated between the stingrays *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*, coming from the Middle River Black, Amazonas. There is an integration of biological, ecological, and hematological properties of the waters of the local occurrence of freshwater stingrays from the Amazon. This shows that the stingray *Potamotrygon* sp. presents different patterns of *Paratrygon aiereba* furthermore *Potamotrygon motoro* is even a species that has characteristics intermediate between those described above, which can be considered a species with wider distribution in ecophysiological aspects, which can be used in investigations that demonstrate the conservation management.

ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO

Considerando a grande quantidade de hipóteses elaboradas, esta tese foi estruturada em um total de capítulos o qual possui as suas estruturas voltadas para serem submetidos a revistas científicas. O capítulo 1 trata-se de um artigo de revisão literária o qual todos os artigos disponíveis sobre as arraias de água doce foram utilizados para descrever o estado do conhecimento atual sobre os potamotrigonídeos. Nos capítulos 2 e 3, foram realizados experimentos para a padronização dos procedimentos de manuseio e coleta sanguínea (Capítulo 2), e sobre qual é o anticoagulante ideal para a utilização durante as análises hematológicas em arraias de água doce (Capítulo 3).

De posse das padronizações dos métodos, o capítulo 4 transcreveu-se com uma abordagem comparativa sobre os tipos celulares sanguíneos, caracterização e aspectos morfométricos das arraias *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. No capítulo 5 foi feita uma análise comparativa das marcações citoquímicas e das características ultraestruturais das células sanguíneas das três espécies de arraias investigadas.

No capítulo 6 foi realizada uma investigação comparativa da hematologia e das propriedades físicas e químicas da água entre as arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, além do mais foi investigado variáveis biológicas, tais como: o estágio de desenvolvimento, o dimorfismo sexual e o estado de gravidez. No capítulo 7 foi realizada uma investigação o perfil fisiológico, os parâmetros físicos e químicos da água, comparando e correlacionando ecologicamente entre as arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, por meio de procedimentos multivariados.

CAPÍTULO 1

O estado atual sobre o conhecimento de arraias Potamotrygonidae

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Maria Lúcia Góes de Araújo², Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos³, Paulo Henrique Aride Rocha⁴, Jackson Pantoja-Lima⁵, Marcos Tavares-Dias⁶, Jaydione Luiz Marcon⁷

1. Biólogo, Doutor em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
2. Oceanógrafa, Doutora em Diversidade Biológica, Pesquisadora da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.
3. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM.
4. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
5. Engenheiro de Pesca, Doutor em Ecologia, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
6. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), Macapá, AP
7. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo apresentar as informações disponíveis na literatura sobre os vários aspectos das arraias de água doce. Para a obtenção desses resultados foram realizados levantamentos bibliográficos nas várias fontes disponíveis. Os resultados indicam que houve um aumento significativo das informações científicas nos últimos anos. As informações de diversidade, ocorrência e registros são confusas mais vem ocorrendo o registro de novas espécies, incluindo ainda um novo gênero. A pesca é predominantemente para aquarofilia, a pesca negativa é resultado da falta de educação ambiental existente. Ampla variação citogenética foi observada, entre todos os aspectos biológicos investigados os alimentares e a parasitologia são os mais estudados. Os aspectos da biologia reprodutiva são complexos e existe uma semelhança aos mamíferos do que a peixes teleósteos. As informações disponíveis até o momento na literatura são essenciais para esse grupo de elasmobrânquios que ocorre apenas na América do Sul, servindo para futuras práticas em trabalhos de pesca, aquicultura, ecologia, genética, evolução, manejo e principalmente para conservação.

Palavras chave: Potamotrigonídeos; Biologia; Diversidade; Pesca; Comércio.

ABSTRACT

This study aimed to present the information available of research on various aspects from freshwater stingrays. To obtain these results were achieved several bibliographic sources available. The results indicate that in the recent years there was a significant increase about the scientific knowledge of this group. Information on the diversity, and occurrence records are yet confusing, and have been made registration of new species, including even a new genus. Fishing is predominantly for use in aquarium, fishing negative result is the lack of existing environmental education. Wide variation was observed cytogenetic among all biological aspects investigated parasitology and food are the most studied. Aspects of reproductive biology are complex and there is a similarity to mammals than teleost fish. The information available so far in the literature are essential for this group of elasmobranchs occurring naturally only in South America, serving for future work practices in fisheries, aquaculture, ecology, genetics, evolution, management and mainly for conservation.

Keywords: Potamotrigonids; Biology; Diversity; Fishing; Trade.

1. INTRODUÇÃO

Entre os integrantes da fauna aquática estão um grupo de peixes cartilaginosos (Chondrichthyes) que apresentam distribuição natural restrita a América do Sul que são as arraias de água doce que pertencem à família Potamotrygonidae. Na região amazônica encontra-se a maior diversidade de espécies de potamotrigonídeos, algumas com ampla distribuição (ROSA, 1985; ARAÚJO, 1998; CARVALHO et al., 2003; ARAÚJO, 2004) em diversos habitats, onde consomem uma ampla variedade de

presas (SHIBUYA; ZUANON, 2013). As arraias do gênero *Potamotrygon* possuem grande heterogeneidade de cores e aparência exótica, que desperta grande interesse entre aquarofilistas de diversas partes do mundo.

Dependendo da finalidade, a captura de arraias é geralmente realizada com diferentes instrumentos de pesca, tais como puçá de mão, malhadeiras, espinhel e arpão, também conhecido como zagaia (OLIVEIRA et al., 2012). No Brasil, os Estados do Amazonas e Pará possuem maior representatividade na cadeia extrativista de arraias e juntos capturam cerca de seis espécies. Porém, não se sabe exatamente quando a atividade de extração de arraias potamotrigonídeos iniciou-se, mas há relatos que as arraias da bacia amazônica são capturadas há mais de 25 anos, usadas como objeto de aquarismo (RINCON; CHARVET-ALMEIDA, 2006) em países de alguns continentes. Porém, na bacia do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, o mercado de peixes ornamentais existe desde 1955 (CHAO et al., 2001), pois é responsável por cerca de 60% da renda dos municípios, Barcelos e Santa Isabel, os quais abrigam as maiores áreas de pesca ornamental do Brasil.

O presente estudo tem o objetivo de concatenar as informações existentes sobre a diversidade das arraias de água doce, sua utilização no mercado, regulamentação dos órgãos responsáveis pela fiscalização do comércio, pesca negativa, os acidentes provocados por esses animais e os aspectos biológicos, tais como o estudo da genética, hábitat, invasão, forrageio, aspectos alimentares, reprodução, parasitologia, fisiologia e adaptação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizadas pesquisas bibliográficas baseadas em relatórios, monografias, dissertações, teses, livros, capítulos de livros e artigos disponíveis no Portal Periódicos Capes, Scielo, Google Acadêmico, Web of Knowledge e bibliotecas digitais das universidades, todas publicadas no período de 1967 a 2013.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Os potamotrigonídeos e o comércio

A família Potamotrygonidae Garman 1877 compreende as espécies de elasmobrânquios pertencentes à ordem Myliobatiformes (arraias com ferrão), um grupo bem sucedido e com status de predadores do topo de cadeia alimentar, na região Neotropical (COMPAGNO; COOK, 1995). Os potamotrigonídeos são o único táxon dentro de Chondrichthyes que são adaptados exclusivamente à vida em água doce (COMPAGNO; COOK, 1995).

Até 2010, os potamotrigonídeos eram compostos por 20 espécies válidas distribuídas nos gêneros *Potamotrygon*, *Paratrygon* e *Plesiotrygon* (ROSA et al., 2010). Carvalho e Ragno (2011) descreveram uma nova espécie denominada *Plesiotrygon nana* e dessa forma esse gênero deixou de ser monoespecífico. O gênero *Paratrygon*, que até 2004 era considerado monoespecífico, vem sendo reconhecido por alguns especialistas como um complexo de espécies (FREDERICO, 2006; FREDERICO et al., 2012), enquanto *Potamotrygon* é constituído atualmente por 21 espécies válidas após a descrição de *Potamotrygon marinae* (DEYNAT, 2006), *Potamotrygon boesemani* (ROSA et al., 2008) e *Potamotrygon tigrina* (CARVALHO et al., 2011). Estudos anteriores já indicavam pelo surgimento de um quarto gênero (ISHIHARA; TANIUCHI, 1995; CHARVET-ALMEIDA, 2001), essa tendência foi confirmada por Carvalho e Lovejoy (2011) que descreveram o gênero *Heliotrygon* ao qual foram descritas as espécies *Heliotrygon gomesi* e *Heliotrygon rosai*.

Apesar desses avanços o *status* taxonômico e sistemático, bem como os padrões biogeográficos são ainda confusos e controversos para esta família, devido a descrições antigas e baseadas em poucos exemplares (CASTEX, 1963, 1964, 1967; ROSA, 1985; ROSA et al., 2010). Além disso, os complexos padrões de policromatismo, a sobreposição de caracteres morfométricos e de padrões de cor com outras espécies indicam que os problemas taxonômicos e sistemáticos existentes na família Potamotrygonidae estão longe de serem elucidados e esforços nesse sentido são necessários.

Embora a literatura demonstre a ocorrência de *Potamotrygon signata* no Rio Parnaíba, Nordeste brasileiro (MORO et al., 2012) e de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon brachyura* no baixo rio Uruguai (ODDONE et al., 2012) é na região amazônica que encontra-se a maior diversidade de espécies de potamotrigonídeos, algumas com distribuição ampla como as arraias *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi*, e outras com distribuição restrita como as espécies *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon* sp. (arraia jabuti), *Potamotrygon leopoldi* e *Potamotrygon henlei* que são endêmicas das bacias do Rio Negro, Rio Tapajós, Rio Xingu e Rio Tocantins, respectivamente (ROSA, 1985; ARAÚJO, 1998; CARVALHO et al., 2003; ARAÚJO, 2004).

A exploração das arraias de água doce como fonte de alimento ainda não é prática comum na bacia amazônica. Entretanto, espécies como *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro* devido o seu grande porte tem sido capturadas nas bacias do Rio Negro e Amazonas e exportadas para mercados consumidores do Sudoeste do país (ARAÚJO et al., 2005). Duncan et al. (2010a) afirmam que a utilização de arraias de água doce para fins de consumo já vem ocorrendo normalmente na bacia do Rio Negro, a exemplo do ocorrido em outras áreas como na calha do Rio Amazonas, esses registros já haviam sido relatados por Araújo et al., na mesma bacia em 2005. Nas regiões do estuário Amazônico (Ilha de Marajó) espécies como *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina* vem sendo normalmente comercializadas no mercado municipal de Colares (Pará), ao preço de R\$ 1,00/kg, com estimativa de consumo de mais de 100 toneladas por ano. Devido ao fato dos potamotrigonídeos serem classificados como animais k-estrategistas, se a exploração desse recurso como fonte de alimento continuar a crescer, em um futuro breve as populações locais destas espécies poderão estar vulneráveis ou em perigo de extinção (DUNCAN et al., 2010a).

O grande mercado de utilização das arraias de água doce é como animal de aquariofilia (CHAO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005; DUNCAN et al., 2010a), estima-se que mais de 60.000 espécimes são vendidos em vários locais do mundo por ano, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 47.000 espécimes exportadas

anualmente (soma do mercado legal e ilegal) (CITES, 2006) e o Peru e Colômbia respondem por outros 15.000 espécimes (MOREAU; COOMES, 2007). Outra forma de exploração é a oriunda da produção em cativeiro que ocorre em países do sudeste da Ásia que acrescentou mais espécimes ao comércio internacional e contribuiu para a popularização desse recurso nesse continente, devido à maior acessibilidade a esse recurso ocasionada pelo baixo valor de mercado, aliado ao hibridismo ocasionado pelos vários padrões de colorações dorsais (CITES, 2009).

Da exploração e exportação das arraias de água doce como peixe ornamental pelo Brasil, 96,8% é destinado ao mercado internacional (DUNCAN et al., 2010a). Os principais países que importam esse recurso são a Alemanha, Estados Unidos e países asiáticos, em uma atividade consolidada há aproximadamente três décadas (ARAÚJO et al., 2005; RINCON; CHARVET-ALMEIDA, 2006). Duncan et al., (2010a) relatam que o custo unitário de cada arraia com fim ornamental nas áreas de pesca é de R\$ 1,00, estimativas apontadas pelos mesmos autores revelam que na última década o comércio dos potamotrigonídeos como peixe ornamental gerou faturamento de aproximadamente US\$ 20 milhões. Entretanto, esse faturamento deve ser bem maior, visto que muitas arraias são capturadas no Brasil e exportadas pela Colômbia ou Peru, haja vista nesses países não existem qualquer controle sobre a exploração desse recurso (ARAÚJO et al., 2004).

Os estados do Pará e Amazonas são os únicos que podem comercializar legalmente os potamotrigonídeos como fonte ornamental, a não liberação por parte dos órgãos competentes de cotas/ano destinadas a outros estados está consignada a falta de avaliação dos estoques pesqueiros. Atualmente, os estados do Pará e o Amazonas exportam cerca de 20.000 unidades/ano, desse total o Amazonas tem uma cota anual maior do que o estado do Pará (12.200 unidades/ano) (IBAMA, 2008). Do total de 4 espécies comercializadas pelo Amazonas (arraia cururu *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon schroederi* e *Potamotrygon motoro*), todas ocorrem na bacia do médio Rio Negro, Barcelos, localidade conhecida mundialmente como a capital mundial do peixe ornamental (CHAO et al., 2001). Embora a quantidade

de arraias de água doce oriundas da pesca extrativista no médio Rio Negro seja pequena, menos de 0,1% do total de peixes ornamentais exportados pelo estado do Amazonas, esse mercado é de grande valia e gera grandes divisas, devido os altos valores que cada exemplar pode ter no exterior (até US\$ 4 mil). Além dessa importância econômica, a pesca de potamotrigonídeos também contribui para a manutenção dos estoques populacionais de outros peixes ornamentais como *Paracheirodon axeroldi* o cardinal. A pesca de arraias ocorre no período noturno, enquanto a pesca de piabas (pequenos peixes) ornamentais ocorre no período diurno. Normalmente o pescador se utiliza de um turno de trabalho (noturno ou diurno), um para pescar e o outro para descansar (ARAÚJO et al., 2005).

A regulamentação da exploração dos potamotrigonídeos é bem diferente das retratadas em peixes teleósteos. Até o ano de 1998 não existia qualquer controle sobre a exploração das arraias de água doce, no mesmo ano foi criada a primeira portaria federal de N^o. 022/98 (IBAMA, 1998) que determinou um sistema de cotas/ano de espécies do gênero *Potamotrygon* que poderia ser comercializada, subsequentemente duas novas legislações foram regulamentadas para o ordenamento desse recurso. Apenas em 2005 o IBAMA lançou a IN 027/05 que manteve a exportação de exemplares de *Potamotrygon* em sistemas de quotas por espécie/ano para o mercado internacional. Entretanto em 2006, por meio da IN 118/06 a pesca de arraias de água doce foi proibida em território nacional (IBAMA, 2006), fato que inviabilizou a continuidade da exportação e acabou incentivando a remessa ilegal de arraias para o mercado internacional, bem como a degradação da floresta e exploração de outros organismos aquáticos tais como o cardinal, os tucunarés *Cichla* spp. e a irapuca *Podocnemis erythrocephala*. Essa proibição perdurou por dois anos e no início de novembro de 2008, por meio da instrução normativa 204/08 (Tabela 1) que permanece em vigor, o comércio das arraias de água doce foi novamente liberado para fins de aquarofilia para os estados do Pará e Amazonas.

Tabela 1. Espécies de arraias Potamotrygonidae com permissão de exploração para fins de ornamentação e aquariorfilia, cotas anuais por espécie e largura do disco máxima (LD_{max}) para exploração. Fonte: Instrução Normativa 204/2008 - IBAMA.

Nome Científico	Nome comum	LD _{max}	Cotas		
			Amazonas	Pará	Total
<i>Potamotrygon motoro</i>	Motoro	30 cm	4.000	1.200	5.200
<i>Potamotrygon cf. histrix</i>	Cururu	14 cm	6.000	-	6.000
<i>Potamotrygon schroederi</i>	Schroederi	30 cm	1.000	-	1.000
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Orbignyi	30 cm	1.200	1.200	2.400
<i>Potamotrygon cf. henlei</i>	Henlei	30 cm	-	1.000	1.000
<i>Potamotrygon leopoldi</i>	Leopoldi	30 cm	-	5.000	5.000
Total	-	-	12.000	8.400	20.600

Do total de aproximadamente 25 espécies existentes da família Potamotrygonidae pelo menos cinco ocorrem na região do médio Rio Negro, Amazonas, nas proximidades do município de Barcelos (ARAÚJO et al., 2004). Dessas, destacam-se a arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) que é a principal espécie de arraia de água doce ornamental e responsável por aproximadamente 50% das exportações do estado do Amazonas e cerca de 30% das arraias comercializadas quando considerado Amazonas e Pará (IBAMA, 2008). A segunda espécie de arraia de maior representatividade no mercado internacional é *Potamotrygon motoro*, responsável por 25% das exportações anuais (IBAMA, 2008). Entretanto, Duncan et al. (2010) retratam que ao se considerar todos os anos em que se utiliza o sistema de cotas/ano a arraia *Potamotrygon motoro* é a espécie mais comercializada com aproximadamente 45.000 exemplares comercializados ao longo de 13 anos. Com ampla distribuição pela bacia Amazônica (CARVALHO et al., 2003), essa espécie atinge tamanho de até 70 cm, seu habitat preferencial compreende áreas com fundo

lamacento, onde existe a influência mais visível do fluxo de água quando comparado as áreas de igapó, entretanto, dependendo do nível do rio esse tipo de arraia pode habitar também as áreas de igapó a exemplo do que ocorre com a arraia cururu. Essa característica normalmente é observada nas épocas de seca, pois, a baixa acentuada do nível das águas, associada à grande quantidade de bancos de areias proporcionam o confinamento dessas espécies em áreas com fundo de folhiço.

Além das espécies do gênero *Potamotrygon* a arraia *Paratrygon aiereba* também vem sendo importante comercialmente no estado do Amazonas. Essa espécie possui grande porte, atingindo até 130 cm de largura do disco e chegando a pesar mais de 100 Kg. Apresenta segregação sexual e segregação espacial por tamanhos, na qual jovens e sub-adultos de ambos os sexos tendem a ficar agregados na mesma área (ARAÚJO, 2011). Por outro lado, machos e fêmeas adultas encontram-se isolados em diferentes áreas (ARAÚJO, 1999; CHARVET-ALMEIDA et al. 2005a). Esta espécie apresenta distribuição ampla ao longo da bacia Amazônica, sendo predominantemente explorada pela pesca comercial. Seu habitat preferencial se constitui de regiões de praias (fundo arenoso), onde normalmente observa-se um fluxo mais evidente da correnteza. Na bacia do rio Tapajós vem sendo observada redução dos estoques naturais dessa espécie, devido à exploração pesqueira em larga escala (DUNCAN, 2008). No estado do Amazonas, alguns frigoríficos localizados no município de Iranduba também têm intensificado a compra desses animais para o processamento e comercialização de filés congelados, sem nenhum controle na exploração desse pescado (CRUZ, 2009), embora esse procedimento não seja prática comum na bacia Amazônica, Batista (2008) estudando a caracterização tecnológica e o perfil de ácidos graxos das espécies *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro*, concluiu que essas espécies apresentam um bom rendimento cárneo das nadadeiras peitorais, constituídos por carnes magras (menos de 1% de gordura), principalmente para a espécie *Paratrygon aiereba*.

Arraias do gênero *Potamotrygon* e *Paratrygon* vêm nos últimos 5 anos participando sistematicamente do desembarque pesqueiro na região Amazônica, tanto

assim que atualmente frotas pesqueiras estão equipadas especialmente para efetuar a captura de arraias (BATISTA, 2008). Esse cenário preocupa e desperta a necessidade de planos de manejo adequados para a conservação desse grupo de elasmobrânquios oriundos da América do Sul (CARVALHO et al., 2003). Além do mais, o que vem sendo observado sobre os potamotrigonídeos é que existe ainda uma necessidade de se investigar a biologia das principais espécies, sendo que, essas informações geradas poderão prover conhecimentos para o uso racional e defesa dos estoques nativos desse grupo de elasmobrânquios.

3.2. Pesca negativa e acidentes

Os potamotrigonídeos não sofrem apenas por sua captura para servir como fonte de alimento ou como peixe ornamental, mas também pela pesca indiscriminada no período da seca, na qual a redução e isolamento de habitats tornam esses animais mais susceptíveis à captura e predação. Nesse período, na bacia do Rio Negro, é muito comum a prática da “limpeza”, isto é, a remoção de todas as arraias encontradas a fim de prevenir acidentes, com estimativas de captura de até 21 mil indivíduos num só ano (ARAÚJO, 2004). O grande temor a esses elasmobrânquios ocorre devido à presença de um a três ferrões em sua cauda que são recoberto por células epidérmicas que secretam veneno (PEDROSO et al., 2007) que, em caso de acidentes, pode provocar ferimentos graves e bastantes dolorosos (GARRONE NETO; HADDAD JR., 2009). Em arraias de água doce existe um número maior de células secretoras de veneno do que em arraias marinhas, essa diferença permite concluir que em potamotrigonídeos as ferroadas são mais dolorosas e severas do que as arraias marinhas (PEDROSO et al., 2007).

A ocorrência de acidentes retrata apenas um mecanismo de defesa do animal, que quando tocados dorsalmente reagem por um mecanismo reflexivo de chicotear sua cauda, causando perfuração do membro, provocando dor intensa no local, edema e eritema, de forma secundária pode ocorrer infecções bacterianas e necrose cutânea (PEDROSO et al., 2007; ANTONIAZZI et al., 2011). Nesse contexto, é

muito comum encontrar esses animais mutilados pela retirada da extremidade da cauda, essa mutilação dificulta a natação e compromete todas as atividades dependentes deste comportamento.

Em um estudo realizado em quatro comunidades da Área de Proteção Ambiental do Rio Curiaú, Estado do Amapá, foram observados que as pessoas acidentadas com arraias de água doce apresentam faixa etária acima de 15 anos e que a maioria (86%) foi afligida nos membros inferiores, além os acidentes ocorreram, em sua maioria, no período da tarde e na estação de verão (OLIVEIRA et al., 2011). A terapêutica mais utilizada pela população vitimada foi à popular com o uso de urina, ervas e óleos e fitoterápico específico, esses resultados reforçam a necessidade das autoridades públicas atentarem para a subnotificação dos acidentes por raias e para a proposição de medidas que estimulem estudos de terapêutica adequada e qualificação pertinente dos profissionais de saúde (OLIVEIRA et al., 2011).

Forster (2009) investigando os impactos dos potamotrigonídeos na população ribeirinha e demais frequentadores do alto curso do Rio Paraná e em alguns afluentes percebeu que em geral os ribeirinhos possuem relativo conhecimento sobre as arraias e do risco potencial de ferimento pelo ferrão, conhecem os lugares de preferência de hábitat e comportamento. Recentemente, Oliveira et al., (2012) descreveram importantes recomendações sobre manuseio de arraias durante os procedimentos em estudos científicos.

3.2. Genética

Em um estudo citogenético realizado com arraias no médio Rio Negro, Amazonas, por Valentim et al., (2006), foi observado que os tipos cromossômicos de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi* possuem o mesmo número diplóide de $2n=66$ cromossomos, enquanto que em *Paratrygon aiereba* possui $2n=90$ cromossomos. Arraias da espécie *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* capturadas no alto Rio Paraná, Paraná, apresentaram $2n=66$, fêmeas possuem $2n=66$

cromossomos, enquanto machos $2n=65$ em ambas as espécies, esse heteromorfismo cromossômico encontrado é devido à ocorrência de sistemas cromossomos sexuais do tipo $X1X1X2X2/X1X2Y$ (CRUZ et al., 2011). Em um estudo mais amplo foram determinados os aspectos citogenéticos de *Plesiotrygon iwamae* ($2n=74$, $NF=120$), *Potamotrygon* sp. C (cururu) ($2n=67♂/68♀$, $NF=104/106$), com sistema de determinação do sexo $XX/X0$, *Potamotrygon scobina* ($2n=66$, $NF=102$), *Potamotrygon* cf. *scobina* ($2n=66$, $NF=101$), ambas com provável sistema de determinação de sexo XX/XY , *Potamotrygon constellata* ($2n=66$, $NF=110$), *Potamotrygon leopoldi* ($2n=64$, $NF=102$), *Potamotrygon orbignyi* ($2n=66$, $NF=106$), confirmando a presença do sistema XX/XY e *Potamotrygon motoro* de diferentes localidades da bacia amazônica central (VALENTIM, 2012).

Cruz (2009) realizou o mapeamento físico dos genes ribossomais 5s e 18 s em *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* e gerou informação para melhor compreender dos processos evolutivos em arraias do gênero *Potamotrygon*. Além do mais, foi demonstrado a organização molecular e o mapeamento genômico de duas classes de DNAr 5s em *Potamotrygon motoro* (CRUZ, 2009). Apesar desses pequenos avanços citogenéticos sobre as arraias de água doce, existe ainda uma lacuna sobre essas informações desse grupo de elasmobrânquios de vida restrita a água doce.

Com relação a história evolutiva, Lovejoy et al.(1998), baseados em estudo de filogenia e relógio molecular, propuseram que o ancestral comum da família Potamotrygonidae (*Himantura schmardae* + *Himantura pacifica*) tenha invadido águas continentais a partir do norte da América do Sul, entre 23 e 15 milhões de anos atrás, período em que ocorreu grande transgressão marinha. Marques (2000), baseado em relógio molecular, encontrou a idade de origem da família em cerca de 18 milhões de anos atrás, além do mais foi confirmado que *Paratrygon aiereba* é a espécie mais basal da família (LOVEJOY et al., 1998; MARQUES 2000; TOFFOLI, 2006).

Toffoli (2006) revela que a grande variabilidade de morfotipos (notavelmente padrões de coloração) encontrada nas arraias *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*, provavelmente se deve a uma combinação de fluxo

gênico restrito entre as populações, associado com seleção natural aos ambientes locais, esse processo pode ter sido importante na diversificação das espécies de arraiais de água doce.

Recentemente Frederico et al., (2012) investigando a estrutura genética de *P. aiereba* concluíram que essa pertence ao grupo irmão dos outros gêneros da família Potamotrygonidae, além do mais os resultados para o fragmento ATPase mostraram que essas populações estão estruturadas dentro dos rios, com fluxo gênico restrito, ou mesmo sem fluxo gênico. Também foi retratado para essa espécie segundo as premissas para barcoding e a distribuição alopátrica de três clados em *Paratrygon aiereba* indica que esse grupo pode ser um complexo de espécies (FREDERICO et al., 2012).

3.3. Habitat e invasão

As arraiais de água doce exploram diversos habitats, que vão desde praias, pequenas enseadas de fundo rochoso ou barrento, folhiço, lagos até as florestas inundadas (CARVALHO et al., 2003). Sua característica comportamental nesses ambientes é a de enterrar superficialmente a extremidade de seu corpo quando em repouso ou na busca por alimento (GARRONE NETO; SAZIMA, 2009).

Para *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*, uma análise das formas de uso do habitat mostrou que ambas as espécies apresentaram comportamento semelhante, com nítida segregação espacial dos indivíduos em função do seu tamanho, da profundidade e do período do dia (GARRONE NETO; UIEDA, 2012).

Assim como observado em outros elasmobrânquios, os potamotrigonídeos apresentam preferências quanto à ocupação e uso de hábitat associados às condições ambientais (ALMEIDA et al., 2009), entretanto, Ng et al., (2010) relatam a ocorrência de 5 espécimes de *Potamotrygon motoro*, incluindo adultos, prenhas e neonatos, em um reservatório em Singapura no sudeste asiático. Ao que tudo indica esses espécimes parecem ter se adaptado perfeitamente as condições desse ambiente, esta descoberta

representa o primeiro registro confirmado da introdução estabelecida de potamotrigonídeos fora da região neotropical, porém, ainda não existem informações sobre a interação desses organismos dentro desse ecossistema. No Brasil Garrone Neto et al., (2006) registraram a ocorrência de duas espécies de arraias de água doce no Alto Rio Paraná, Sete Quedas de Guairá, Paraná, aos quais não faziam parte da fauna nativa da região há pouco mais de duas décadas, essa invasão ocorreu devido a construção de hidrelétricas naquela localidade, a ocorrência de potamotrigonídeos tem sido cada vez mais recorrente nessa localidade ampliado as áreas de distribuição dos potamotrigonídeos aos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (GARRONE NETO; HADDAD JR, 2010).

3.4. Forrageio e aspectos alimentares

O uso das nadadeiras pélvicas durante o forrageamento de *Potamotrygon motoro* em cativeiro mostrou-se importante para captura de presas e pode ser considerado um mecanismo auxiliar para uma maior eficiência da captura e processamento das presas, junto com as nadadeiras peitorais (SHIBUYA, 2009). Foi observado que quando *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* forrageiam, elas agitam o substrato que proporcionam a formação de nuvens de poeira, que se constitui num atrativo para quatro espécies de ciclídeos. Esses teleósteos se aproximam das nuvens de poeiras imediatamente após o forrageio e permanecem nas proximidades das arraias enquanto durar essa atividade (GARRONE NETO; SAZIMA, 2009), confirmando que esse comportamento trata-se de uma atividade na busca por alimentos. Além do mais Garrone Neto e Carvalho (2012) por meio de observações sub e supra-aquáticas também registraram associações alimentares do tipo nuclear-seguidos (comensalismo) entre três espécies de peixes characiformes e a arraia *Potamotrygon orbignyi*

A princípio existe uma vantagem ao fato das arraias de água doce possuir corpos achatados dorso ventralmente e com formato circular, a vantagem de poder usar de suas nadadeiras na captura dos alimentos, conforme comentado anteriormente.

Entretanto, esse formado corpóreo impede a visualização da presa quando esta encontrasse abaixo de seu corpo, desta forma os potamotrigonídeos necessitaram desenvolver outras adaptações para solucionar esse problema. Shibuya et al. (2010) mostraram que a linha lateral em espécimes de *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *Paratrygon aiereba* apresentaram padrões semelhantes de distribuição de canais. No ventre do corpo essa distribuição se concentrou principalmente ao redor da boca e das narinas evidenciando a importância táctil dessa estrutura quando a presa encontrasse sob o corpo do animal (SHIBUYA et al., 2010). Por outro lado os canais dorsais podem ter a função de identificar a presença de predadores, como também podem auxiliar na localização de presas, visto que esses elasmobrânquios possuem hábitos bentônicos (SHIBUYA et al., 2010) e que o período de atividade alimentar é predominantemente noturno a exemplo das espécies *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (GARRONE NETO; UIEDA, 2012).

A tática alimentar de *Potamotrygon motoro* demonstra que essa espécie eleva o focinho durante a detecção da presa o que facilita a identificação de movimentos na água produzidos pelas presas, por outro lado, pode existir diferença nesse comportamento dependendo do tipo sexual, porém são necessários estudos adicionais para comprovar essa hipótese (SHIBUYA et al., 2010). Em um estudo sobre a morfometria das arraias *Potamotrygon* cf. *motoro* e *Potamotrygon falkneri* foi constatado que não existem diferenças na largura da boca de ambas as espécies, permitindo concluir que não existe diferença na composição da dieta dessas espécies (SILVA; GOULARD, 2007). Shibuya et al., (2010) estudando a musculatura da boca de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi* concluíram que de acordo com o item alimentar preferencial os potamotrigonídeos desenvolvem mais a musculatura orobranquial, seja para triturar carapaças rígidas (no caso, crustáceos) ou ainda para ingerir larvas de insetos. Shibuya et al., (2012) investigando em *Potamotrygon motoro* o uso da musculatura orobranquial na captura e processamento de presas durante a alimentação, concluíram que os músculos adutores responsáveis pelo fechamento da boca apresenta alta biomassa, o qual foi consistente com sua função para apreensão e manipulação de presas.

O estômago dos potamotrigonídeos apresenta um formato de “J” (CHARVET-ALMEIDA, 2006), sendo que este pode ser dividido em duas porções principais: a cardíaca e a pilórica (HOLMGREN; NILSSON, 1999). A porção cardíaca é mais dilatada e sua superfície interna apresenta rugosidade granular, enquanto que a porção pilórica apresenta pregas longitudinais na superfície interna (MORO et al., 2011).

Em relação à análise dos conteúdos estomacais em potamotrigonídeos, Achenbach; Achenbach (1976) relataram mudanças ontogênicas na alimentação, pois quando os indivíduos são neonatos consomem plâncton e à medida que crescem passam a alimentar-se de moluscos, crustáceos e larvas de insetos. Posteriormente Rosa et al. (1987) analisando o conteúdo estomacal de *Plesiotrygon iwamae* encontraram teleósteos, restos de insetos e crustáceos. Subsequentemente Lasso et al. (1996) concluíram que *Potamotrygon orbignyi* e *Paratrygon aiereba*, da bacia do Rio Apure, na Venezuela, são insetívoras e piscívoras, respectivamente. Recentemente Shibuya et al., (2010) analisando as espécies *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *Paratrygon aiereba* oriundas do médio Rio Negro, Amazonas, demonstraram que essas espécies possuem hábitos alimentares diferenciados, sendo *Potamotrygon orbignyi* insetívoras, *Potamotrygon motoro* carcinófago, *Paratrygon aiereba* piscívora e *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) com uma dieta generalista variando de camarões, caranguejos a larvas de libélulas (SHIBUYA et al., 2009). Foi constatado também um alto número de estômagos vazios e com poucos itens alimentares nas espécies descritas acima, essa observação permite concluir que as arraias analisadas não são consumidoras frequentes (SHIBUYA et al., 2009). As diferenças alimentares encontradas entre *Potamotrygon orbignyi*, *Potamotrygon motoro*, *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) podem estar relacionadas a diferenças nos ambientes em que cada espécie utiliza durante o forrageio, embora habitem o mesmo sistema aquífero, o Arquipélago de Mariuá no estado do Amazonas. Recentemente, Shibuya; Zuanon (2013) registraram a presença de peixes Callichthyidae, Cetopsidae, Doradidae e Loricariidae em estômagos de *Paratrygon aiereba* e *Plesiotrygon iwamae* do Rio Solimões, indica a importância desse grupo como presa na dieta de potamotrigonídeos.

A dieta de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* apresentou variação sazonal distinta associada à variação na disponibilidade dos recursos alimentares, caracterizando uma flexibilidade trófica dessas espécies (LONARDONI et al., 2006). No período de cheia *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* tiveram sobreposição trófica, alimentando-se principalmente de moluscos, na época de seca houve dietas diferenciadas onde *Potamotrygon falkneri* teve como item alimentar preferencial peixes, enquanto *Potamotrygon motoro* alimentou-se principalmente de insetos, esta diferença em época de seca constitui-se em uma estratégia para evitar as interações competitivas nesse período (LONARDONI et al., 2006). Vasconcelos; Oliveira (2011) também encontraram diferença sazonal na dieta de *Potamotrygon motoro*, no período de cheia houve predominância de moluscos e peixes, enquanto no período de seca a predominância foi de crustáceos e peixes. Senão bastasse as diferenças alimentares encontradas entre espécies distintas e entre períodos sazonais, Almeida et al., (2010) relatam encontrar diferenças na dieta de *Potamotrygon motoro* em ambientes diferentes de uma mesma bacia, ora consumiram preferencialmente crustáceos outra hora peixes, essas diferenças se confirmam quando se confrontam os itens alimentares preferências de uma mesma espécie (*Potamotrygon motoro*) oriunda do médio Rio Negro, Amazonas, nos trabalhos descritos por Shibuya et al. (2009) que relatam como item preferencial os moluscos, enquanto em época de seca a mesma espécie oriunda do alto Rio Paraná, entre o Paraná e Mato Grosso do Sul, teve como item preferencial insetos. Moro et al. (2012) analisando o conteúdo estomacal de *Potamotrygon signata* concluíram que essa é essencialmente insetívora, entretanto, foram relatadas diferenças sexuais e ontogenéticas que podem estar relacionadas a diferentes necessidades nutricionais. De uma maneira geral, é possível demonstrar de forma simplificada os itens alimentares preferenciais em várias espécies de arraias de água doce, conforme demonstrado na Tabela 2, demonstrando que as arraias de água doce apresentam um nível trófico intermediário, predominante como consumidores secundários (RINCON, 2006).

Tabela 2. Dieta preferencial das espécies de Potamotrygonidae e locais de captura.

Espécies	Itens preferenciais	Localidades	Referências
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Peixes, insetos e crustáceos	Rio Solimões e Napo no Brasil	ROSA et al. (1987)
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Peixes	Rio Solimões	SHIBUYA & ZUANON (2013)
<i>Potamotrygon aiereba</i>	Peixes	Rio Apure, Venezuela	LASSO et al. (1996)
<i>Potamotrygon henlei</i>	Moluscos	Rio Cristalino, Mato Grosso	PÂNTANO-NETO (2001)
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Moluscos e insetos	Alto Rio Paraná, entre São Paulo e Mato Grosso do Sul	SILVA; UIEDA (2007)
<i>Potamotrygon aiereba</i>	Peixes	Rio Negro, Amazonas	SHIBUYA et al. (2009); SHIBUYA & ZUANON (2013)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Moluscos	Rio Cristalino, Mato Grosso	PÂNTANO-NETO (2001)
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Moluscos e peixes	Rio Paraná, entre o Paraná e Mato Grosso do Sul	LONARDONI et al. (2006)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Moluscos e insetos	Rio Paraná, entre o Paraná e Mato Grosso do Sul	LONARDONI et al. (2006)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Insetos	Alto rio Paraná, entre São Paulo e Mato Grosso do Sul	SILVA; UIEDA (2007)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Crustáceos	Rio Negro, Amazonas	SHIBUYA et al. (2009)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Peixes, crustáceos,	Rio Curiaú, Amapá	VASCONCELOS;

		moluscos, insetos, fragmentos vegetais e dentritos/sedimentos		OLIVEIRA (2011)
<i>Potamotrygon</i> (cururu)	sp.	Crustáceos e insetos	Rio Negro, Amazonas	SHIBUYA et al. (2009)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		Insetos	Rio Apure, Venezuela	LASSO et al. (1996)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		Insetos	Rio Paranã, Tocantins	RINCON (2006)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		Insetos	Rio Negro, Amazonas	SHIBUYA et al. (2009)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		Insetos	Rio Parnaíba, Piauí	MORO et al. (2011)
<i>Potamotrygon signata</i>		Insetos	Rio Parnaíba, Piauí	MORO et al. (2012)

3.4. Aspectos da biologia reprodutiva

O conhecimento das táticas reprodutivas é fundamental para a compreensão das estratégias do ciclo da vida bem como para nortear medidas de administração, manejo e preservação frente a impactos, como exaustão dos estoques naturais (VAZZOLER; MENEZES, 1992). Os potamotrigonídeos são vivíparos, com fecundação interna e desenvolvimento de troponemata, apresentam o ciclo reprodutivo regulado pelo ciclo hidrológico, fecundidade ovariana de 1 a 8 filhos e gravidez de 3 a 9 meses (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005b), aspectos mais próximos aos observados em mamíferos do que ao próprio grupo dos peixes. Além disso, após o nascimento as fêmeas exibem cuidado parental sobre a prole, que pode durar até um mês após o parto (ARAÚJO, 1998). A literatura demonstra que a largura do disco é o principal dado biométrico que permite diferenciar os estágios de desenvolvimento das espécies de potamotrigonídeos. A tabela 3 apresenta os trabalhos realizados sobre aspectos da biologia reprodutiva das espécies.

Tabela 3. Aspectos da biologia reprodutiva das espécies de Potamotrygonidae de água doce.

Espécie	Descrição	Localidade (s)	Autor (es)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Cuidado maternal	Médio Rio	ACHENBACH;
<i>Potamotrygon brachyura</i>		Paraná, Paraná	ACHENBACH (1976)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Vivípara aplacentária	Animais de cativoiro	THORSON et al. (1983)
<i>Potamotrygon constellata</i>			
<i>Paratrygon aiereba</i>	Semelhanças na estrutura anatômica do cláspere	Bacia Amazônica, Manaus	TANIUCHI; ISHIHARA (1990)
<i>Potamotrygon motoro</i>		Santa Fé, Argentina	
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		Iquitos, Peru	
<i>Potamotrygon magdalenae</i>	Biologia reprodutiva e aspectos histológicos	Rio Magdalena, Colômbia	TESHIMA; TAKESHITA (1992)
<i>Paratrygon aiereba</i>	Descrição de aspectos da biologia reprodutiva	Região das planícies Venezuelanas	LASSO et al. (1996)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>			
<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)	Biologia reprodutiva e aspectos histológicos	Rio Negro, Amazonas	ARAÚJO (1998)
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Biologia reprodutiva	Baía de Marajó, Pará	CHARVET-ALMEIDA (2001)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Biologia reprodutiva	Rio Negro, Amazonas	CHARVET-ALMEIDA et al. (2005b)
<i>Potamotrygon schroederi</i>			
<i>Paratrygon aiereba</i>			
<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)			
<i>Potamotrygon orbignyi</i>			
<i>Potamotrygon scobina</i>			

<i>Plesiotrygon iwamae</i>		Pará	
<i>Potamotrygon orbignyi</i>			
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Biologia reprodutiva	Rio Paraná, Tocantins	RINCON (2006)
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Apenas relatos sobre o período do parto	Rio Paraná, Guairá, Paraná	GARRONE NETO et al. (2006)
<i>Potamotrygon motoro</i>		Rio Paraná,	
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Considerações sobre a reprodução	proximidades de Castilho-SP e Três Lagoas-MS	GARRONE NETO (2010)
<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)	Estrutura testicular e espermatogênese	Rio Negro, Amazonas	ZAIDEN et al. (2010)
<i>Paratrygon aiereba</i>	Biologia reprodutiva	Rio Negro, Amazonas	ARAÚJO (2011)

Os trabalhos descritos sobre a biologia reprodutiva dos integrantes da família Potamotrygonidae são unânimes em afirmar que as arraias de água doce possuem algumas características comuns a outros elasmobrânquios, como crescimento lento e grande longevidade, padrões complexos de reprodução e maturação tardia, aspectos que determinam baixas taxas de renovação populacional e, conseqüentemente, maior vulnerabilidade aos impactos oriundos da exploração pesqueira a médio e longo prazo (ARAÚJO et al., 2004; CARRIER et al., 2004).

3.6. Aspectos parasitológicos

Entre as informações biológicas de potamotrigonídeos, a parasitologia tem sido a área com maior conhecimento disponível. As informações sobre infecções parasitárias estão concentradas principalmente na descrição taxonômicas de espécies (BROOKS; THORSON, 1976; REGO; DIAS, 1976; MAYES et al., 1978; BROOKS; AMATO, 1992; MORAVEC, 1998; CAMPBELL et al., 1999; MARQUES et al., 2003; MARQUES; BROOKS, 2003; IVANOV, 2004, 2005; CAIRA; HEALY, 2004;

DOMINGUES et al., 2007; DOMINGUES; MARQUES, 2007; REYDA, 2008; LUCHETTI et al., 2008; MENORET; IVANOV, 2009; DOMINGUES; MARQUES, 2010a, b), porém, existem trabalhos que retratam a evolução e filogenia (BROOKS et al., 1981; BROOKS, 1992), ocorrência (PERALTA et al., 1998; LACERDA et al., 2008), ecologia parasitária (LACERDA et al., 2009), alterações ocasionadas pelo ciclo hidrológico (LEMOS, 2011), bem como sobre as etapas de transporte e manejo desses elasmobrânquios para o mercado consumidor como objeto de aquariorfilia (LEMOS, 2011).

Alvarenga et al. (2009) observou ausência de metazoários em brânquias de *Potamotrygon falkneri* e Brito (2012) também observou ausência de parasitos nas brânquias, baço, fígado, rins e coração em *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon falkneri*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*, fato nada comum em arraiais de água doce visto que observa-se grande quantidade de parasitas nesses elasmobrânquios. Entre os inúmeros parasitas descritos em arraiais de água doce, os cestodas e monogenoides são os mais recorrentes, a tabela 4 apresenta as espécies de parasitas descritas em arraiais da família Potamotrygonidae.

Além das informações sobre as espécies descritas de parasitos em potamotrigonídeos, Lacerda et al. (2009) realizou trabalhos sobre o fator de condição (Kn) e suas correlações com os parasitos, em seus resultados foi demonstrado correlação positiva entre o Kn com a abundância de dois tipos de cestodas (*A. regoi* e *R. paratrygoni*). Queiroz (2011) relatou nas brânquias de *Potamotrygon cf. histrix* infecção por *Potamotrygonocotyle eurypotamoxenus*, *Argulus* sp. e *Ergasilus* sp. Recentemente Lemos (2011) estudando correlações parasitológicas e hematológicas em *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) concluiu que esta espécie possui flexibilidade de enfrentar as variações ambientais que ocorrem em seu habitat, incluindo a adoção de ajustes fisiológicos em função da abundância de parasitos ao longo do ciclo hidrológico. A presença de hemoparasita *Haemogregarina* sp. foi observado nos eritrócitos de *Potamotrygon cf. histrix* (OLIVEIRA, 2008), *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina* (BRITO, 2012). Apesar do aumento expressivo de informações biológicas que

incluem a parasitologia, os estudos ainda são reduzidos quando comparados aos peixes teleósteos.

Tabela 4. Espécies descritas parasitando arraias Potamotrygonidae (LEMOS, 2011).

Espécies de parasitos	Hospedeiros
Cestoda	
<i>Acanthobothrium amazonensis</i>	<i>Potamotrygon circularis</i>
<i>A. peruvienne</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
<i>A. quinonesi</i>	<i>Potamotrygon magdalenae</i>
<i>A. ramiroi</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
<i>A. regoi</i>	<i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Potamotrygon falkneri</i>
<i>Anindobothrium lisae</i>	<i>Potamotrygon orbignyi</i>
<i>Nandocestus guariticus</i>	<i>Paratrygon aiereba</i>
<i>Paraoncomegas araya</i>	<i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Potamotrygon falkneri</i>
<i>Potamotrygonocestus amazonensis</i>	<i>Potamotrygon constellata</i> , <i>Potamotrygon yepezi</i> , <i>Potamotrygon falkneri</i> , <i>Potamotrygon motoro</i> , <i>Potamotrygon</i> cf. <i>histris</i> , <i>Potamotrygon scobina</i> , <i>Potamotrygon orbignyi</i> e <i>Potamotrygon circularis</i>
<i>P. chaoi</i> Marques	<i>Plesiotrygon iwamae</i>
<i>P. fitzgeraldae</i>	<i>Potamotrygon leopoldi</i> , <i>Potamotrygon motoro</i> , <i>Potamotrygon orbignyi</i> e <i>Paratrygon aiereba</i>
<i>P. magdalenensis</i>	<i>Potamotrygon magdalenae</i>

P. marajoara
P. maura
P. orinocoensis
P. travassosi

Plesiotrygon iwamae
Potamotrygon orbignyi
Potamotrygon orbignyi
Potamotrygon constellata, *Potamotrygon*
motoro, *Potamotrygon orbignyi* e
Paratrygon aiereba

Rhinebothrium copianulum
R. paranaensis
R. paratrygoni

Paratrygon aiereba
Potamotrygon falkneri
Potamotrygon falkneri, *Potamotrygon*
motoro e *Paratrygon aiereba*

Rhinebothroides campbelli
R. circularisi

Potamotrygon motoro
Potamotrygon constellata

R. freitasi

Potamotrygon orbignyi, *Potamotrygon*
constellata, *Potamotrygon motoro*,
Potamotrygon yepezi, *Potamotrygon*
falkneri, *Potamotrygon henlei*,
Potamotrygon leopoldi, *Potamotrygon*
schroederi e *Potamotrygon scobina*

R. glandularis

Potamotrygon orbignyi e *Potamotrygon*
histris

R. mclennanae

Potamotrygon motoro

R. moralarai

Potamotrygon cf. *histris* e *Potamotrygon*
magdalenae

R. scorzai

Potamotrygon motoro, *Potamotrygon*
orbignyi e *Paratrygon aiereba*

R. venezuelensis

Potamotrygon orbignyi e *Potamotrygon*
yepezi

Acanthocephala

Quadrigyrus machadoi Fabio, 1983

Potamotrygon falkneri e *Potamotrygon motoro*

Megapriapus ungriai Garcia-Rodrigo, 1960

Potamotrygon histrix

Nematoda

Brvimulticaecum regoi

Potamotrygon castexi e *Potamotrygon motoro*

Camallanus cotti

Potamotrygon motoro

Cucullanus sp.

Potamotrygon motoro, *Potamotrygon castexi* e *Paratrygon aiereba*

Echinocephalus daileyi

Potamotrygon circularis, *Potamotrygon histrix* e *Potamotrygon castexi*

Eustrongylides ignotus

Paratrygon sp.

Procamallanu peraccuratus

Potamotrygon motoro

P. inopinatus

Potamotrygon motoro

Rhabdochona sp.

Potamotrygon castexi e *Paratrygon aiereba*

Spinitectus sp.

Potamotrygon falkneri

Monogenoidea

Paraheteronchocotyle amazonense

Potamotrygon constellata e

Potamotrygon orbignyi

Potamotrygonocotyle aramasae

Paratrygon aiereba

P. auriculocotyle

Potamotrygon motoro

P. chisholmae

Potamotrygon motoro

P. dromedarius

Potamotrygon motoro

P. eurypotamoxenus

Potamotrygon motoro, *Potamotrygon castexi*, *Potamotrygon falkneri* e

	<i>Potamotrygon histrix</i>
<i>P. quadracotyle</i>	<i>Potamotrygon</i> cf. <i>histrix</i>
<i>P. rarum</i>	<i>Potamotrygon schroederi</i>
<i>P. rionegrense</i>	<i>Potamotrygon humerosa</i> , <i>Potamotrygon</i> sp., <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Potamotrygon</i> cf. <i>motoro</i>
<i>P. septemcotyle</i>	<i>Potamotrygon</i> sp. e <i>Potamotrygon scobina</i>
<i>P. tatiana</i>	<i>Paratrygon</i> sp.
<i>P. tocantinsense</i>	<i>Potamotrygon</i> cf. <i>scobina</i> , <i>Potamotrygon scobina</i> e <i>Potamotrygon</i> sp.
<i>P. umbella</i>	<i>Potamotrygon</i> cf. <i>histrix</i>
<i>P. uruguayensis</i>	<i>Potamotrygon brachyura</i>
Branchiura	
<i>Argulus juparanaensis</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
Copepoda	
<i>Ergasilus trygonophilus</i>	<i>Plesiotrygon iwamae</i>

3.7. Fisiologia e adaptação

Devido aos poucos estudos sobre a biologia das arraias de água doce, o conhecimento de sua fisiologia é muito reduzido, e até inexistentes para a maioria das espécies. Algumas das características fisiológicas do grupo incluem modificações nas ampolas de Lorenzini para o funcionamento em água doce (RASCHI; MACKANOS, 1989). Ao contrário do que muito se imaginou as arraias de água doce possuem uma glândula retal, entretanto, ela é fortemente atrofiada o que se constituiu em um

indicativo de uma longa história evolutiva de adaptação a vida em água doce (THORSON et al., 1978). A atrofia da glândula retal determina a inabilidade dos potamotrigonídeos em viver em ambiente marinho e bem como determina que esses elasmobrânquios tenham baixas concentrações de uréia no sangue e não acumulem uréia em seus tecidos (THORSON, 1967).

Baseado nessa característica alguns trabalhos foram realizados visando verificar até que ponto os potamotrigonídeos podiam suportar ambiente salino. Griffith et al., (1973) descreveram o primeiro registro sobre estudos hematológicos e bioquímicos do plasma em potamotrigonídeos submetidos em águas salinas diluídas.

Estudos comparativos do fluxo de sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{++}) e a excreção de uréia entre duas espécies de arraias do gênero *Potamotrygon* (*P. aff. hystrix* e *P. thorsoni*) aclimatadas em água com elevadas concentrações de eletrólitos e carbono orgânico dissolvido, concluíram que os potamotrigonídeos possuem características de regulação iônica semelhante aos teleósteos de água doce e diferente de seus relativos marinhos (WOOD et al., 2002) essa mesma observação já havia sido feito por Thorson (1967) e Thorson (1970). Bitner; Lang (1980) descreveram aspectos da osmorregulação da arraia *Potamotrygon hystrix* e concluíram que o Na^+ e Cl^- são os principais íons de osmorregulação no soro de *Potamotrygon hystrix*, bem como foi observado aumento nos valores de hematócrito (Ht) quando arraias foram submetidas a águas com salinidades elevadas.

Experimentos realizados submetendo arraias de água doce em água contendo amônia permitiram concluir que a uréia tem a função de osmorregulação e desintoxicação da amônia nesses elasmobrânquios (IP et al., 2003). Em *Paratrygon aiereba* foi confirmado que essa espécie possui uma marcante habilidade de ajustar as características iônicas a seus locais de ocorrência natural (DUNCAN et al., 2009). Recentemente Duncan et al. (2010b) concluíram que o 4º arco branquial é o principal arco na manutenção do equilíbrio osmorregulatório dos potamotrigonídeos. Estudos de adaptações puderam confirmar que as características físicas e químicas das águas da bacia Amazônica podem agir como barreiras ou filtros hidrológicos para a dispersão das

espécies de arraias de água doce (DUNCAN; FERNANDES, 2010), bem como a combinação das principais características branquiais em potamotrigonídeos tornaram-se favoráveis para habitarem a água doce durante a evolução e diversificação desses elasmobrânquios ao longo da bacia Amazônica (DUNCAN et al., 2010b).

Brinn et al. (2012) avaliaram parâmetros sanguíneos de *Potamotrygon* cf. *histris* após transporte (basal, pré-transporte e após 3, 12 e 24h) usando dois aditivos de água (tetraciclina e probióticos). Houve um aumento significativo nos níveis de corticosterona gradual em arraias ao longo do tempo de transporte em combinação com distúrbios osmorregulatórios, sugerindo a ocorrência de estresse relacionado devido a alterações deste corticosteróide. Também houve aumentos significativos na condutividade da água, além de perdas de Na^+ , K^+ e excreção de amônia. A glicose, hematócrito, contagem de eritrócitos e ureia no sangue alteraram significativamente durante o experimento. Os níveis de glicose não aumentaram de forma significativa durante o transporte.

Assim como outras espécies do grupo, os potamotrigonídeos não possuem órgãos respiratórios acessórios e retira o oxigênio da água através das brânquias. Contudo, quando em ambientes hipóxicos, esses animais nadam para a superfície e flutuam, dobrando as extremidades das nadadeiras laterais para explorar a camada mais oxigenada da coluna da água (BARCELLOS, 1997), uma estratégia adaptativa não observada entre os elasmobrânquios marinhos.

As descrições das informações fisiológicas não estão concentradas apenas em trabalhos sobre ajuste iônico e estratégias adaptativas. Assim como os demais elasmobrânquios os potamotrigonídeos dependem do órgão epigonal para realizarem a sua atividade linfó-mielopoiética, produzir respostas leucocitárias e participar de processos inflamatórios (ZAPATA et al., 1996; MIRACLE et al., 2001). Em relação às células do sangue de potamotrigonídeos, poucos trabalhos têm retratado os tipos e quantidades de leucócitos e trombócitos nesses elasmobrânquios (Tabela 5). Pode-se perceber que não existe uma unanimidade sobre os verdadeiros tipos de leucócitos existentes no sangue de arraias de água doce, parte dessa inconsistência deve-se aos

diferentes métodos de colorações empregados e da falta de um protocolo padrão e das técnicas de diferenciação dos tipos celulares existentes.

Tabela 5. Trombócitos e leucocitários do sangue de espécies de Potamotrygonidae.

Espécies	Tr	Li	Mo	NE	Eo	He	Ba	Referências
Não especificada	X	X	X	X	X			GRIFFITH et al. (1973)
<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)	X	X	X			X	X	OLIVEIRA (2008)
<i>Potamotrygon motoro</i>	X	X	X	X	X	X	X	PÁDUA et al. (2010)
<i>Potamotrygon motoro</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Potamotrygon falkneri</i>	X	X	X	X	X	X	X	BRITO (2012)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Potamotrygon scobina</i>	X	X	X	X	X	X	X	

Tr = trombócito; Li = linfócito; Mo = monócito; Ne = neutrófilo; Eo = eosinófilo; He = heterófilo; Ba = basófilo.

Oliveira (2008) identificando e caracterizando morfológicamente as células do sangue da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) concluiu que essa espécie possui as características morfológicas semelhantes a outros elasmobrânquios marinhos. Pádua et al., (2010) em um relato de caso de *Potamotrygon motoro* (n= 1) concluíram por meio de algumas reações citoquímicas que os neutrófilos e heterófilos constituem a primeira linha de defesa orgânica visto que marcaram positivamente as reações de glicogênio e de proteínas totais.

Em um estudo que analisou o eritrograma de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), Oliveira (2008) concluiu que tais valores são inferiores aos observados em arraias marinhas, comprovando o modo de vida mais sedentário desta espécie, por outro lado o perfil bioquímico plasmático desta assemelha-se mais a dos teleósteos de água doce do que o de seus relativos marinhos, essas mesmas observações também foram observadas por Jezini (2011) quando estudaram *Potamotrygon motoro*. Brito (2012) investigando o perfil hematológico e sérico bioquímico de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* do Rio Paraná-Paraguai, Paraná, bem como *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina* do Rio Pírim, Amapá, observaram que a maioria dos

parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dessas arraiais foram próximos para ambos os rios, demonstrando pouca interferência do ambiente na fisiologia desses animais apesar da diversidade geográfica de origem.

Em relação aos hormônios foi demonstrado que os corticosteróides podem ser utilizados com um indicador de estresse na arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), além do mais foi demonstrado não existir uma relação direta com a hiperglicemia, como normalmente observado em teleósteos (RICHARD et al., 2011). Lemos (2011) concluiu que *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) apresenta baixa mortalidade durante e após o transporte, bem como reforça a manutenção desses animais nos exportadores em água de boa qualidade, fluxo contínuo e com o mínimo de manuseio, esses fatores são necessários para a recuperação do estresse imposto pelo estresse durante o transporte. Oliveira et al. (2012) descreveram recomendações para colheita de sangue em arraiais potamotrigonídeos. Contudo, estudos sobre das propriedades fisiológicas dos potamotrigonídeos são reduzidas, apesar da extrema valia dessas propriedades para determinar o estado de saúde dos animais, além de auxiliar nas estratégias de manejo e conservação dessas espécies de elasmobrânquios.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos houve um avanço significativo no conhecimento sobre as arraiais de água doce, entretanto, ainda existe uma diversidade por ser descoberta e descrita na família Potamotrygonidae. A exploração sobre as arraiais de água doce é mais lucrativa quando estas são usadas como animais de aquariofilia, o sistema de cotas brasileiro é um mecanismo viável para a manutenção de populações de potamotrigonídeos em ambientes naturais, entretanto, deve ocorrer o aumento da fiscalização para reduzir ou eliminar a comercialização ilegal. Existe uma grande aversão as arraiais de água doce de uma maneira geral, as pessoas não sabem de sua importância e de como elas podem ser utilizadas para obtenção de renda. Medidas que visem o esclarecimento sobre os potamotrigonídeos devem ser empregadas nas cidades que são banhadas por bacias onde existe esse recurso. Ampla variação citogenética foi observada nos potamotrigonídeos, além do mais foi detectado o sistema

XX/XY nesse grupo de elasmobrânquios. Os potamotrigonídeos exploram diversos habitats em sistema natural, vem sendo observado em outro sistema diferente dos locais de origem natural invasão por esses organismos. Entre os aspectos biológicos estudados até o presente momento os aspectos alimentares e a parasitologia são os onde existem maior informações. Os aspectos alimentares e a parasitologia variam de acordo com a espécie ou ainda de acordo com a bacia de ocorrência. Notoriamente os aspectos da biologia reprodutiva são complexos e existe uma semelhança aos mamíferos do que a peixes teleósteos. Os aspectos fisiológicos são ainda pouco elucidados, existindo investigações principalmente nos ajustes regulatórios, bem como na caracterização e identificação de células sanguíneas. As informações disponíveis até o momento na literatura são essenciais para esse grupo de elasmobrânquios que ocorrem naturalmente apenas na América do sul, servindo para futuras práticas em trabalhos de pesca, aquicultura, ecologia, genética, evolução, manejo e principalmente para a conservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHENBACH, G.M.; ACHENBACH, S.V.M. Notas acerca de algunas especies de raya fluvial (Batoidei, Potamotrygonidae) que frecuentan el sistema hidrografico del Paraná médio en el departamento La Capital (Santa Fe – Argentina). Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino, v. 8, p. 1-34, 1976.
- ALMEIDA, M.P.; BARTHEM, R.B.; VIANA, A.S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4 n. 1, p. 1-11, 2009.
- ALMEIDA, M.P.; LINS, P.M.O.; CHARVET-ALMEIDA, P.; BARTHEM, R.B. Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). Brazilian Journal Biology, v. 70, n. 1, p. 155-162, 2010.
- ALVARENGA, F.M.S.; LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Absence of metazoan gill parasites on *Potamotrygon falkneri* (Potamotrygonidae) and its ecological implications in the upper Paraná River floodplain, Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4, n. 4, p. 589-592, 2009.
- ANTONIAZZI, M.M.; BENVENUTI, L.A.; LIRA, M.S.; JARED, S.G.S.; GARRONE NETO, D.; JARED, C.; BARBARO, K.C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stinger of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. Toxicon, v. 57, p. 297-303, 2011.

- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. 1998. 171 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA, Manaus. 1998.
- ARAÚJO, M. L. G. Plano de Monitoramento de arraias de água Doce. 1999. 31 p. Convênio IBMA-AM/ACEPOAM. 1999.
- ARAÚJO, M.L.G. Resultados do Monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no Rio Tapajós. 2004. 39 p. Relatório Técnico Nº 01. 2004.
- ARAÚJO, M.L.G. Dinâmica de população e conservação de *Paratrygon aiereba* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas 2011. 106 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus. 2011.
- ARAÚJO, M.L.G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20, info 08, p. 1-6, 2004.
- ARAÚJO, M.L.G.; DUNCAN, W.L.P.; MELO, S.V. Plano de monitoramento de arraias de água doce. 2005. 78 p. Relatório Final. 2005.
- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, uréia e conteúdo de oxigênio no sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). 1997. 67p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 1997.
- BATISTA, W.S. Caracterização tecnológica e perfil de ácidos graxos em arraias de água doce. Dissertação (Mestrado). 2008. 62 p. Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus. 2008.
- BITTNER, A.; LANG, S. Some aspects of the osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (*Potamotrygon hystrix*) - I. Serum osmolality, sodium and chloride content, water content, hematocrit and urea level. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, v. 67, p. 9-13, 1980.
- BRINN, R.P.; MARCON, J.L.; GOMES, D.M. ABREU, L.C.; BALDISSEROTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon* cf. *hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. Comparative Biochemistry and Physiology A, 162: 139-145, 2012.
- BRITO, F.M.M. Variáveis hematológicas, hormonais, bioquímicas, séricas e fauna parasitária em quatro espécies de raias do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) de vida livre. 2012. 55 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2012.
- BROOKS, D.R.; THORSON, T.B. Two tetraphyllidean cestodes from the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* Duméril, 1852 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Colombia. Journal of Parasitology, v. 62, p. 943-947, 1976.
- BROOKS, D.R.; MAYES, M.A.; THORSON, T.B. Systematic review of cestodes infecting freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) including four new species from Venezuela. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, v. 48, n. 1, p. 43-64, 1981.

- BROOKS, D.R. Origins, diversification, and historical structure of the helminth fauna inhabiting neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae). *Journal of Parasitology*, v. 78, n. 4, p. 588–595, 1992.
- BROOKS, D.R.; AMATO, J.F.R. Cestode parasites in *Potamotrygon motoro* (Natterer) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from southwestern Brazil, including *Rhinebothroides mclennanae* n. sp. (Tetraphyllidea: Phyllobothriidae), and a revised host-parasite checklist for helminths inhabiting neotropical freshwater stingrays. *Journal of Parasitology*, v. 78, p. 393–398, 1992.
- CAIRA, J.N.; HEALY, C.J. Elasmobranchs as hosts of metazoan parasites. In: CARRIER, J.C.; MUSICK, J.A.; HEITHAUS, M.R. (Ed.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. 2004, p. 523-551.
- CAMPBELL, R.A.; MARQUES, F. ; IVANOV, V. A. *Paroncomegas araya* (Woodland, 1934) n. gen. et comb. (Cestoda: Trypanorhyncha: Eutetrarhynchidae) from the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* in South America. *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 2, p. 313–320, 1999.
- CARRIER, J.; MUSICK, J.A.; HEITHAUS, M.R. *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, 2004.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2776, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (orgs.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América*. Porto Alegre, Edipucrs, 2003, p. 22-28.
- CARVALHO, M.R.; RAGNO, M.P. Na Unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. Nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis avulsos de Zoologia*, v. 51, n. 7, p. 101-138, 2011.
- CARVALHO, M.R.; PEREZ, M.H.S.; LOVEJOY, N.R. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandes-Yépez, 1958(Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2827, p. 1-30, 2011.
- CASTEX, M.N. Uma nueva espécie de raya fluvial: *P. labradori*. *Neotropica*, v. 9, n. 30, p. 117-121, 1963.
- CASTEX, M.N. Estado actual de los estúdios sobre la raya fluvial neotropical. *Ver. Mus. Prov. Cs. Nat. Santa Fé. Número extraordinário del cincuentenario*, p. 9-34, 1964.
- CASTEX, M.N. Bases para el estudio de las rayas de água dulce del sistema Amazônico. Nuevas sinonímias de "*Potamotrygon motoro*" (M. H., 1841). *Atlas do Simpósio sobre a biota Amazônica*, v. 3, p. 89-92, 1967.
- CHAO, N.L., PETRY, P., PRANG, G., SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba*. EDUA, Manaus, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P. Ocorrência, biologia e uso das raias de água doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae*

- (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). 2001. 213 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Pará/ UFPA, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P. Resultados do monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no rio Xingu. 2004. 45 p. Relatório Técnico, 2004.
- CHARVET-ALMEIDA, P. História natural e conservação das raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no médio rio Xingu, área de influência do projeto hidrelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil). 2006. 376 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba/ UFPB, 2006.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R.S.; ALMEIDA, M.P. *Paratrygon aiereba*: A multi-species complex (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists*. Tampa, Flórida, 2005a.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. *J. Northw Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165-171, 2005b.
- CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). 2006. Twenty-second meeting of the Animals Committee, Lima (Peru), 7–13 July 2006, AC22 Doc. 17.4, Conservation and management of sharks: species affected by trade. Disponível em <http://www.cites.org/eng/com/ac/22/E22-17-4.pdf> (Acessado em 18/02/2013).
- CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). 2009. Twenty-fourth meeting of the Animals Committee, Geneva (Switzerland), 20-24 April 2009, AC24 Doc. 14.2, Conservation and management of sharks and stingrays: regional workshop on South American freshwater stingrays. Disponível em <http://www.cites.org/common/com/AC/24/EFS24-14-02.pdf> (Acessado em 18/02/2013).b
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: OETINGER, M.I. & ZORZI, G.D. (eds.). *The Biology of freshwater elasmobranchs*. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 1995, p. 7: 62-90.
- CRUZ, V.P. Estudos citogenéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na bacia superior do rio Paraná. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/ UNESP, Botucatu, São Paulo, 2009.
- CRUZ, V.P.; SHIMABUKURO-DIAS, C.K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ in *Potamotrygon* aff. *motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 9, n. 1, p. 201-208, 2011.
- DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espece de raias d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *CR Biologie*, v. 329, p. 483–493, 2006.
- DOMINGUES, M.V. ; MAQUES, F.P.L. Revision of *Potamotrygonocotyle* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Platyhelminthes: Monogenoidea: Monocotylidae), with descriptions of four new species from the gills of freshwater stingrays

- Potamotrygon* spp. (Rajiformes: Potamotrygonidae) from the La Plata river basin. Systematic Parasitology, v. 67, n. 3, p. 157–174, 2007.
- DOMINGUES, M.V.; PANCERA, N.C.M.; MARQUES, F.P.L. Monogenoideans parasites of freshwater stingrays (Rajiformes, Potamotrygonidae) from the Negro River, Amazon, Brazil: species of *Potamotrygonocotyle* (Monocotylidae) and Paraheteronchocotyle (Hexabothriidae). Folia Parasitologica, v. 54, p. 177-190, 2007.
- DOMINGUES, M.V.; MARQUES, F.P.L. Phylogeny and taxonomy of *Potamotrygonocotyle* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Monogenoidea: Monocotylidae) with a description of four new species. Journal of Helminthology, v. 1, p. 1-28, 2010a.
- DOMINGUES, M.V.; MARQUES, F.P.L. *Ergasilus trygonophilus* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) from state of Pará, Brazil. Sociedade Brasileira de Zoologia, v. 27, n. 5, p. 829–833, 2010b.
- DUNCAN, W.L.P. Habitat, morfologia branquial e osmorregulação das arraias de água doce da bacia Amazônica (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). 2008. 173 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar, São Paulo, 2008.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; ARAÚJO, M.L.G.; FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. Journal of Fish Biology, v. 74, p. 956-960, 2009.
- DUNCAN, W.P.; INOMATA, S.O.; FERNANDES, M.N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010a.
- DUNCAN, W.P. COSTA, O.T.F.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Functional morphology of the Gill in Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): implications for adaptation to freshwater. Physiological and Biochemistry Zoology, 83(1): 19-32, 2010b.
- DUNCAN, W.P.; FERNANDES, M.N. Physicochemical characterization of the White, Black, and clearwater Rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 5(3): 454-464, 2010.
- FREDERICO, R.G. Filogeografia e Conservação de *Paratrygon aiereba* Dumeril (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica. 2006. 67 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus. 2006.
- FORSTER, O.C. Impacto das arraias (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na população ribeirinha e demais frequentadores do Alto curso do rio Paraná e alguns afluentes. 2009. 86 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP, Botucatu, São Paulo, 2009.
- GARRONE NETO, D. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de raias (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do Alto Rio Paraná, sudeste do Brasil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 5, n. 1, p. 101-111, 2010.

- GARRONE NETO, D.; CARVALHO, L.C.N. Nuclear-follower foraging associations among Characiformes fishes and Potamotrygonidae rays in clean waters environments of Teles Pires and Xingu rivers basins, Midwest Brazil. *Biota Neotropica*, v. 11, n. 4, p. 359-362, 2012.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Acidentes Por Raias. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD JR., V. (Eds.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Second ed. Sarvier, São Paulo, 2009, p. 295–305.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Arraias em rios da região sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 82-88, 2010.
- GARRONE NETO, D.; SAZIMA, I. The more stirring the better: cichlid fishes associate with foraging potamotrygonid rays. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, n. 3, p. 499-501, 2009.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., 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, 2006.
- GARRONE NETO, D.; UIEDA, V.S. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 81-88, 2012.
- GRIFFITH, R.W., PANG, P.K.T., SRIVASTAVA, A.K.; PICKFORD, G.E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and diluted sea water. *Biology Bulletin*, v. 144, p. 304-320, 1973.
- HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Digestive system. In: HAMLETT, W.C. *Sharks, skater and rays: the biology of elasmobranch fishes*. John Hopkins University Press, Baltimore, 1999, p. 144-173.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1998. Portaria Federal Nº. 022/1998.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. Instrução Normativa Nº. 027/2005.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. Instrução Normativa Nº. 118/2006.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Instrução Normativa Nº. 204/2008.
- ISHIHARA, M.; TANIUCHI, T. A strange potamotrygonid Ray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Orinoco River System. In: OETINGER, M.I.; ZORZI, G.D. (eds.). *Biology of freshwater elasmobranchs*. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 1995, v. 7, p. 62-90.
- IP, Y.K., TAM, W.L., WONG, W.P., LOONG, A.M., HIONG, K.C., BALLANTYNES, J.S. & CHEW, S.F. A comparison of the effects of environmental ammonia exposure on the Asian freshwater stingray *Himantura signifer* and the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 3625-3633, 2003.

- IVANOV, V. A. A new species of *Rhinebothroides* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Cestoda: Tetrphyllidae) from the ocellate river stingray in Argentina, with amended descriptions of two other species of the genus. *Syst. Parasitol.*, Dordrecht, v. 58, p. 159-174, 2004.
- IVANOV, V.A. A new species of *Acanthobothrium* (Cestoda: Tetrphyllidea: Onchobothriidae) from the ocellate river stingray, *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), in Argentina. *The Journal of Parasitology*, v. 91, n. 2, p. 390-396, 2005.
- JEZINI, A.L. Eritrograma e bioquímica plasmática da arraia *Potamotrygon motoro* (Natterer in Müller and Henle, 1841) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas. 2011. 41 p. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, 2011.
- LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Digenea, Nematoda, Cestoda and Acanthocephala, parasites in Potamotrygonidae (Chondrichthyes) from the upper Paraná River floodplain, states of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List*, v. 4, n. 2, p. 115-122, 2008.
- LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Ecology of endoparasites of the fluvial stingray *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazil. Journal Biology*, v. 69, p. 2, p. 297-303, 2009.
- LASSO, C. A.; RIAL, A.B.; LASSO-ALCALÁ, O. Notes on the biology of the freshwater stingrays *Paratrygon aiereba* (Müller and Henle, 1841) and *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*. v. 2, n. 3, p. 39–52, 1996.
- LEMOS, J.R.G. Índices parasitários e parâmetros fisiológicos de arraias cururu (*Potamotrygon* cf. *histris*) exportadas como peixes ornamentais: ferramentas para avaliação do estado de saúde da espécie. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2011.
- LONARDONI, A.P.; GOULART, E.; OLIVEIRA, E.F.; ABELHA, M.C.F. Hábitos alimentares e sobreposição trófica das raias *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 3, n. 28, p. 195-202, 2006.
- LOVEJOY, N.R., BERMINGHAM, E.; MARTIN, A.P. Marine incursion into South America. *Nature*, v. 396, p. 421-422, 1998.
- LUCHETTI, N.M.; MARQUES, F.P.L.; CHARVET-ALMEIDA, P. A new species of *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Tetrphyllidea) from *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello & Thorson (Myliobatoidea: Potamotrygonidae) and a redescription of *Potamotrygonocestus chaoi* Marques, Brooks & Araujo, 2003. *Systematic Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 131-145, 2008.
- MARQUES, F.P.L. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. 2000. 325 p. Tese PhD, University of Toronto, 2000.
- MARQUES, F.P.L.; BROOKS, D.R.; ARAÚJO, M.L.G. Systematics and phylogeny of *Potamotrygonocestus* (Platyhelminthes, Tetrphyllidea, Onchobothriidae) with

- descriptions of three new species from freshwater potamotrygonids (Myliobatoidea, Potamotrygonidae). *Zoologica Scripta*, v. 32, p. 367–396, 2003.
- MARQUES, F.P.L.; BROOKS, D.R. Taxonomic review of *Rhinebothroides* (Eucestoda: Tetraphyllidea: Phyllobothriidae), parasites of freshwater stingrays (Rajiformes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae). *The Journal of Parasitology*, v. 89, p. 944–1017, 2003.
- MAYES, M.A.; BROOKS, D.R.; THORSON, T.B. Two new species of *Acanthobothrium* van Beneden 1849 (Cestoidea: Tetraphyllidea) from freshwater stingrays in South America. *The Journal of Parasitology*, v. 64, p. 838–841, 1978.
- MENORET, A.; IVANOV, V.A. A new species of tetraphyllidean (Cestoda) from the Largespot River stingray, *Potamotrygon falkneri* (Potamotrygonidae: Chondrichthyes), from the Paraná basin. *J. Parasitol.*, v. 95, n. 4, p. 994–999, 2009.
- MIRACLE, A.L.; ANDERSON, M.K.; LITMAN, R.T.; WALSH, C.J.; LUER, C.R.A.; ROTHENBERG, E.V.; LITMAN, G.W. Complex expression patterns of lymphocyte-specific gene during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *International Immunology*, v. 13, n. 4, p. 567-580, 2001.
- MORAVEC, F. Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region. Praga: Academia, p. 210-212, 1998.
- MOREAU, M.A.; COOMES, O.T. Aquarium fish exploitation in western Amazonia: conservation issues in Peru. *Env Conserv.*, v. 34, p. 12–22, 2007.
- MORO, G.; CHARVET, P.; ROSA, R.S. Aspectos da alimentação da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da bacia do rio Parnaíba, Nordeste do Brasil. *Revista Nordestina de Biologia*, v. 20, n. 2, p 47-57, 2011.
- MORO, G.; CHARVET, P.; ROSA, R.S. Insectivory in *Potamotrygon signata* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), an endemic freshwater stingray from the Parnaíba River basin, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 4, p. 885-891, 2012.
- NG, H.H.; TAN, H.H.; YEO, D.C.J.; NG, P.K.L. Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore. *Biol Invasions*, v. 12, p. 2385-2388, 2010.
- ODDONE, M.C.; VELASCO, G.; CHARVET, P. Record of the freshwater stingrays *Potamotrygon brachyuran* and *P. motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) in the lower Uruguay River, South America. *Acta Amazonica*, v. 42(2): 299-304, 2012.
- OLIVEIRA, A.T. Caracterização hematológica de *Potamotrygon* cf. *histrrix*: subsídios ao manejo e conservação da espécie. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2008.
- OLIVEIRA, A.T.; LEMOS, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C.; ARAÚJO, M.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias. Embrapa Amapá, Macapá, 2012, 19p.
- PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M. Características morfológicas, morfométricas e citoquímicas das células sanguíneas da arraia

- ocelata *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii, Potamotrygonidae): estudo de caso. *Ensaio e Ciência*, v. 14, n. 1, p. 147-158, 2010.
- PANTANO-NETO, J. Estudo preliminar da anatomia descritiva e funcional associada à alimentação em raias de água-doce (Potamotrygonidae, Myliobatiformes, Elasmobranchii). 2001. 92 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2001.
- PEDROSO, C.M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M.P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M.S.; HADDAD JR. V.; BARBARO, K.C.; ANTONIAZZI, M.M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, v. 50, p. 688–697, 2007.
- PERALTA, L.; SOLANO, A.; CARVALHO, J.R.; MATOS, E.; SERRA-FREIRE, N.M. Ocorrência de *Argulus juparanaensis* Lemos de Castro, 1950 (Branchiura, Argulidae) em arraia de fogo *Potamotrygon motoro* (Müller & Henlz, 1841) (Rajiformes: Potamotrygonidae) no Igarapé do Slito. *Entomología y Vectores*, v. 5, n. 1, p. 49-54, 1998.
- QUEIROZ, V.K.D. Caracterização e quantificação de ectoparasitas da arraia (*Potamotrygon* cf. *histris*) da comunidade Daraquá, Barcelos, AM. 2010. 46 p. Monografia em Licenciatura em Ciências Biológicas, Centro Universitário Nilton Lins, 2010.
- RASCHI, W.; MACKANOS, L.A. The structure of the Ampullae of Lorenzini in *Dasyatis garouaensis* and its implications on the evolution of the freshwater electroreceptive system. *Journal of Experimental Zoology*, v. 2, p. 101 -111, 1989.
- REGO, A.A.; DIAS, P.L. Estudos de cestóides de peixes do Brasil. 3ª nota: cestóides de raias fluviais Paratrygonidae. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 36, n. 4, p. 941–956, 1976.
- REYDA, F.B. Intestinal helminths of freshwater stingrays in southeastern Peru, and a new genus and two new species of cestode. *Journal of Parasitology*, v. 94, p. 684–699, 2008.
- RINCON, G. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paranã-Tocantins. Tese (Doutorado). 2006. 132 p. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/ UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2006.
- RINCON, G.; CHARVET-ALMEIDA, P. O monitoramento da pesca ornamental de raias de água doce está sendo efetivo? Problemas e possíveis soluções nas esferas envolvidas. *Elasmovisor*, v. 9, p. 4- 6, 2006.
- ROSA, R.S. A systematic revision of the South American stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). 1985. 523 p. PhD Thesis. School of Marine Sciences. College of William and Mary, Virginia. University Microfilms International, Ann Arbor, Michigan, 1985.
- ROSA, R.S.; CASTELLO, H.P.; THORSON, T.B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, v. 2, p. 447-458, 1987.
- ROSA, R. S.; DE CARVALHO, M. R.; WANDERLEY, C. A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of

- neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 1–8, 2008.
- ROSA, R.S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C.C.D. Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays. In: CARRIER, J.F.; MUSICK, J.A. & HEITHAUS, M.R. *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, 2010, p. 241-286.
- SHIBUYA, A. Morfologia funcional dos mecanismos de alimentação em raias Myliobatoidei, com ênfase em espécies de Potamotrygonidae do médio Rio Negro. 2009. 142 p. Tese (Doutorado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA, Manaus, 2009.
- SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 4, n. 4, p. 466- 465, 2009.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J. ARAÚJO, M.L.G.; TANAKA, S. Morphology of lateral line canals in Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Negro River, Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, n. 4, p. 867-876, 2010.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J. Catfishes as prey items of potamotrygonid stingrays in the Solimões and Negro rivers, Brazilian Amazon. *Biota Neotropica*, v. 13, n.1: <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n1/en/abstract?short-communication+bn03213012013>
- SHIBUYA, A.; ZUANO, J.; TANAKA, S. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 189-196, 2012.
- SILVA, A.G.C.; GOULART, E. Morfometria de raias continentais (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 29, n. 4, p. 413-419, 2007.
- SILVA, T.B.; UIEDA, V.S. Preliminary data on the feeding habits of the freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropica*, v. 7, n. 1, p. 221-226, 2007.
- TANIUCHI, T.; ISHIHARA, H. Anatomical comparison of clasper of freshwater stingrays (Dasyatidae and Potamotrygonidae). *Japan Journal of Ichthyology*, v. 37, n. 1, p. 10–16, 1990.
- TESHIMA, K.; TAKESHITA, K. Reproduction of the freshwater stingray, *Potamotrygon magdalenae* taken from the Magdalena River System in Colombia, South America. *Bulletin of Seikai National Fisheries Research Institute*, v. 70, p. 11–27, 1992.
- THORSON, T.B., COWAN, C.M.; WATSON, D.E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, v. 158, p. 375 -377, 1967.
- THORSON, T.B. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. failure to concentrate urea when exposed to saline medium. *Life Science*, v. 9, n. 11, p. 893-900, 1970.
- THORSON, T.B., WOOTON, R.M.; GEORGI, T.A. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biology Bulletin*, v. 154, p. 508 -516, 1978.

- THORSON, T.B.; LANGHAMMER, J.K.; OETINGER, M.I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 9, n. 1, p. 3–24, 1983.
- TOFFOLI, D. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na bacia amazônica. 2006. 126 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 2006.
- VASCONCELOS, H.C.G.; OLIVEIRA, J.C.S. Alimentação de *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) na planície de inundação da APA do Rio Curiaú, Macapá-Amapá-Brasil. *Biota Amazônia*, v. 1, n. 2, p. 66-73, 2011.
- VALENTIM, F.C.A. Citotaxonomia de arraias de água doce (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) da bacia amazônica Central. 2012. 77 p. Tese (Doutorado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 2012.
- VALENTIM, F.C.A.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromosomes of three freshwater stingrays (Rakiformes Potamotrygonidae) from the Rio Negro basin, Amazon, Brazil. *Genetica*, v. 128, p. 33-39, 2006.
- VAZZOLER, A.E.A.M.; MENEZES, N.A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Brazilian Journal Biology*, v. 52, p. 627-640, 1992.
- WOOD, C.M., MATSUO, A.Y.O., GONZALEZ, R.J., WILSON, R.W., PATRICK, M.L.; VAL, A.L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 3039- 3054, 2002.
- ZAIDEN, S.F.; BRINN, R.P.; MARCON, J.L.; URBINATI, E.C. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon cf. histrix*. *Zygote*, p. 1-9, 2010.
- ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and tissues of the immune system of fish. *In: G. IWAMA; T. NAKANISHI (eds.). The fish immune system. Organism, pathogen, and environment. Academic Press, San Diego, California, 1996, p. 1-62.*

**Artigo publicado em dezembro de 2012 na Série Documentos (77) da Embrapa
Amapá, ISSN 1517-4859, 18 p.**

CAPÍTULO 2

Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias de água doce

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos², Marcio Quara
Carvalho Santos³, Maria Lucia Góes de Araújo⁴, Marcos Tavares-Dias⁵, Jaydione Luiz
Marcon⁶

1. Biólogo, Doutor em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
2. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM.
3. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Escola Estadual Sólon de Lucena, Manaus, AM.
4. Oceanógrafa, Doutora em Diversidade Biológica, Pesquisadora da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.
5. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Embrapa Amapá, Macapá, AP.
6. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM

1. INTRODUÇÃO

As arraias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae e estão inseridas no único grupo de elasmobrânquios adaptados à vida exclusiva em água doce (COMPAGNO; COOK, 1995). Esses animais possuem o corpo achatado dorso-ventralmente e cauda com até três ferrões retrosserrilhados, que contêm toxinas. Devido a essa característica, os potamotrigonídeos causam grande temor aos banhistas e pescadores, pois podem causar acidentes que provocam ferimentos graves e bastante dolorosos (GARRONE NETO; HADDAD-JUNIOR, 2009). Assim, durante a manipulação desses animais para colheita de sangue em estudos hematológicos, acidentes podem ocorrer na manipulação e captura realizadas sem instrumentos de pesca apropriados e sem os devidos cuidados (GARRONE-NETO; HADDAD-JUNIOR, 2010).

Em peixes teleósteos os procedimentos básicos para a colheita de sangue já estão bem estabelecidos (ISHIKAWA et al., 2010; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), entretanto, em tubarões a colheita de sangue é recomendada na região dorsal, procedimento conhecido como punção caudal (ARNOLD, 2005; RIJN; REINA, 2010; WALSH; LUER, 2004; WILHELM-FILHO et al., 1992). Para as arraias marinhas a via mais utilizada para colheita do sangue é a punção cardíaca (WALSH; LUER, 2004; WILHELM-FILHO et al., 1992) e essa mesma via é a recomendada para as arraias de água doce (DUNCAN et al., 2009).

Com a finalidade de minimizar acidentes durante procedimentos de manipulação de arraias de água doce e, principalmente, com a finalidade de reduzir o manuseio estressante em arraias para a colheita sanguínea adequada e determinação de parâmetros fisiológicos, evitando assim possíveis alterações nessas determinações (ISHIKAWA et al., 2010), o objetivo desse trabalho foi padronizar os procedimentos de manuseio e colheita sanguínea em arraias de água doce.

2. CAPTURA NA NATUREZA

Em ambiente natural, dependendo da finalidade, a captura de arraias é geralmente realizada com diferentes instrumentos de pesca, tais como: o puçá de mão (Figura 1), também conhecido como rapiché na Amazônia central; malhadeiras; espinhel; e arpão, também conhecido como zagaia. Entretanto, para a determinação dos parâmetros hematológicos em população natural de qualquer espécie de arraias de água doce, recomenda-se o uso do puçá de mão, pois esse instrumento não causa ferimentos nos animais e permite que eles sejam capturados rapidamente, minimizando o efeito do estresse de captura, indesejável para os estudos fisiológicos, principalmente para determinação de valores sanguíneos basais de qualquer espécie de arraia.



Figura 1. Captura de arraias com o uso de puçá de mão.

Na Amazônia, as arraias coletadas da natureza com puçá de mão são mantidas em recipientes de caixa plástica (tipo-caçapa) com capacidade de até 30 litros de água. Assim, nesses recipientes contendo 2-3 litros de água elas são mantidas e estocadas na densidade máxima de duas em cada recipiente, dependendo do seu tamanho.

3. CONTENÇÃO E MANUSEIO DE ARRAIAS

Os ferrões das arraias derivam de formas ancestrais que os utilizavam para afugentar predadores e não para a captura de presas, reforçando o conceito de que arraias não são agressivas, utilizando seus ferrões apenas quando pisadas inadvertidamente ou manuseadas sem o devido cuidado (GARRONE-NETO; HADDAD JUNIOR, 2009).

Diferentemente de peixes teleósteos e algumas espécies de tubarões e arraias marinhas, as arraias potamotrigonídeos dulciaquícolos possuem ferrões com toxinas em suas caudas que podem provocar úlceras que têm um período de cicatrização de até três meses (GARRONE-NETO; HADDAD-JUNIOR, 2009). Esses acidentes causam dor intensa no local da ferroadada, edema e extensão variável de sangramento (MAGALHÃES et al., 2006). Desta forma, em arraias de água doce, as práticas necessárias ao manuseio de colheita de sangue requerem procedimentos de segurança para evitar a ocorrência desses graves acidentes ao manipulador.

Em alguns casos o uso de anestésicos é indicado, entretanto, sabe-se que essas substâncias podem ocasionar alterações hematológicas como tem sido relatado para algumas espécies de peixes teleósteos (BOLASINA, 2006; INOUE et al., 2004; SUDAGARA et al., 2009; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Porém, para os potamotrigonídeos não existe qualquer estudo sobre os possíveis efeitos de anestésicos em parâmetros hematológicos. Em arraias dulciaquícolos, o anestésico MS-222 (0,5 g/L) tem efeito somente depois de cerca de 10-15 minutos, além de ser uma substância tóxica para os animais. Assim, quando há necessidade da utilização de anestésicos para contenção dos animais, recomenda-se o uso de eugenol (Tabela 1), por 3-4 minutos. Em períodos inferiores a três minutos, os animais ainda possuem reflexos e batimentos do espiráculo bem evidentes. Em períodos superiores a quatro minutos, os batimentos do espiráculo são muito baixos e dificultam a colheita de sangue, por punção branquial, em um curto período de tempo.

Tabela 1. Recomendações quanto ao uso de seringas, agulhas e concentração do anestésico eugenol de acordo com a massa corporal de arraias coletadas para colheita de sangue.

Peso (g)	Seringas	Agulhas	Eugenol (g/L)
1-50	1 MI	13 x 4 mm	0,2
51-10.000	3 MI	25 x 7 mm	0,2
Acima de 10.000	3 MI	1,20 x 40 mm	0,2

Como medida preventiva de acidentes, é recomendado o uso da pinça Foster para contenção mecânica dos animais, prendendo somente o ferrão como mostrado na Figura 2. Alguns raros indivíduos de *Potamotrygon motoro*, uma espécie muito ativa, mesmo sob letargia da anestesia, podem tentar desferir ferroadas no manipulador, mas isso pode ser bloqueado pelo próprio peso da pinça Foster, que pode ser usada em procedimentos de manuseio dessas arraias de qualquer tamanho. Porém, um procedimento que não deve ser realizado é a imobilização da cauda e do ferrão simultaneamente sem o uso de equipamentos adequados, pois podem ocorrer ferimentos causados pelo ferrão, bem como o rompimento da cauda e até mesmo a perda desse membro, o qual exerce importante função no equilíbrio natatório das arraias e das atividades dependentes da natação, tais como: a caça, a fuga e o acasalamento.



Figura 2. Contenção mecânica do ferrão de arraias com o uso da pinça Foster.

Para manusear as arraias, após a contenção do ferrão com pinça Foster, deve-se também utilizar luvas de couro resistentes, que permitam a mobilidade das mãos. Porém, como as arraias de água doce liberam muito muco na superfície do corpo, esse dificulta o manuseio desses animais, devido à redução da aderência entre as luvas e os animais. Assim, a utilização de um pano umedecido em água para cobrir o ferrão também auxilia bastante nos procedimentos de manuseio correto de arraias (Figura 3).



Figura 3. Utilização de pinça de forster, pano e luva de couro para manusear arraias com segurança para o animal e para o manipulador.

Após a contenção mecânica da arraia, essa deve ser mantida com a região ventral para cima e, em seguida, coloca-se um pano umedecido sobre as suas brânquias, para evitar a sua mobilidade e diminuir ao máximo o seu estresse causado pelo manuseio fora da água.

4. COLHEITA DO SANGUE

Nas arraias de água doce há três locais que podem ser usados para colheita sanguínea: punção do vaso caudal, punção cardíaca e punção do vaso branquial. Recomenda-se utilizar seringas descartáveis previamente umedecidas em anticoagulantes como o EDTA 10% ou heparina 5.000 UI (0,1 mL para cada 1 mL de sangue), sendo que o tamanho dessas seringas depende da massa corpórea dos animais coletados. Em arraias de água doce, para um maior sucesso na colheita de sangue, é necessário o uso de seringa e agulha com tamanho compatível à massa corporal dos animais coletados (Tabela 1).

A punção do vaso caudal (Figura 4A-B) tem procedimentos difíceis de executar, devido à natureza rígida do membro e pouca vascularização, o que reduz a quantidade de sangue circulante na localidade quando comparados aos outros locais de colheita do sangue. Além disso, esse é o local onde se localiza o ferrão desse grupo de elasmobrânquios dulciaquícolas, tornando assim esse procedimento de colheita sanguínea bastante perigoso para o manipulador.

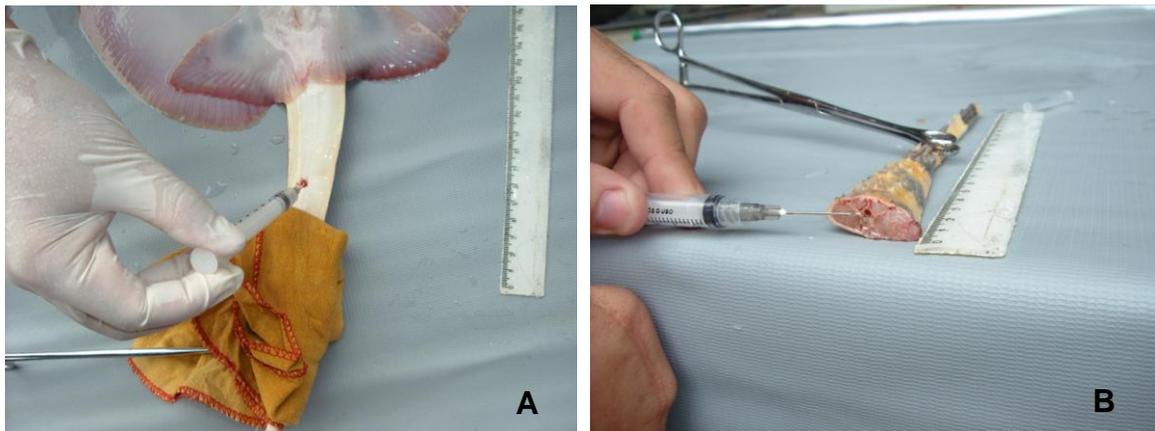


Figura 4. (A) Local de punção caudal em arraias de água doce. (B) Vaso caudal por onde circula o sangue.

Na colheita de sangue por punção cardíaca, a seringa deve estar inclinada em ângulo de aproximadamente 60° em relação ao corpo da arraia (Figura 5A-B).

Nesse método, a confiabilidade da amostragem está consignada ao enrijecimento perceptível após a perfuração do músculo do coração, órgão que se localiza entre a primeira e a segunda fenda branquial. Dentre os três locais de colheita sanguínea, a punção cardíaca é o procedimento mais invasivo para os animais. Assim, como o coração é o órgão vital responsável pelo bombeamento do sangue, a utilização de anestésicos (Tabela 1) é necessária para evitar o sofrimento dos animais. Porém, a colheita sanguínea deve ser precisa, para que não ocorra posteriormente necrose do miocárdio, que pode ser fatal (ISHIKAWA et al., 2010). Além disso, nessa localidade há um maior risco de se retirar outros fluidos (corporais e linfa) e não o sangue desejado. Portanto, devido a todos os fatores anteriormente mencionados, a escolha do local de colheita sanguínea em arraias de água doce dependerá, principalmente, do uso ou não de anestésicos e da habilidade do manipulador.

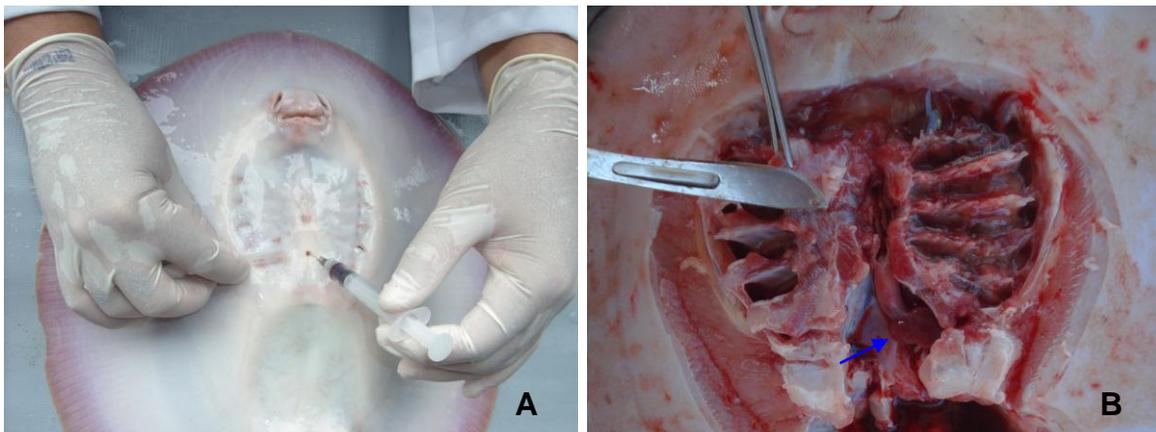


Figura 5 (A-B). (A) Local e posicionamento correto da seringa para a colheita sanguínea por punção cardíaca em arraia de água doce. (B) Câmara branquial aberta indicando a posição do coração (seta azul).

A colheita sanguínea por punção do vaso branquial deve ocorrer na posição da terceira fenda branquial e com a seringa disposta em ângulo de 90o (Figura 6). A perfuração com a agulha deve ir até a percepção da coluna vertebral, em seguida um leve retorno com um pequeno aumento da pressão negativa no êmbolo devem ser

feitos. Não se deve exercer pressão exagerada, pois pode ocorrer hemólise (ISHIKAWA et al., 2010). A punção do vaso branquial é o método mais eficiente para se colher o sangue de arraias de água doce. Esse procedimento é o mais seguro contra as ferroadas dos animais e, além disso, reduz as chances de colheita de outros fluidos corporais indesejáveis durante a colheita do sangue. Portanto, esse é o método em que se obtém sangue com maior rapidez para a análise e proporcionando menor estresse aos animais.

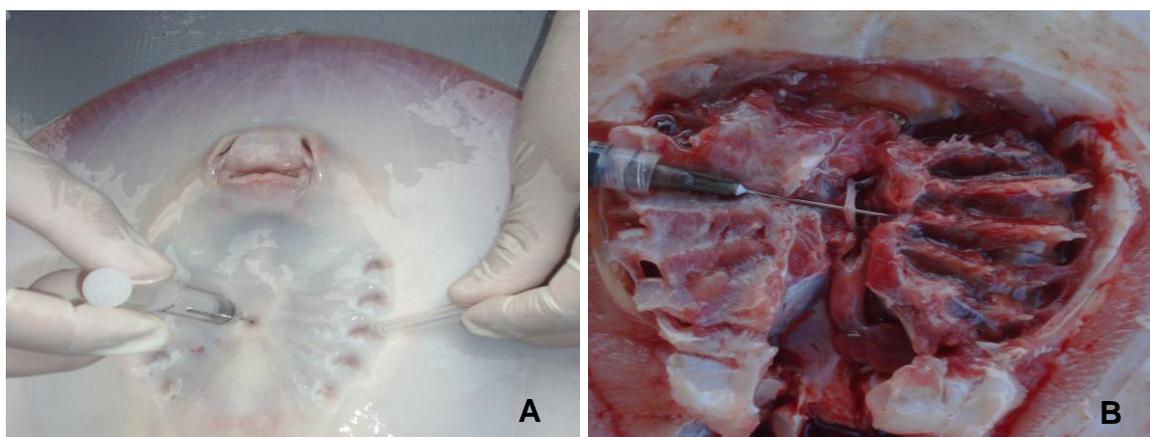


Figura 6. (A) Colheita do sangue por punção do vaso branquial. (B) Detalhe do vaso branquial em arraias de água doce, indicando pela agulha da seringa.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devem ser considerados sempre os procedimentos mais seguros para o manuseio adequado de arraias de água doce durante a obtenção de amostras biológicas, incluindo a colheita de sangue, evitando assim a ocorrência de acidentes graves com os ferrões desses animais aquáticos. Portanto, recomenda-se a colheita de sangue de arraias de água doce por punção do vaso branquial devido a maior segurança para o manipulador, pela facilidade, precisão e rapidez nesse procedimento. Além disso, a punção do vaso branquial reduz o sofrimento dos animais, causado geralmente pelo estresse de manuseio e pela contenção mecânica fora da água.

6. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processos 2459/08 and 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo No 408795/2006-9).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Veterinary Clinical Pathology* 34, 115, 123, 2005.
- BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, Andrews, v. 14, n. 6, p. 569- 575, 2006.
- COMPAGNO, L.J.V., COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *Journal Aquatic of Science* 7, 62-90, 1995.
- DUNCAN, W.P., COSTA, O.T.F., ARAÚJO, M.L.G., FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and Kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, 74, 956-960, 2009.
- GARRONE NETO, D., HADDAD-JUNIOR, V. Acidentes por raias. *In*: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CM, Haddad Jr V, (orgs) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2a edição, São Paulo: Editora Sarvier; p. 295-305, 2009.
- GARRONE NETO, D., HADDAD-JUNIOR, V. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(1): 82-88, 2010.
- INOUE, L.A.K.A., HACKBARTH, A., MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Biodiversidade Pampeana, Uruguaiana*, v. 2, p. 10-15, 2004.
- ISHIKAWA, M.M., PÁDUA, S.B., SATAKE, F. PIETRO, P.S., HISANO, H. Procedimentos básicos para a colheita de sangue em peixes. *Circular Técnica (Embrapa Agropecuária Oeste)*, v. 17, p. 1-8, 2010.
- MAGALHÃES, K.W., LIMA, C., PIRAN-SOARES, A.A., MARQUES, E.E., HIRUMA-LIMA, C.A., LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Toxicon*, 47, 575-583, 2006.
- RIJN, J.A.V., REINA, R.D. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish & Shellfish Immunology*. 1-5, 2010.

- SUDAGARA, M., MOHAMMADIZAREJABADA, A., MAZANDARANIA, R., POORALIMOTLAGHA, S. The efficacy of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2009.
- WALSH, C.J., LUER, C.A. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: *The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives*. Smith, M.; Warmolts, D.; Thoney, D.; Hueter, R. Columbus (eds.), Ohio Biological Survey. 307-323, 2004.
- WILHELM FILHO, D., EBLE, G.J., KASSNER, G., CAPRARIO, F.X., DAFRET, A.L., OHIRA, M. Comparative Hematology in Marine Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102, 311-321, 1992.

CAPÍTULO 3

Efeitos de anticoagulantes em parâmetros sanguíneos em população natural de Potamotrygon sp. (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos², Marcio Quara
Carvalho Santos³, Marcos Tavares-Dias⁴, Jaydione Luiz Marcon⁵

1. Biólogo, Doutor em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
2. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM.
3. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Escola Estadual Sólon de Lucena, Manaus, AM.
4. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Embrapa Amapá, Macapá, AP.
5. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia de três anticoagulantes em parâmetros sanguíneos de arraia cururu *Potamotrygon* sp. O sangue de dez animais foi coletado e diluído nos anticoagulantes: EDTA 5% e 10%, heparina 2.500 e 5.000 UI e citrato de sódio 3,2%, outra parte do sangue também foi analisada sem anticoagulante. O sangue de 20% e 30% das amostras de sangue que não continha anticoagulante e citrato de sódio (3,2%), respectivamente, coagularam. Grumos de células foram observados durante a contagem de eritrócitos em 30% das amostras com EDTA 10%, 40% das amostras com heparina 2.500 UI e 60% das amostras com heparina 5.000 UI. Não foram observadas alterações no eritrograma da arraia cururu com diferentes anticoagulantes, os valores da glicose plasmática foram semelhantes em todos os grupos, enquanto os níveis de proteínas totais foram menores nas amostras coletadas com EDTA 5% e 10%. Em arraia *Potamotrygon* sp., para a conservação de amostras de sangue não é recomendado o uso de citrato de sódio 3.2%, porém, para a determinação da glicose plasmática e do eritrograma os anticoagulantes usados não influenciaram os parâmetros analisados. Portanto, esses resultados indicam que para evitar qualquer sinal de coagulação do sangue deve ser coletada amostras diretamente com qualquer uma dessas concentrações de anticoagulantes.

Palavras chave: Potamotrigonídeos; Anticoagulantes; Sangue; Hematologia.

ABSTRACT

This study assessed the effectiveness of three anticoagulants in blood parameters of "cururu" stingrays *Potamotrygon* sp. Blood of ten animals was collected and diluted with the anticoagulants EDTA 5% and 10%, heparin 2500 and 5000 UI and sodium citrate 3.2%. A blood sample without anticoagulant was also evaluated. The blood of samples without anticoagulant and with sodium citrate 3.2% coagulated in 20% and 30% of the cases, respectively. Clumps of cells were observed during erythrocyte counting in 30% of samples with EDTA 10%, 40% of samples with heparin 2500 IU and 60% of samples with heparin 5000 IU. No alterations were observed on the erythrogram of "cururu" stingrays with different anticoagulants, the values of plasma glucose were similar in all groups and total protein levels were lower in the samples with EDTA 5% and 10%. The use of sodium citrate 3.2% is not recommended for blood sample conservation of *Potamotrygon* sp. stingrays, but anticoagulants did not affect the parameters analyzed in the determination of plasma glucose and erythrogram. Therefore, these results indicate that to avoid blood coagulation the samples should be collected directly with any of these concentrations of anticoagulants.

Keywords: Potamotrygonids, Anticoagulants; Blood; Hematology.

1. INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido líquido distribuído para os diversos órgãos pelo sistema circulatório e que transporta nutrientes, hormônios, eletrólitos, água, resíduos

do metabolismo celular, além de diversas outras substâncias (VERRASTRO et al., 1998). O estudo dos parâmetros sanguíneos tem sido utilizado como uma importante ferramenta para avaliação do estado de saúde em elasmobrânquios (WALSH; LUER 2004; STOSKOPF, 2010) e peixes teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2010).

Para a determinação dos parâmetros sanguíneos é essencial obter o sangue, ainda que tenha sido adicionado um anticoagulante (HATTINGH, 1975). Alguns anticoagulantes utilizados para coletar sangue de peixes teleósteos podem apresentar limitações durante o processamento das amostras, ocasionando alterações principalmente no eritrograma (HATTINGH, 1975; TAVARES-DIAS; SANDRIM, 1998; WALENCIK; WITESKA, 2007). Entre as principais alterações sanguíneas ocasionadas pelo uso de anticoagulantes está a hemólise (HATTINGH, 1975; WALENCIK; WITESKA, 2007), a coagulação (Hattingh, 1975), o aumento dos volumes dos eritrócitos (HATTINGH, 1975; MAFUVADZE; ERLWANGER, 2007), alterações morfológicas das células (WALENCIK; WITESKA, 2007) e leucopenia (MAINWARING; ROWLEY, 1985).

Na hematologia clínica de teleósteos a heparina é o anticoagulante mais usado (80%), seguido pelo EDTA (12%), o citrato (4%) e o ácido citrato dextrose (ACD) que é raramente aplicado (4%) (WALENCIK; WITESKA, 2007; PÁDUA et al., 2010). O uso do EDTA para a preservação dos componentes sanguíneos por tempo prolongando tem sido recomendado (BRAXHALL; DAISLEY, 1972). Por outro lado, o uso de substâncias anticoagulantes naturais, como a heparina, tem sido também indicado, apesar desta não preservar por muito tempo os compostos sanguíneos (SVOBODOVA et al., 1991).

Em tubarão *Carcharhinus plumbeus* a colheita de sangue tem sido acompanhada do uso do EDTA (ARNOLD, 2005), a exemplo da arraia de água doce *Potamotrygon motoro* (PÁDUA et al., 2010). Por outro lado, em arraia marinha *Dasyatis americana* (CAIN et al., 2004), no tubarão *Heterodontus portusjacksoni* (COOPER; MORRIS, 1998) e na arraia de água doce *Paratrygon aiereba* (DUNCAN et al., 2009) o anticoagulante usado tem sido heparina. Apesar da necessidade da manutenção do

sangue, não existem estudos que evidenciam os efeitos de anticoagulantes nos parâmetros do sangue de arraias de água doce. Desta forma, este trabalho objetivou verificar qual é o anticoagulante apropriado para a conservação do sangue em arraias *Potamotrygon* sp., conhecidas popularmente como arraia cururu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As arraias *Potamotrygon* sp. foram capturadas com puçá de mão (rapiché) em igapós da comunidade do Daracué, Barcelos, Amazonas, Brasil (Figura 1). Os animais foram mantidos em tanques-rede e o sangue de 10 espécimes foram coletados com seringas descartáveis conservadas previamente a 4°C sem o uso de anticoagulante. Não foi utilizado anestésico, pois, este tem provocado alterações hematológicas em peixes teleósteos (INOUE et al. 2005). Em microtubos, parte do sangue coletado foi homogeneizado e diluído 20 vezes (10 µL de anticoagulante para 200 µL de sangue) com os anticoagulantes: EDTA 5%, EDTA 10%, heparina 2.500 UI, heparina 5.000 UI e citrato de sódio 3,2%. Uma parte do sangue foi conservada sem anticoagulante, para análise dos parâmetros sanguíneos, o tempo total que inclui a coleta do sangue e a diluição com anticoagulantes não excedeu 30 segundos.

O sangue coletado foi dividido em duas alíquotas, uma para determinação do eritrograma e outra para obtenção do plasma. A contagem de eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer após diluição em solução de formol-citrato, o hematócrito (Ht) foi mensurado pelo método do microhematócrito e a concentração de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina. A partir desses dados foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

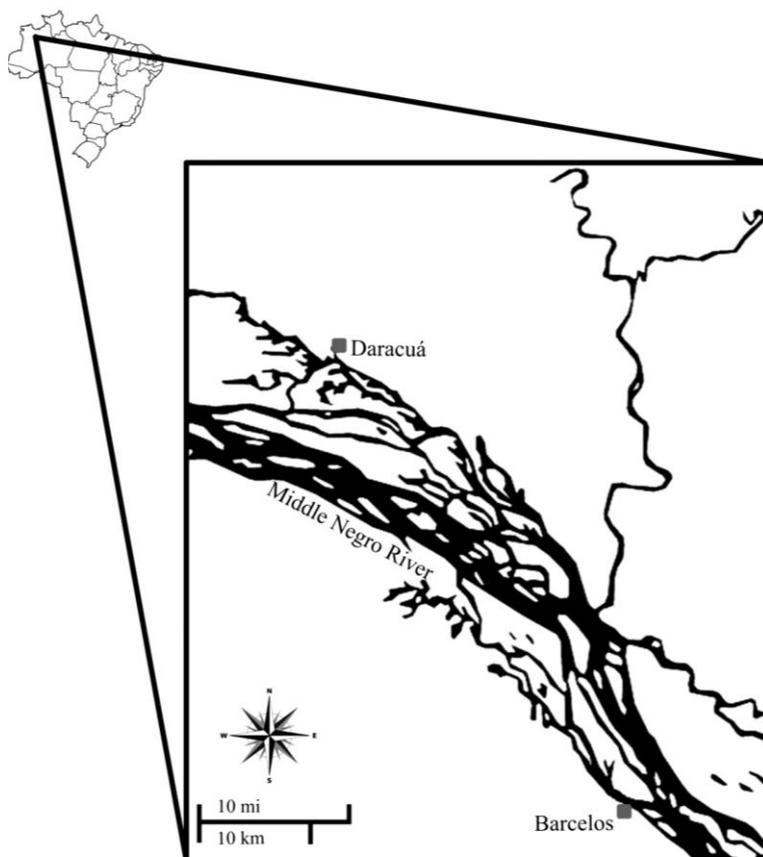


Figura 1. Mapa do Arquipélago de Mariuá, local da coleta de *Potamotrygon* sp. no Médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil.

A segunda alíquota de sangue foi centrifugada a 75 G durante 3 minutos para obtenção do plasma e determinação da concentração de glicose e proteínas totais, por métodos enzimático-colorimétricos quantificados por kits comerciais (Doles-GO). Utilizou-se análise de variância de um fator, seguida do pós-teste de Tukey para avaliar as diferenças entre as médias dos resultados obtidos nos grupos analisados (sem anticoagulante, EDTA 5%, EDTA 10%, heparina 2.500 UI, heparina 5.000 UI e citrato de sódio 3.2%). O erro alfa menor do que 5% foi aceito para rejeitar a hipótese de nulidade.

3. RESULTADOS

Os animais apresentaram as seguintes medidas corporais (média \pm DP) para o CT, LD e peso corpóreo: 21,1 \pm 1,6 cm, 10,7 \pm 3,8 cm e 89,2 \pm 6,6 g. Apenas 20% das amostras de sangue que não foram coletadas com anticoagulante e 30% das amostras que continham citrato de sódio (3,2%) coagularam fato que não foi observado em amostras sanguíneas coletadas com EDTA 5% e 10% ou heparina 2.500 e 5.000 UI.

Durante as contagens de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer foram observados grumos de células em 30% das amostras coletadas com EDTA 10%, em 40% das amostras coletadas com heparina 2.500 UI e em 60% das amostras coletadas com heparina 5.000 UI. Porém, nas amostras sanguíneas coletadas sem anticoagulante, bem como as que continham EDTA 5% e citrato de sódio, não foram observadas grumos de células durante a contagem de RBC. Apesar desses resultados microscópicos não foram observadas diferenças no eritrograma da arraia cururu quando diferentes anticoagulantes e concentrações foram usadas para coleta de sangue (Tabela 1).

Os valores da concentração de glicose plasmática foram semelhantes em todos os grupos, enquanto os níveis de proteínas totais foram menores nas amostras coletadas com EDTA 5% e 10% (Tabela 2).

Tabela 1. Valores do eritrograma da arraia cururu *Potamotrygon* sp. com diferentes anticoagulantes.

Parâmetros	Ht	Hb	RBC	VCM	HCM	CHCM
Grupos	(%)	(g dL ⁻¹)	(x 10 ⁶ µL ⁻¹)	(fL)	(g dL ⁻¹)	(pg)
Sem anticoagulante	19.0 ± 2.6 ^a	3.9 ± 1.2 ^a	0.47 ± 0.09 ^a	367.1 ± 18.8 ^a	72.1 ± 7.3 ^a	22.3 ± 6.2 ^a
EDTA 5%	17.8 ± 2.0 ^a	3.5 ± 1.0 ^a	0.47 ± 0.02 ^a	364.7 ± 29.9 ^a	71.9 ± 17.3 ^a	23.9 ± 2.6 ^a
EDTA 10%	17.8 ± 2.6 ^a	4.7 ± 1.4 ^a	0.43 ± 0.03 ^a	403.1 ± 63.5 ^a	114.9 ± 33.9 ^a	30.3 ± 6.7 ^a
Heparina 2.500 UI	17.8 ± 2.6 ^a	4.8 ± 0.2 ^a	0.49 ± 0.09 ^a	376.2 ± 103.8 ^a	97.3 ± 18.5 ^a	28.4 ± 6.0 ^a
Heparina 5.000 UI	18.7 ± 5.7 ^a	3.9 ± 0.4 ^a	0.43 ± 0.10 ^a	376.7 ± 55.2 ^a	89.2 ± 22.7 ^a	19.9 ± 4.8 ^a
Citrato de sódio 3.2%	16.2 ± 4.1 ^a	3.6 ± 0.7 ^a	0.45 ± 0.12 ^a	346.2 ± 21.9 ^a	67.4 ± 4.4 ^a	19.9 ± 1.4 ^a

Letras iguais significam que não houve diferença estatística significativa

Tabela 2. Valores de glicose e proteínas totais na arraia cururu *Potamotrygon* sp. com diferentes anticoagulantes.

Parâmetros	Glicose	Proteínas totais
Grupos	(mmol L ⁻¹)	(g L ⁻¹)
Sem anticoagulante	0.8 ± 0.1 ^a	10.0 ± 2.0 ^a
EDTA 5%	0.9 ± 0.3 ^a	3.0 ± 2.0 ^b
EDTA 10%	1.0 ± 0.4 ^a	4.0 ± 2.0 ^b
Heparina 2.500 UI	0.8 ± 0.2 ^a	6.5 ± 1.0 ^a
Heparina 5.000 UI	0.9 ± 0.1 ^a	6.5 ± 1.0 ^a
Citrato de sódio 3.2%	0.9 ± 0.1 ^a	7.0 ± 3.0 ^a

Letras diferentes significam que houve diferença estatística significativa

4. DISCUSSÃO

O processo de coagulação nas amostras de sangue de *Potamotrygon* sp. sem anticoagulantes apresentou resultados similares aos encontrados com o anticoagulante citrato de sódio, demonstrando que esse anticoagulante não deve ser utilizado para coleta de sangue em arraias de água doce. Nos teleósteos *Labeo umbratus* e *Labeo capensis*, concentrações de EDTA variando de 0,03 a 5,0% mostraram ser inadequadas para a conservação das amostras de sangue, pois houve coagulação em 100% das amostras (HATTINGH, 1975). Em *Micropterus salmonides*, a heparina não preveniu a coagulação do sangue de forma eficiente como o EDTA (CLARKE et al., 1979). Porém, em *Potamotrygon* sp. não houve coagulação sanguínea quando utilizado EDTA 5% ou 10%, bem como heparina 2.500 UI ou 5.000 UI. Porém, ocorrência de grumos de células foi observada em 30, 40 e 60% das amostras sanguíneas contendo EDTA 10%, heparina 2.500 e 5.000 UI, respectivamente, pois somente após a coleta é que o sangue foi diluído com estes anticoagulantes. A presença de grumos de células também foi relatada em teleósteo *Blennius pholis* quando utilizado heparina 50 UI (MAINWARING; ROMLEY 1985), devido à diminuição

da atividade anticoagulante dessa substância diluída para baixa concentração (OKUNO; NELSON, 1975).

Em arraiais *Potamotrygon* sp. não houve qualquer alteração significativa no eritrograma quando usado EDTA 5% ou 10%, heparina 2.500 ou 5.000 UI e citrato de sódio. Resultados similares foram relatados para parâmetros do eritrograma em *Cyprinus carpio* (WALENCIK; WITESKA, 2007) e hematócrito de surubim híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* X *Pseudoplatystoma corruscans* (ISHIKAWA et al., 2010). Porém, estudos demonstraram alterações nos valores hematócrito ocasionado pelo anticoagulante em *Colossoma macropomum* (TAVARES-DIAS; SANDRIM, 1998), *Oreochromis aureus* (ALLEN, 1993) e *Clarias gariepinus* (ADEYEMO et al., 2009).

Os efeitos da coleta de sangue em parâmetros bioquímicos usando diferentes anticoagulantes têm sido pouco descrito na literatura, tanto para elasmobrânquios como para teleósteos. Os níveis plasmáticos de glicose não apresentaram alterações ocasionadas pelos anticoagulantes usado para coleta de sangue em arraia *Potamotrygon* sp.. Por outro lado, os níveis de proteínas totais plasmática foram menores quando utilizado EDTA 5% e 10%. Além disso, houve uma tendência de elevação não significativa nos níveis de proteínas totais, proporcionalmente ao aumento da concentração do anticoagulante EDTA, fato também relatado para surubim híbrido *P. reticulatum* x *P. corruscans* (ISHIKAWA et al., 2010). Tais diminuições nos níveis de proteínas totais podem estar associadas ao processo de coagulação em que vários componentes do plasma, designados de fatores de coagulação respondem em uma cascata complexa, que se inicia com a conversação de trombina no plasma sanguíneo, para fibrinogênio, e então a formação do coágulo (TAVARES-DIAS; OLIVEIRA, 2009). O início desse processo de coagulação pôde ser observado pela presença de grumos durante a contagem de eritrócitos em amostras que continham o anticoagulante EDTA 5% e 10%. Portanto, os níveis de proteínas plasmáticas diminuíram devido à formação inicial do coágulo, o qual retém proteínas, levando a uma redução nos níveis plasmáticos totais de proteínas.

5. CONCLUSÃO

Em arraias *Potamotrygon* sp., para coleta de amostras de sangue não é recomendado o uso de citrato de sódio 3.2%, que demonstrou ser um anticoagulante pouco eficiente. Porém, para a determinação da glicose plasmática e do eritrograma os anticoagulantes usados não influenciaram os parâmetros analisados, embora sinais de coagulação foram observados em amostras coletadas com EDTA 10%, heparina 2.500 e 5.000 UI, Para a dosagem de proteínas totais em plasma sanguíneo o anticoagulante ideal é a heparina 2.500 e 5.000 UI. Portanto, esses resultados indicam que para evitar qualquer sinal de coagulação do sangue pode ser coletar amostras com quaisquer concentrações de EDTA ou heparina.

6. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processos 2459/08 e 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9). O autor principal agradece a concessão da bolsa de doutorado fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMO, O.K.; OKWILAGWE, O.O.; AJANI, F. Comparative assessment of sodium EDTA and heparin as anticoagulants for the evaluation of haematological parameters in cultured and feral African catfish (*Clarias gariepinus*). Braz. J. Aquat. Sci. Technol., 13(1):19-24, 2009.
- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. Veterinary Clinical Pathology, 34(2): 115-123, 2005.
- ALLEN, P. Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* Steindachner and the effects of heparin on these. Comp. Biochem. Physiol., 106A: 355- 358, 1993.
- BLAXHALL, P.C. The haematological assessment of health of freshwater fish. A review of selected literature. J. Fish Biol. 4: 593 – 604, 1972.

- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A.L. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35(4): 471-476, 2004.
- CLARKE, S.; WHITMORE, D.H.; MCMAHON, R.F. Considerations of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmonides*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 14:147-158, 1979.
- COOPER, A.R.; MORRIS, S. The blood respiratory, haematological, acid-base and ionic status of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*, during recovery from anaesthesia and surgery: a comparison with sampling by direct caudal puncture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 119: 895-903, 1998.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; ARAÚJO, M.L.G.; FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, 74: 956-960, 2009.
- HATTINGH, J. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, Heidelberg, v.355, n.4, p.347-352, 1975.
- INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazônica*, 35(2): 289-295, 2005.
- ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; HISANO, H.; JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M.L. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ciência Rural (UFSC. Impresso)*, v. 40, p. 1557-1561, 2010.
- MAFUVADZE, B.; ERLWANGER, K.H. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinarski Archiv, Zagreb*, v.77, n.5, p.427- 434, 2007.
- MAINWARING, G.; ROWLEY, A.F. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology: part A: physiology*, v.80, n.1, p.85-91, 1985.
- OKUNO, T.; NELSON, C.A. Anticoagulant activity of heparin in intravenous fluids. *Journal of Clinical Pathology*, London, v.28, n.6, p.494-497, 1975.
- PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M. Características morfológicas, morfométricas e citoquímicas das células sanguíneas da arraia ocelata *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii, Potamotrygonidae): estudo de caso. *Ensaio e Ciência*, 14(1) 147-158, 2010.
- STOSKOPF, M. Hematology of Elasmobranchs. In: Schalm's Veterinary Hematology. WEISS, JM & J WARDROP, Wiley-Blackwell, 6th ed., 1013-1017, 2010.
- SVOBODOVA, Z.; PRAVDA, D.; PALACKOVA, J. Unified methods of haematological examination of fish. *Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Edition Methods N. 22*, 31 p., 1991.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, v.11, 205-224, 2010.

- TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S.R. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências*, v.7, n. 2, 205-224, 2009.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Acta Scientiarum: biological science*, Maringá, v.20, n.2, p.151-155, 1998.
- VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; NETO, S.W. *Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. 303 p, 1998.
- WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C: toxicology and pharmacology*, Elmsford, v.146, n.3, p.331-335, 2007.
- WALSH, C.J. ; LUER, C.A. Elasmobranch Hematology: Identification of Cell Types and Practical Applications. In: *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives*. Smith, M.; Warmolts, D.; Thoney, D.; Hueter, R. Columbus (eds.), Ohio Biological Survey. p. 307-323, 2004.

CAPÍTULO 4

A morphological study of blood cells in three freshwater stingrays species (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from middle Rio Negro, central Amazon, Brazil

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos², Maria Lúcia Góes de Araújo³, Marcos Tavares-Dias⁴, Jaydione Luiz Marcon⁵

1. Biólogo, Doutor em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.

2. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM.

3. Oceanógrafa, Doutora em Diversidade Biológica, Pesquisadora da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, RE.

4. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Embrapa Amapá, Macapá, AP.

5. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM

ABSTRACT

Morphological and morphometrical characterization of blood cells of three stingrays *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon* sp. and *Paratrygon aiereba* from middle Rio Negro, Amazonas state, were carried out. Erythrocytes, erythroblasts, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, heterophils and basophils were identified in the blood of three stingray species from family Potamotrygonidae. Morphology and measurements of these cells were similar to the observed in marine elasmobranchs. All these freshwater stingrays presented four types of leukocytes, such as two granulocytes and two agranulocytes, and this leukocytes pattern seems to be characteristic of Potamotrygonidae species.

Keywords: Leucocytes; Blood cells; Measures; Potamotrygonidae.

1. INTRODUCTION

The family Potamotrygonidae is composed exclusively by freshwater stingrays and distributed along most of the great fluvial systems of South America (LOVEJOY, 1996) that end in the Atlantic Ocean or Caribbean Sea (COMPAGNO; COOK, 1995). This family is constituted by four genera, *Plesiotrygon*, *Paratrygon*, *Potamotrygon* and *Heliotrygon*, the first two monospecific and the last constituted for approximately 20 valid species (CARVALHO et al., 2003).

Freshwater stingrays are important components of Amazon biodiversity and have great socioeconomic relevance, especially by its use in aquaria, representing an alternative source of income for riverine people of the middle Rio Negro, Amazon, Brazil (CHAO et al., 2001). Four species are found in the middle Rio Negro: *Potamotrygon motoro* (Müller; Henle, 1841), *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855), *Potamotrygon schroederi* (Fernández-Yépez, 1958) and *Paratrygon aiereba* (Müller; Henle, 1841). In addition, a new species, known as *Potamotrygon* sp. (cururu stingray), is in process of identification and scientific description and probably is endemic of central Amazon.

Comparative morphological characterization of blood cells of mammals, fish, teleosts, amphibians, reptiles and birds was described by Canfield (1998). Some studies have focused only in marine elasmobranchs species (VALENZUELA et al., 2003; LUER et al., 2004; WALSH; LUER, 2004; CAIN et al., 2004; ARNOLD, 2005; DOVE et al., 2010), but few are in freshwater elasmobranchs and solely aimed to report the

presence of erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils in freshwater stingrays of Potamotrygonidae family (GRIFFITH et al., 1973).

Studies about leukocytes can indicate peculiar characteristics of the immune system of different fish species (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007; PAVLIDIS et al., 2007). However, the identification of leucocytes is not routinely done in laboratories of veterinary clinical hematology (CANFIELD, 1998; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; DAMATTA et al., 2009), due to lack of methodological standardization and classification of these cells (CANFIELD, 1998), especially the granulocytes. Nevertheless, there are no studies about blood cells of freshwater stingray from the Amazon basin. Thus, this study was designed to investigate morphological and morphometrical on and characterizats of blood cells in three freshwater stingray from the middle Rio Negro (Amazonas state, Brazil), region of central Amazon.

2. MATERIAL AND METODS

2.1. Study area

The middle Rio Negro, Amazonas state, presents a considerable diversity of small ornamental fish and five stingray species of Potamotrygonidae family (CHAO et al., 2001). In this study, rays were captured in beaches, lakes, small streams ("igarapés") and flooded forests ("igapós") of this archipelago, near Barcelos municipality, AM, Brazil.

2.2. Animals, procedures for blood collection and analysis

For this study, 55 specimens of *Potamotrygon motoro*, 53 of *Potamotrygon* sp. (cururu stingray) and 42 of *Paratrygon aiereba* were captured among January of 2006 to October of 2010. All stingray were captured by hand nets ("rapiché") and immediately anesthetized with eugenol (0.2 g/L), and blood was collected by puncture of the branchial artery using syringes with EDTA (10%). After these procedures, animals were recovered and then returned to the local of capture.

Blood was used for smears preparations, stained with a combination of May Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003) for identification and morphometrical measurements (μm), which were done using optical microscope and millimeter ruler.

3. RESULTS

Smears of *Potamotrygon motoro*, *Paratrygon aiereba* and *Potamotrygon* sp. showed mature erythrocytes, erythroblasts, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, heterophils and basophils with similar size. Monocytes were the leukocytes presenting highest size in these three elasmobranchs (Table 1).

Table 1. Mean diameter (μm) \pm standard deviation of largest and smallest axis of blood cells (n= 50) of three freshwater stingray species from middle Rio Negro, Amazon, Brazil.

Cells/ Species	<i>Potamotrygon motoro</i>	<i>Paratrygon aiereba</i>	<i>Potamotrygon</i> sp.
Erythrocytes	20.2 \pm 0.8 x 14.1 \pm 0.7	20.0 \pm 0.8 x 14.0 \pm 0.8	20.1 \pm 0.7 x 14.1 \pm 0.6
Erythroblasts	19.0 \pm 0.8 x 14.7 \pm 0.5	19.1 \pm 0.7 x 14.8 \pm 0.5	19.0 \pm 0.9 x 14.8 \pm 0.4
Thrombocytes	14.6 \pm 1.5 x 9.5 \pm 0.6	14.6 \pm 1.3 x 9.6 \pm 0.4	14.7 \pm 1.4 x 9.6 \pm 0.5
Lymphocytes	14.7 \pm 1.7 x 12.8 \pm 3.1	14.8 \pm 2.1 x 12.7 \pm 2.9	14.4 \pm 1.8 x 12.4 \pm 2.7
Monocytes	21.3 \pm 1.2 x 21.3 \pm 1.2	21.5 \pm 1.0 x 21.5 \pm 1.0	21.4 \pm 1.1 x 21.4 \pm 1.1
Heterophils	14.4 \pm 0.4 x 14.4 \pm 0.4	14.4 \pm 0.5 x 14.4 \pm 0.5	14.5 \pm 0.5 x 14.5 \pm 0.5
Basophils	13.4 \pm 0.6 x 13.4 \pm 0.6	13.6 \pm 0.6 x 13.6 \pm 0.6	13.5 \pm 0.5 x 13.5 \pm 0.5

In these three freshwater stingray species, mature erythrocytes present elliptical shape, with abundant and hyaline cytoplasm. In general, nucleus is located in the central region and follows the cell morphology (Fig. 1-I and 1-II). Erythroblasts are generally rounded cells, with hyaline cytoplasm, but present higher nucleus-cytoplasm

ratio compared to mature erythrocytes (Figure 1-III). Lymphocytes are irregular cells, may be elliptical and rarely oval, but with nucleus occupying a large part of the basophilic cytoplasm. Lymphocytes present cytoplasmic projections without visible granulations (Fig. 1-IV and 1-V and), and may present vacuole (Fig. 1-VI). Thrombocytes are generally fusiform, with hyaline cytoplasm; nucleus occupies almost the entire cell and follows its format (Fig. 1-VI and VII). Monocytes are predominantly oval, with nucleus generally decentralized and basophilic cytoplasm, and may have vacuole. Nucleus is generally eccentric, and occupies most of the cell (Fig. 1-VIII and IX). Heterophils are cells predominantly oval, with large amount of heterophilic coarse granules and nucleus is generally eccentric (Fig. 1-X and XI). Basophils are also predominantly oval with basophilic granules and nucleus is eccentric and generally bilobulated (Fig. 1-XII).

4. DISCUSSION

In veterinary clinical hematology, studies regarding blood components are important to understand the physiological status of mammals and non-mammals animals (CANFIELD, 1998; WALSH; LUER, 2004; VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007), as well as of different marine elasmobranchs species (SAUNDERS, 1966; SHERBURNE, 1972; WILHELM-FILHO et al., 1992; VALENZUELA et al., 2003; LUER et al., 2004; WALSH; LUER, 2004; CAIN et al., 2004; ARNOLD, 2005; DOVE et al., 2010). However, these have been little used for freshwater stingray species from Amazon.

In blood of the three freshwater stingray species from Amazon were identified mature erythrocytes, erythroblasts, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, heterophils and basophils. Most vertebrates have seven blood cell types: erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, eosinophils, basophils, monocytes and neutrophils (CANFIELD, 1998; DAVIS et al., 2008). The morphology of each cell type appears to be similar, except neutrophils that in some cases are replaced by heterophils, which present the same immunological function (HAWKEY; DENNETT, 1989; JAIN, 1993). Presence of eosinophils was not reported to Amazon stingrays, demonstrating a great

importance of heterophils in immune defense of potamotrygonids when compared to other non-mammalian vertebrates.

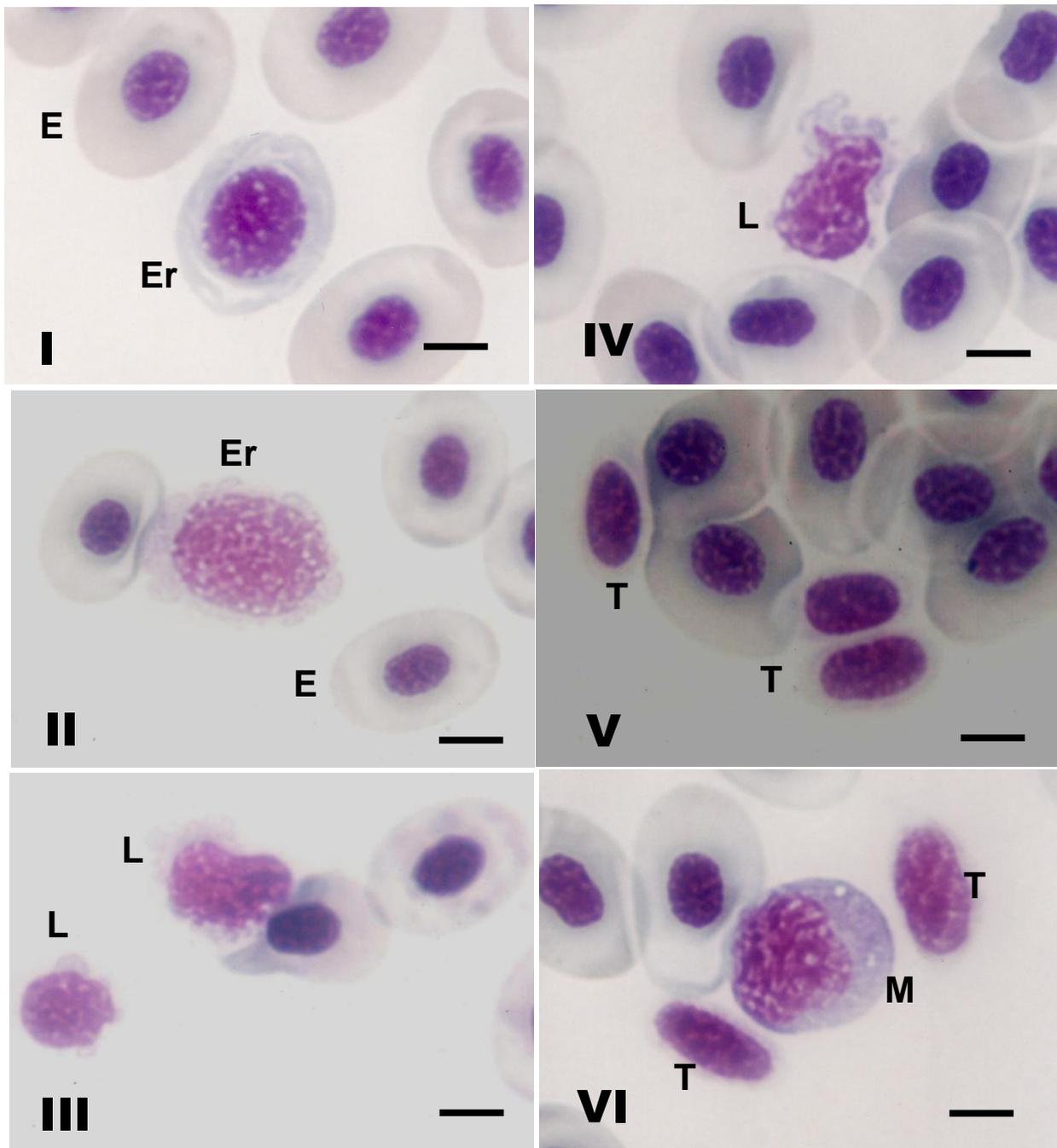
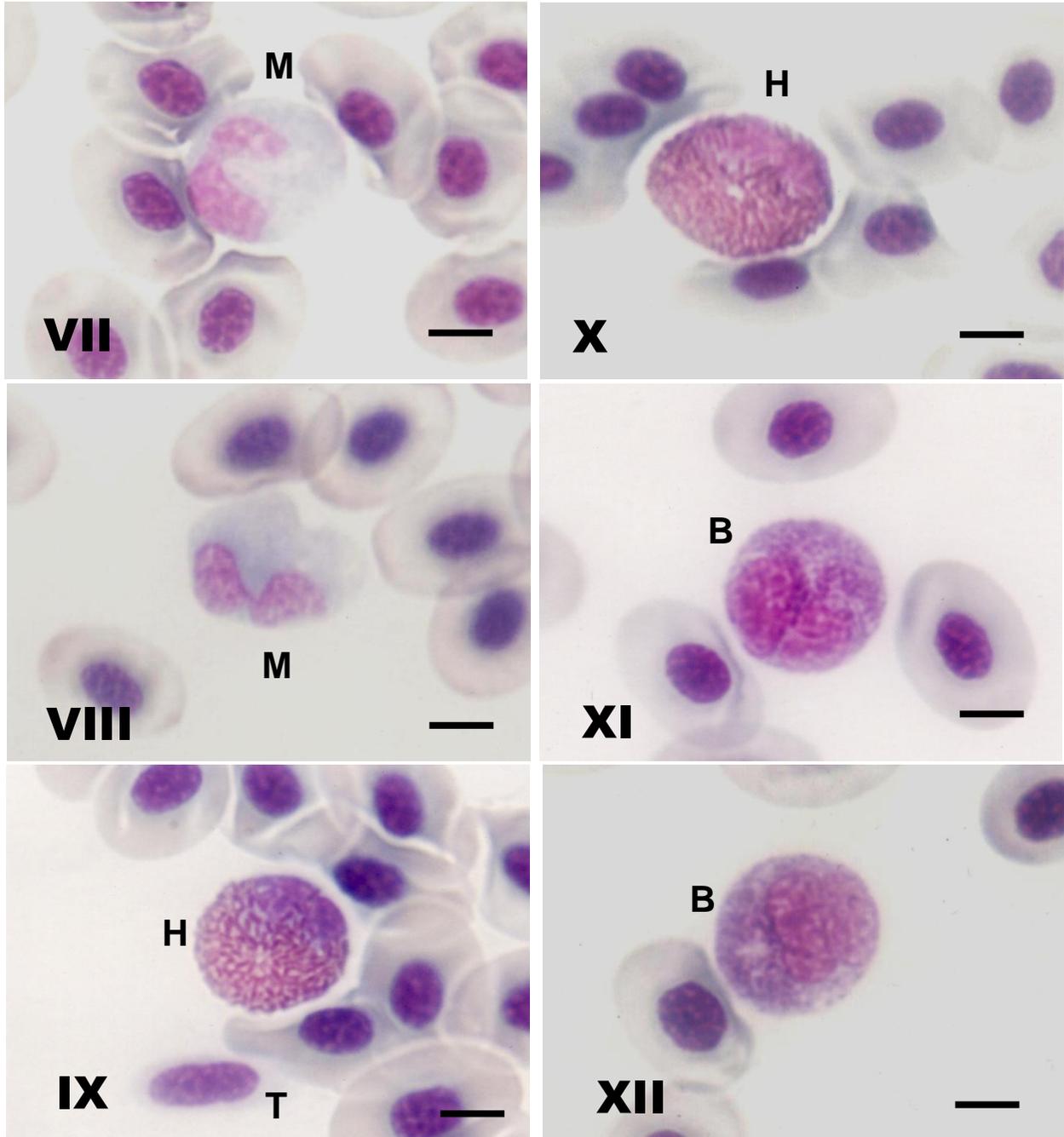


Figure 1 (I – VI). Blood cells of three stingrays freshwater stained May Grunwald-Giemsa-Wright. **(I)** (E) Erythrocyte and (Er) erythroblast of *Potamotrygon* sp.; **(II)** (E) Erythrocyte and (Er) erythroblast of *Potamotrygon motoro*; **(III)** (L) Lymphocyte of *Paratrygon aiereba*; **(IV)** (L) Lymphocyte of *Potamotrygon* sp.; **(V)** (T) Thrombocyte of

Potamotrygon motoro; (VI) (T) Thrombocyte and (M) monocyte of *Potamotrygon* sp.. Bar = 8µm.



Continuation figure 1 (VII - XII). Blood cells of three stingrays freshwater stained May Grünwald-Giemsa-Wright. (VII) (M) Monocyte of *Paratrygon aiereba*; (VIII) (M) Monocyte of *Potamotrygon motoro*; (IX) (H) Heterophil and (T) thrombocyte of *Potamotrygon* sp.;

(X) (H) Heterophil of *Paratrygon aiereba*; **(XI)** (B) Basophil of *Potamotrygon* sp.; **(XII)** (B) Basophil of *Potamotrygon motoro*. Bar = 8µm.

Erythrocytes are generally larger in lower Orders and variations in size may occur within species of the same Order (CANFIELD, 1998). Erythrocytes of freshwater stingrays are approximately two times higher than in freshwater and marine teleosts as *Cichlassoma dimerus* Heckel (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007) and *Dicentrarchus labrax* L. (ESTEBAN et al., 2000), and lower than in shark *Centroscyrnus coelolepis* Barbosa du Bocage & de Brito Capello (SHERBURNE, 1972). Morphological characteristics of erythrocytes of freshwater stingrays are similar to the marine elasmobranchs *C.coelolepis* (SHERBURNE, 1972), *Squalus acanthias* L. (CLEWLEY et al., 2002), *Schroederichthyes chilensis* Guichenot (VALENZUELA et al., 2003), *Ginglymostoma cirratum* Bonnaterre, *Carcharhinus limbatus* Müller & Henle, *Dasyatis sabina* Lesueur, *Raja eglanteria* Bosc (WALSH; LUER, 2004; LUER et al., 2004), *Raja microocellata* Montagu, *Raja brachyura* Lafont, *Raja* sp. (ARAGORT et al., 2005), *Oreoctolobus maculatus* Bonnaterre, *Oreoctolobus ornatus* De Vis, *Oreoctolobus* sp. (OLD; HUVENEERS, 2006) e *Rhincodon typus* Smith (DOVE et al., 2010).

In non-mammal vertebrates immature erythrocytes (erythroblasts) may be smaller than erythrocytes (SHERBURNE, 1972; CANFIELD, 1998), and this characteristic was also confirmed to potamotrigonids. Walsh and Luer (2004), report that is common the presence of erythroblasts in marine elasmobranch blood, morphological characteristics of this cell type was similar to the observed in sharks *Carcharhinus plumbeus* Nardo (ARNOLD, 2005) and *S. chilensis* (VALENZUELA et al., 2003).

Thrombocytes are cells analogous to mammals' platelets, which are cytoplasmic fragments, functional like cells of homeostasis in non-mammals vertebrates, and apparently plays a role in anti-inflammatory activity (CANFIELD, 1998; MESEGUER et al., 2002; SATAKE et al., 2009). Round thrombocytes have usually been confused with small lymphocytes (CANFIELD, 1998; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), and are difficult to compare size of this cell type. In elasmobranchs, this nucleated cell is primarily involved in the coagulation process (WALSH; LUER, 2004; LUER et al., 2004)

and, like in teleosts, also has macrophagic activity (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007). To dogfish *Scyliorhinus canícula* L. was experimentally demonstrated that blood thrombocytes remove antigenic substances, as colloidal charcoal particles (MORROW; PULSFORD, 1980; HUNT; ROWLEY, 1986). In general, to elasmobranchs and teleosts these cells have been described as a type of leukocyte, but this paper suggests that thrombocytes are not classified as a leucocytary cell type. Cell size and morphological characteristics of thrombocytes of freshwater stingrays were similar to the reported to sharks *S. chilensis* (VALENZUELA et al., 2003), *C. leucas* (WALSH; LUER, 2004) and different of *C. plumbeus*, which presented cytoplasmic granules (ARNOLD, 2005). Besides, in the blood of shark *C. coelolepis* the form called "drop" was observed (SHERBURNE, 1972), not founded in Amazon stingrays.

In blood smears of marine elasmobranchs are frequently observed leukocytes at different stages of maturation, which can cause incorrect identification (WALSH; LUER, 2004), contributing to the confusing terminology of elasmobranchs leukocytes (WALSH; LUER, 2004), and also error in the identification of small monocytes and large lymphocytes can occur (DAMATTA et al., 2009). In the present study, lymphocytes presented shape from round to amorphous, fact also observed to lymphocytes of *C. coelolepis* (SHERBURNE, 1972), *S. chilensis* (VALENZUELA et al., 2003), *G. cirratum* (LUER et al., 2004; WALSH; LUER, 2004), *C. plumbeus* (ARNOLD, 2005), *R. microocellata*, *R. brachyura*, *R. sp.* (ARAGORT et al., 2005), *O. maculatus*, *O. ornatus*, *O. sp.* (OLD; HUVENEERS, 2006) and *R. typus* (DOVE et al., 2010). The size of lymphocytes of Amazon rays was slightly smaller than in shark *C. coelolepis* (SHERBURNE, 1972).

Monocytes are agranulocytes, which are considered cells in transit in the peripheral blood, and some authors incorrectly used the term macrophage referring to circulating monocytes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Monocytes were not observed in the blood of *C. coelolepis* (SHERBURNE, 1972), and the morphological characteristics of this cell type was similar to the observed in other elasmobranchs (VALENZUELA et al., 2003; LUER et al., 2004; WALSH; LUER, 2004; ARNOLD, 2005; ARAGORT et al., 2005; OLD; HUVENEERS, 2006; DOVE et al., 2010).

The granulocytic leukocytes normally are the main cells of immunological defense in animals because its cytoplasmic compartments contain large amounts of cellular structures (granules) which provide the adequate conditions to cells act in organism defense. Granulocytes were reported for several elasmobranchs species, but identification and classification are difficult to perform due to the great variation on shape, size and color of cells (LUER et al., 2004). In blood of freshwater stingrays, two types of granulocytes were reported, heterophils and basophils. Luer et al., (2004), report that more common granulocyte in the blood of elasmobranchs is the heterophils, while basophils are rare blood cell types. Griffith et al., (1973) showed the presence of neutrophils and eosinophils in the blood of potamotrigonids. The identification of neutrophils and eosinophils in these potamotrigonids can be related to the extreme difficulty in the staining method of smears and/or incorrect classification of the different leucocytary types. The presence of heterophils and basophils with the same morphological characteristics of Amazon rays was observed in *C. coelolepis* (SHERBURNE, 1972), *S. chilensis* (VALENZUELA et al., 2003), *C. limbatus* (WALSH; LUER, 2004) and *R. typus* (DOVE et al., 2010).

In conclusion, it is possible that all freshwater stingrays present erythrocytes, erythroblasts, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, heterophils and basophils, because the patterns of blood cell types are conservative at family level (CANFIELD, 1998). Morphology and size of the different cell types are similar to the sharks and marine rays. It is very important to characterize the leucocytary types of rays in order to provide a basic knowledge of these cells and for correlations with health condition, quantifying the cell types of these animals that are extremely important for the aquarium market in the Amazonas State.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, process 925/03, 2203/05, 2204/05, 2459/08 and 126/08) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process No 486289/2006-0, 40872/2006-4 and

408795/2006-9). The main author thanks the concession of the Doctor degree scholarship by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERENCES

- ARAGORT, W.; ALVAREZ, M.F.; LEIRO, J.L.; SANMARTÍN, M.L. Blood protozoans in elasmobranchs of the family Rajidae from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 63-68, 2005.
- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Veterinary Clinical Pathology* 34, 115-123, 2005.
- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A. Plasma biochemistry reference values of wild caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35, 471-476, 2004.
- CANFIELD, P.J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal* 76, 793-800, 1998.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América*. Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, J.r. Porto Alegre, Edipucrs 22-28, 2003.
- CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba*. EDUA, Manaus. 309 p, 2001.
- CLEWLEY, A.; KOCAN, R.M.; KOCAN, A.A. An intraerythrocytic parasite from the spiny dogfish, *Squalus acanthias* L., from the Pacific Northwest. *Journal of Fish Diseases* 25, 693-696, 2002.
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *Journal Aquatic of Science* 7, 62-90, 1995.
- DAMATTA, R.A.; RIBEIRO, M.L.S.; CARVALHO, T.M.U.; NASCIMENTO, J.L.M. *Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes*. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Tavares-Dias, M. Embrapa, Amapá, Macapá, 314-329, 2009.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional ecology* 22, 760-772, 2008.
- DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.; CLAUSS, T.M. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark *Rhincodon typus*. *Aquatic Biology* 9, 177-183, 2010.
- ESTEBAN, M.A.; MUNOZ, J.; MESENGUER, J. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *The anatomical record* 258, 80-89, 2000.

- GRIFFITH, R.W.; PANG, P.K.T.; SRIVASTAVA, A.K.; PICKFORD, G.E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and diluted sea water. *Biology Bulletin* 144, 304-320, 1973.
- HAWKEY, C.M.; DENNETT, T.B. *Color Atlas of Comparative Veterinary Hematology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 187 p, 1989.
- HUNT, T.C.; ROWLEY, A.F. Studies on the reticulo-endothelial system of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. I. Endocytic activity of fixed cells in gills & peripheral blood leukocytes. *Cell and Tissue Research* 244, 215-226, 1986.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA. 409 p, 1993.
- 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* 117, 207-257, 1996.
- LUER, C.A.; WALSH, C.J.; BODINE, A.B. The Immune System of sharks, skates, and rays. In: *Biology of sharks and their relatives*. Carrier, J. C., Musick, J. A. & Heithaus, M. R. (eds.) New York, CRC Marine Biology, 369-389, 2004.
- MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A.; RODRÍGUEZ, A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy research and technique* 57, 491-497, 2002.
- MORROW, W.J.W.; PULSFORD, A. Identification of peripheral blood leukocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. *Journal of Fish Biology* 17, 461-475, 1980.
- OLD, J.M.; HUVENEERS, C. Morphology of the blood cells from three species of wobbegong sharks (*Orectolobus* species) on the east coast of New South Wales. *Zoo Biology* 25, 73-82, 2006.
- PAVLIDIS, M.; FUTTER, W.C.; KATHARIO, P.; DIVANACH, P. Blood cells of six Mediterranean mariculture fish species. *Journal Applied Ichthyology* 23, 70-73, 2007.
- SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. *Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica*. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Tavares-Dias M. Embrapa, Amapá, Macapá, 330-345, 2009.
- SAUNDERS, D.C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Transactions. American Microscopy Society* 85, 427-449, 1966.
- SHERBURNE, S. Cell types, differential cell counts, and blood cell measurements of a Portuguese shark, *Centroscymnus coelolepis*, captured at 700 fathoms. *Fishery bulletin* 71, 435-439, 1973.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scientiarum* 26, 157-162, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal* 19, 103-110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpress: Ribeirão Preto, SP. 144p, 2004.

- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus*, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica* 16, 273-276, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 49-54, 2007.
- VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): la série blanca. *Gayana* 67, 130-136, 2003.
- VÁZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell* 39, 151-160, 2007.
- WALSH, C.J. ; LUER, C.A. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: *The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives*. Smith, M., Warmolts, D., Thoney, D. & Hueter, R. Columbus (eds.), Ohio Biological Survey 307-323, 2004.
- WILHELM FILHO, D.; EBLE, G.J.; KASSNER, G.; CAPRARIO, F.X.; DAFRET, A.L.; OHIRA, M. Comparative Hematology in Marine Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102, 311-321, 1992.

CAPÍTULO 5

Aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias de água doce (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Marcio Quara de Carvalho Santos², José Fernando Marques Barcellos³, Rejane Souza de Aquino Sales⁴, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos⁵, Elizabeth Gusmão Affonso⁶, Marcos Tavares-Dias⁷, Irani Quagio Grassiotto⁸, Jaydione Luiz Marcon⁴

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, Amazonas

²Secretaria de Educação do Estado do Amazonas (SEDUC), Manaus, Amazonas

³Laboratório de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas

⁴Laboratório de Fisiologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas

⁵Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, Amazonas

⁶Laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas

⁷Laboratório de Aquicultura e Pesca, Embrapa Amapá, Macapá, Amapá

⁸Laboratório de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo

Resumo

Este estudo teve como objetivo comparar as características citoquímicas e ultraestruturais das células sanguíneas de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. Dez indivíduos de cada espécie de arraias de água doce foram utilizados para coleta sanguínea. Reação PAS-positiva ocorreu em trombócitos e heterófilos, bem como reação fraca em linfócitos e monócitos. Não foi observada reação positiva para peroxidase em nenhum leucócito, mas reação de metacromasia ocorreu em basófilos. Reação positiva para Sudan Black foi observada s em trombócitos e linfócitos, além de coloração fraco-positiva em heterófilos. Somente em heterófilos e basófilos houve reação positiva para azul de bromofenol. A presença de reticulócitos foi observada em eritrócitos. Análise ultraestrutural mostrou que para essas espécies de arraias. Os trombócitos são geralmente fusiformes e ocasionalmente redondos, no citoplasma foram encontrados sistema canalicular, vesículas de tamanhos variados, canaliculos de diferentes tamanhos, aglomerados de glicogênio e numerosas mitocôndrias. Os linfócitos apresentaram formato amorfo, com citoplasma escasso, sendo observada a presença de vacúolos e poucas mitocôndrias. Os heterófilos apresentaram um número elevado de grânulos que podem ser de glicogênio, lipídios e proteínas, entretanto, não foi possível diferenciá-los. As análises ultraestruturais mostraram que trombócitos, mas principalmente heterófilos são células ricas em organelas citoplasmáticas. Porém, devido ao baixo número de basófilos no sangue dos potamotrigonídeos, tais células não foram localizadas nos estudos ultraestruturais. Um padrão conservador foi observado nas marcações citoquímicas e nos aspectos ultraestruturais das células sanguíneas nas três espécies de arraias estudadas.

Palavras chave: potamotrigonídeos, citoquímica, células, sangue, ultraestrutura.

ABSTRACT

This work aims to compare cytochemically and ultrastructure of blood cells stingrays *Potamotrygon* sp. (stingray cururu), *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*. Ten individuals of each of the three rays of freshwater were used for subsequent analysis and blood withdrawal and ultrastructural cytochemistry. A conservative pattern was observed in the markings and cytochemical aspects ultrastructures of blood cells in three species of stingrays studied. Glycogen showed positive reactions in heterophils and thrombocytes as well as weak positive reaction in lymphocytes and monocytes. There was no positive reaction for peroxidase, but there was significant reaction of metachromasia. Positive reactions were observed for lipids in lymphocytes and thrombocytes, as well as weaker staining in heterophil positive. The identification of proteins scored positive only in basophil heterophils and moreover the presence of reticulocytes was observed in erythrocytes. Thrombocytes are usually fusiform and occasionally round, were found in the cytoplasm canalicular system, vesicles of varying sizes, canaliculi of different sizes, clusters of glycogen and numerous mitochondria. Lymphocytes showed amorphous shape with scant cytoplasm, revealing the presence of vacuoles and few mitochondria. Due to scarcity of basophils in the blood of potamotrigonids not been possible to locate this type of granulocyte in this study, heterophils showed a high number of beads that can be glycogen, lipids and proteins; however, it was not possible to differentiate them. The composition cytochemistry revealed that heterophils are the most important cells of the immune system potamotrigonids. The ultrastructural aspects reveal that mainly heterophils and thrombocytes are rich rich cells cytoplasmic organelles. The

information generated by this study may help in the interpretation of the response mechanisms of leukocytes and thrombocytes against stress, infectious and parasitic agents, and this group of elasmobranchs.

Keywords: potamotrygonids, cytochemistry, cells, blood, ultrastructures.

1. INTRODUÇÃO

A família Potamotrygonidae compreende as espécies de elasmobrânquios, arraias de água doce, pertencentes à ordem Myliobatiformes, um grupo bem sucedido e com status de predadores do topo de cadeia na região Neotropical (COMPAGNO; COOK, 1995). Historicamente, os potamotrygonídeos não são bem visto pelas populações ribeirinhas devido à presença de ferrões que podem provocar acidentes dolorosos. Entretanto, esses possuem importância significativa para os estados do Amazonas e Pará, devido a pesca comercial principalmente como peixe ornamental e secundariamente para alimentação (DUNCAN et al., 2010).

A arraia *Potamotrygon* sp. (cururu), *Potamotrygon motoro* (arraia de fogo) e *Paratrygon aiereba* (arraia de praia) são potamotrygonídeos que apresentam habitats e tamanhos médios diferenciados no Arquipélago de Mariuá, estado do Amazonas, que é o local de maior exploração desses recursos naturais. A arraia cururu é a menor de porte, tem distribuição restrita ao médio Rio Negro e ocorrem preferencialmente em ambientes de liteira com baixo fluxo de água e correnteza, típicos das áreas marginais de igapós (BARCELOS, 1997; ARAÚJO, 1998). *Potamotrygon motoro* possui médio porte e seu hábitat preferencial são as áreas com fundo lamacento, onde existe a influência mais visível do fluxo de água. *Paratrygon aiereba* possui maior porte e prefere áreas de praia que possuem o fundo de areia, onde a percepção do fluxo de correnteza é bem nítida. Porém, há poucas informações sobre a hematologia dessas espécies de arraias, principalmente no que tange aos aspectos morfológicos e citoquímicos das células sanguíneas.

Em peixes, devido à grande variação morfológica dos granulócitos, uma análise baseada apenas na morfologia é insuficiente para identificação dos diferentes tipos celulares. Estudos dos diferentes constituintes citoquímicos dos leucócitos podem ser de grande valia auxiliando na identificação e caracterização morfológica dessas células, uma vez que os constituintes enzimáticos e não enzimáticos leucocitários podem ser demonstrados por métodos citoquímicos, além de fornecer informações sobre a função de cada leucócito (VEIGA et al., 2000; TAVARES-DIAS, 2006; TAVARES-DIAS; MORAES, 2006). Os leucócitos possuem

proteínas no núcleo e no citoplasma, entre as proteínas citoplasmáticas, as enzimas são as mais importantes, estando ligadas às granulações das células. As proteínas não-enzimáticas são menos importantes, uma vez que não são usadas durante a fagocitose e morte dos microorganismos, como ocorre com as enzimas. Os leucócitos possuem diversas enzimas como a peroxidase e a esterase inespecífica, além desses constituintes enzimáticos há também os carboidratos e os lipídeos, que podem ser demonstrados por diferentes métodos citoquímicos

A presença de glicogênio e fosfatase alcalina em leucócitos têm sido associadas principalmente à fagocitose (TAVARES-DIAS, 2006; UEDA et al., 2001). A enzima lisossômica peroxidase participa da digestão intracelular e na modulação da atividade fagocítica em leucócitos (VALE et al., 2002; AZEVEDO; LUNARDI, 2003), enquanto que as esterases são enzimas envolvidas no processo de defesa celular, facilitando a diapedese (HAYHOE; QUAGLINO, 1994; CASALETTI-ROSA; LUNARDI, 1997). Além de tais substâncias, a análise ultraestrutural é de grande importância para o conhecimento dos constituintes celulares, complementando as informações sobre os constituintes citoquímicos das células envolvidos na resposta imunológica.

O presente estudo teve como objetivo principal comparar as características citoquímicas e ultraestruturais das células sanguíneas de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* coletadas do Arquipélago de Mariuá, estado do Amazonas, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Captura e aclimação dos animais

Dez indivíduos das espécies *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* foram capturados com rede de mão (rapiché) e lanterna de cabeça na comunidade do Daracuá que se situa dentro do Arquipélago de Mariuá, estado do Amazonas. Em seguida, os animais foram transportados para o Laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura (LAFAP) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus, Amazonas. As arraias foram aclimatadas em tanques com capacidade de 5000 litros, com oxigenação constante na proporção de seis arraias por tanque.

2.2. Coleta de sangue e colorações citoquímicas

Após 48 horas da aclimatação o sangue dos animais foi retirado por punção do vaso branquial com seringas contendo EDTA (10%), para as confecções de extensões sanguíneas. O comprimento total (CT), largura do disco (LD) e peso corpóreo foram determinados de cada animal analisado.

Para a demonstração do glicogênio foi utilizado o método do ácido periódico Schiff/PAS, com extensões sanguíneas controles expostas à digestão de amilase salivar durante 60 minutos. A reação de peroxidase foi demonstrada utilizando-se o método da orto-toluidina na presença ou ausência do peróxido de hidrogênio. Em todas essas reações as extensões foram submetidas à coloração nuclear com hematoxilina de Harris (TAVARES-DIAS, 2006).

Na reação de metacromasia as extensões sanguíneas foram fixadas durante 10 minutos em subaceto de chumbo 1% e, posteriormente, coradas em azul de toluidina 0,2% durante 50 minutos (TAVARES-DIAS, 2006). Para a coloração de lipídeos as extensões foram previamente fixadas com etanol 70% durante 5 segundos e, posteriormente, coradas com solução de Sudan Black B 0,3% (LISON, 1960). Na identificação das proteínas totais, as extensões sanguíneas foram fixadas em vapor de formol, coradas em azul de bromofenol durante 15 minutos, em seguida imersas em ácido acético a 0,5%, lavadas em tampão fosfato e desidratadas em álcool butílico (MAZIA et al., 1953).

Os reticulócitos foram identificados usando uma solução de azul de cresil brilhante e sangue (1:1), que foi homogeneizada, levada ao banho-maria durante 20 minutos a 37° C e corada com uma combinação de May Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS, 2006). Os resultados das colorações citoquímicas foram expressos em função da intensidade das reações citoquímicas: -, reação negativa; +, reação fraco-positiva; ++, reação positiva.

2.3. Análise ultraestrutural das células do sangue

Para a observação e caracterização das ultraestruturais celulares o sangue de quatro espécimes de cada uma das três espécies de arraias estudadas foi centrifugado durante 15 min a 750 g, para a obtenção dos pellets contendo eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Esses pellets foram imediatamente fixado em 0,1 M e pH de 7,4 em solução de cacodilato de sódio, contendo 2,5% de glutaraldeído e 2,0% de paraformaldeído (KARNOVSKY, 1965) durante 2,5 horas a

4 °C. Depois, as amostras foram imersas em 1% de tetróxido de ósmio 0,2 M pH 7,4 em solução de cacodilato de sódio, durante 1 hora a 4 °C. Após esses procedimentos, a amostra foram desidratadas e embebidas em resina araldite (Sigma/Aldrich) e seções foram cortadas em um Reichert ultratome de OMU3, montado em grades de cobre de malha 200 e coradas com solução de acetato de uranila 0,2% (WATSON, 1958) e em solução de citrato de chumbo por 15 minutos (REYNOLDS, 1963). As análises dos cortes feitos em microscópio eletrônico de transmissão (MET) foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Botucatu, São Paulo.

3. RESULTADOS

Os parâmetros biométricos de *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon motoro* são mostrados na Tabela 1. No sangue dessas três espécies de arraias foram identificados eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos com as mesmas características descritas por Oliveira et al. (2013).

Em relação às marcações citoquímicas em trombócitos e leucócitos, não foram observados diferenças entre as três espécies investigadas (Tabela 2). Houve marcação de glicogênio em trombócitos (Figura 1A-C) e heterófilos (Figura 1D-F), bem como reação fraco positiva em linfócitos (Figura 2A-C) e monócitos (Figura 2D).

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis biométricas de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* do Médio Rio Negro, Amazonas.

Espécies	Comprimento total (cm)	Largura do disco (cm)	Peso corpóreo (g)
<i>Potamotrygon</i> sp.	19,1 ± 2,5	17,4 ± 1,1	226,0 ± 48,5
<i>Potamotrygon motoro</i>	25,1 ± 3,1	20,4 ± 1,8	351,0 ± 65,0
<i>Paratrygon aiereba</i>	44,84 ± 13,95	29,29 ± 10,80	966,49 ± 856,90

Marcação sudanofília fraca-positiva foi observada em heterófilos (Figura 3A-B), em trombócitos (Figura 3C-D) e linfócitos (Figura 3E-H). A identificação positiva de proteínas, usando azul de bromofenol, ocorreu apenas nos grânulos de heterófilos (Figura 4A-D) e basófilos (Figura 4E-F). A presença de reticulócitos foi

observada em eritrócitos (Figura 5A-C) e indicam a presença de fragmentos de material reticular que não cora com a utilização de corantes tradicionais. Não foi observada reação positiva de peroxidase, entretanto foi constatada a reação da metacromasia (Figura 5D) que tem como característica o uso de um reagente azul, sendo a reação com a coloração vermelha no sangue dos sangues das arraias de água doce.

Tabela 2. Reações citoquímicas das células sanguíneas das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* do Médio Rio Negro, Amazonas.

Células	PAS			Peroxidase			Azul de toluidina			Sudan Black B			Azul de Bromofenol		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Trombócitos	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-
Linfócitos	+	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-
Monócitos	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterófilos	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
Basófilos	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	++

(1) *Potamotrygon* sp.; (2) *Potamotrygon motoro*; (3) *Paratrygon aiereba*

- Negativo; + fraco positivo; ++ positivo

Assim como nos aspectos citoquímicos as análises de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram um padrão conservador entre as arraias *Potamotrygon* sp, *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. Os trombócitos normalmente são fusiformes e ocasionalmente redondos, no citoplasma foram encontrados sistema canalicular, vesículas de tamanhos variados, canalículos de diferentes tamanhos, aglomerados de glicogênio e numerosas mitocôndrias (Figura 6A-B). Os linfócitos apresentaram formato amorfo, com citoplasma escasso, sendo observada a presença de vacúolos e poucas mitocôndrias (Figura 6C-D). Devido à escassez dos basófilos no sangue de potamotrigonídeos não foram possíveis localizar esse tipo de granulócito no presente estudo, os heterófilos (Figura 7A-B) apresentaram um número elevado de grânulos que podem ser de glicogênio, lipídios e proteínas, entretanto, não foi possível diferenciá-los.

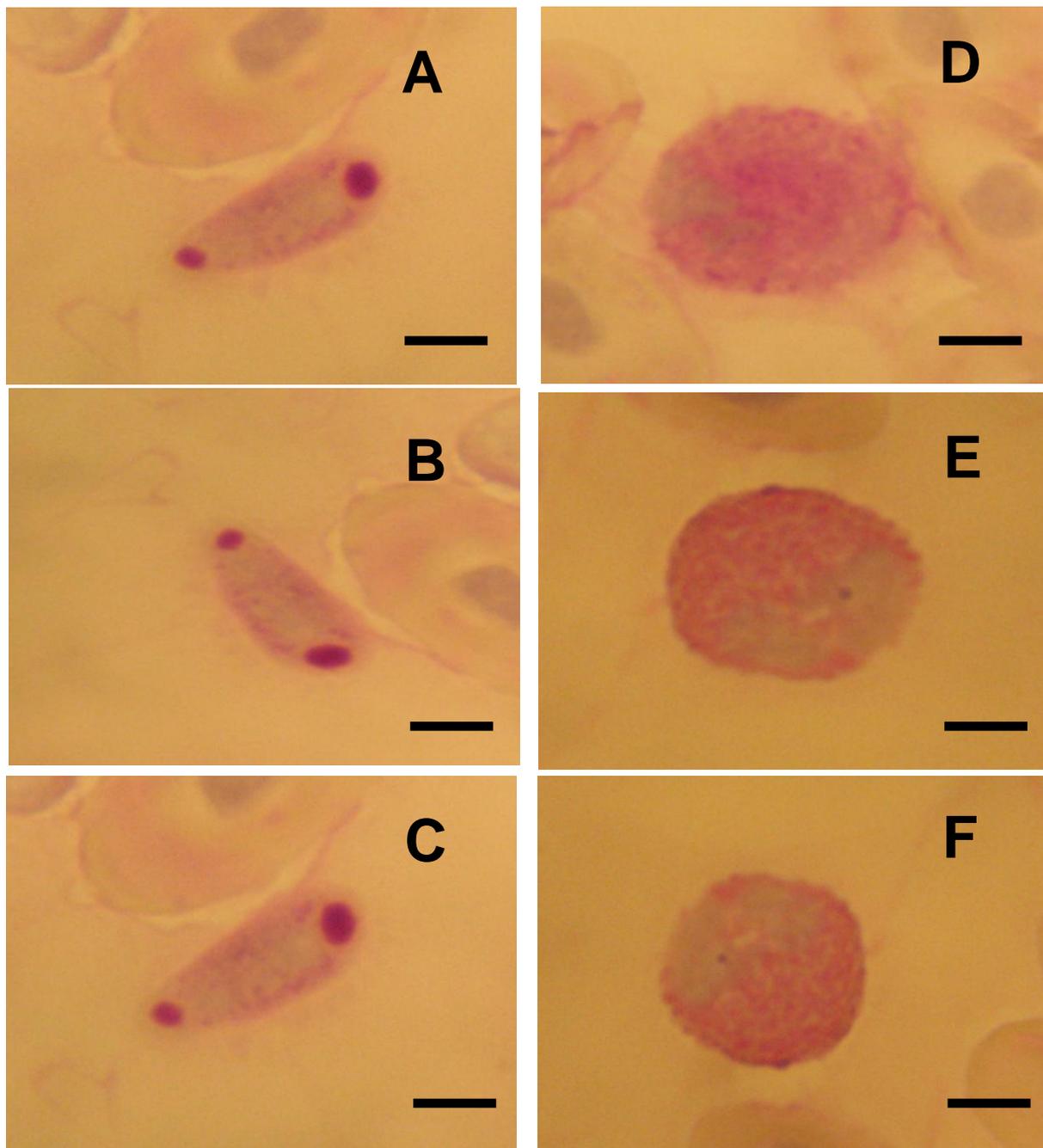


Figura 1A-F. Reação PAS para demonstração do glicogênio em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Trombócito de *Potamotrygon* sp.; (B) Trombócito de *Potamotrygon motoro*; (C) Trombócito de *Paratrygon aiereba*; (D) Heterófilo de *Potamotrygon* sp.; (E) Heterófilo de *Potamotrygon motoro*; (F) Heterófilo de *Paratrygon aiereba*. Barra de escala 8 μ m.

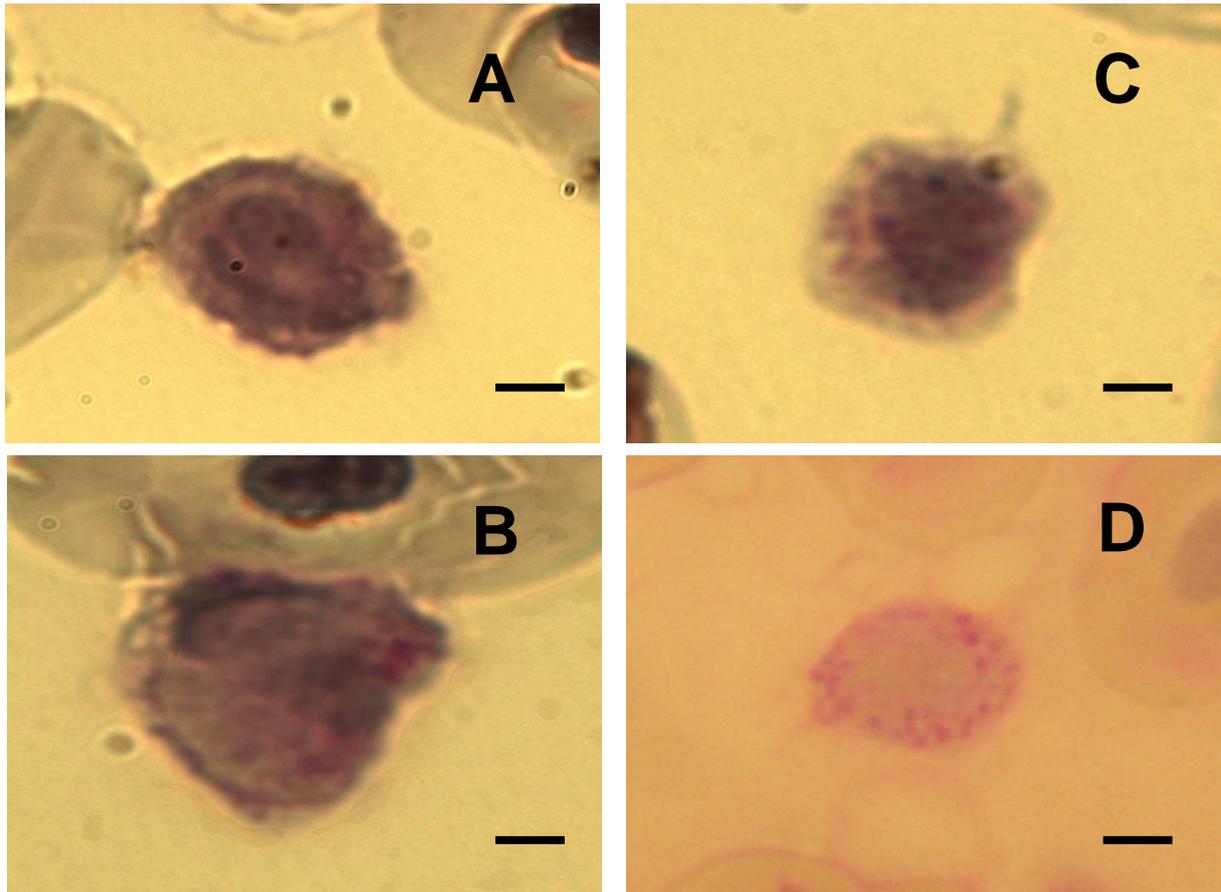


Figura 2A-D. Reação PAS-positiva para demonstração do glicogênio em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Linfócito de *Potamotrygon* sp.; (B) Linfócito de *Potamotrygon motoro*; (C) Linfócito de *Paratrygon aiereba*; (D) Monócito de *Potamotrygon motoro*. Barra de escala 8 μ m.

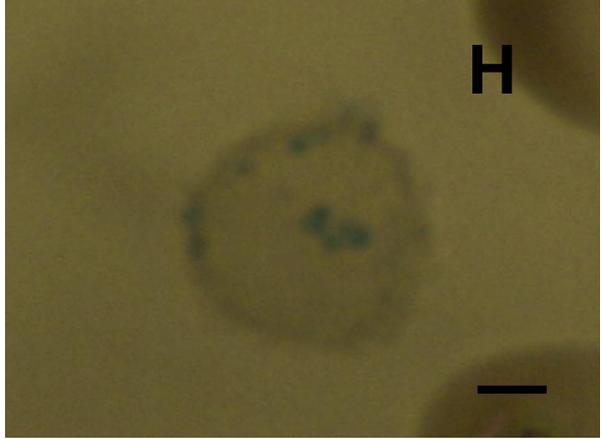
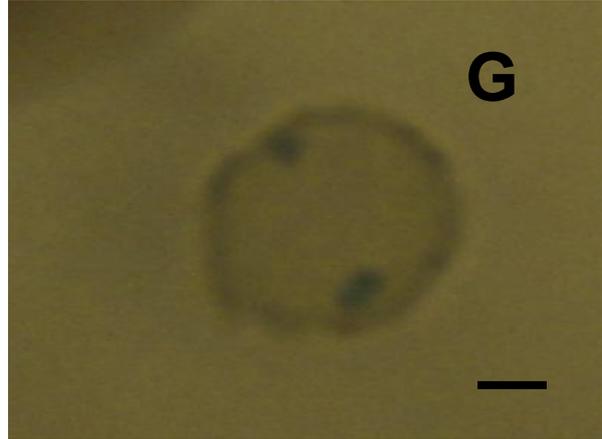
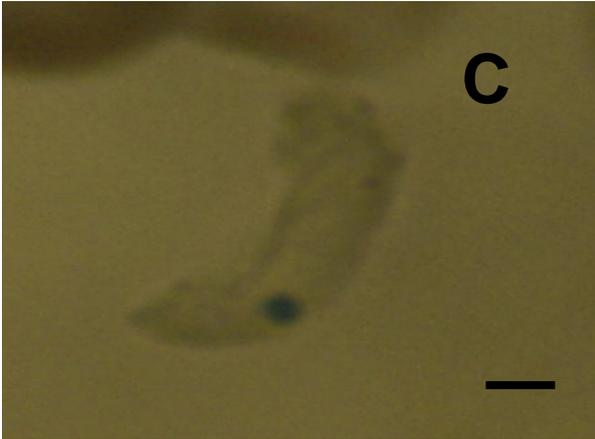
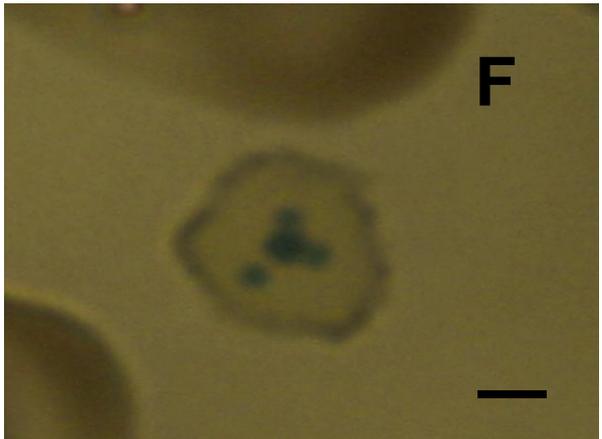
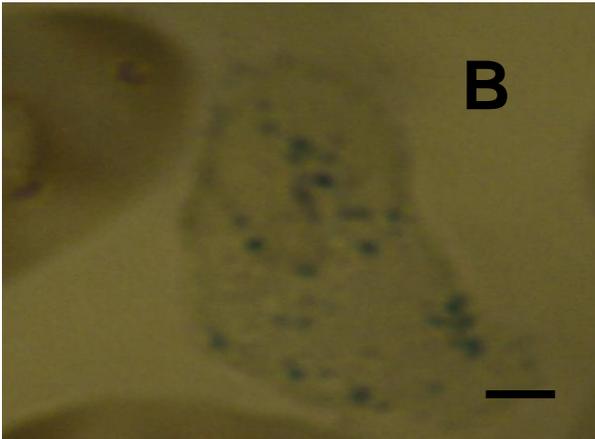
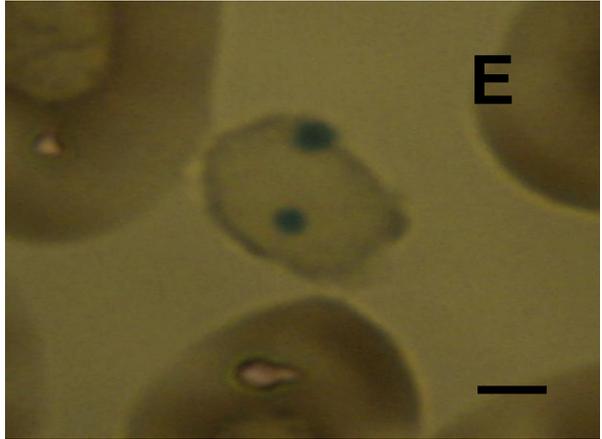
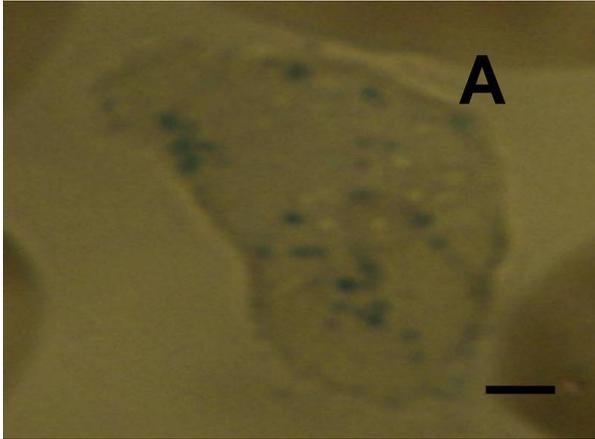


Figura 3A-H. Marcações citoquímicas de lipídios em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central, usando coloração com Sudan Black B. (A) Heterófilo *Potamotrygon* sp.; (B) Heterófilo de *Potamotrygon motoro*; (C) Trombócito de *Paratrygon aiereba*; (D) Trombócito de *Potamotrygon* sp.; (E, F) Linfócito de *Potamotrygon motoro*; (G) Linfócito de *Paratrygon aiereba*; (H) Linfócito de *Potamotrygon* sp.. Barra de escala 8 μ m.

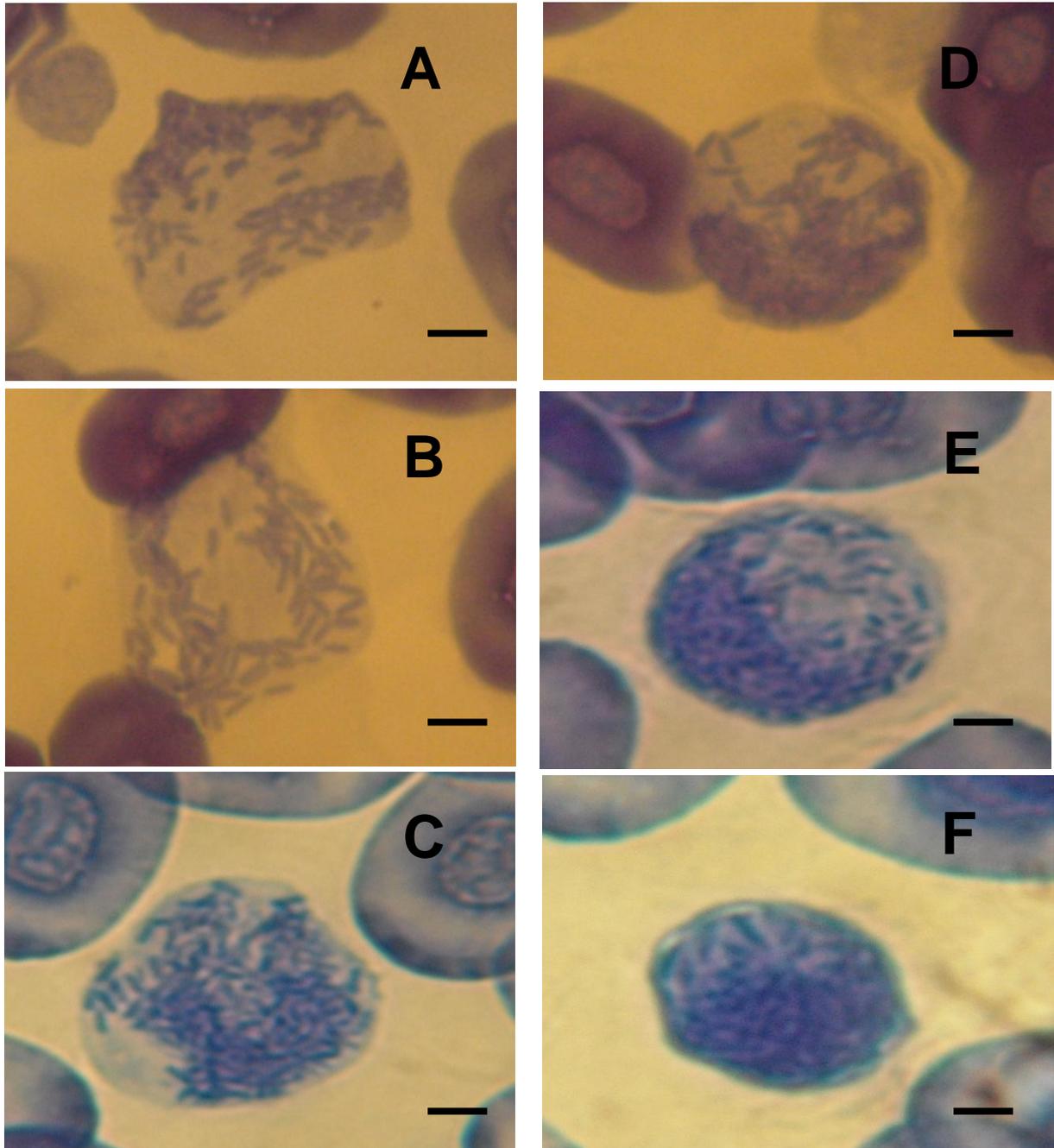


Figura 4A-F. Marcações citoquímicas de proteínas totais em células sanguíneas de arraias de água doce da Amazônia central, usando azul de bromofenol. (A, B)

Heterófilo de *Potamotrygon* sp.; (C) Heterófilo de *Potamotrygon motoro*; (D) Heterófilo de *Paratrygon aiereba*; (E) Basófilo de *Potamotrygon* sp.; (E) Basófilo de *Potamotrygon motoro*. Barra de escala 8 μ m.

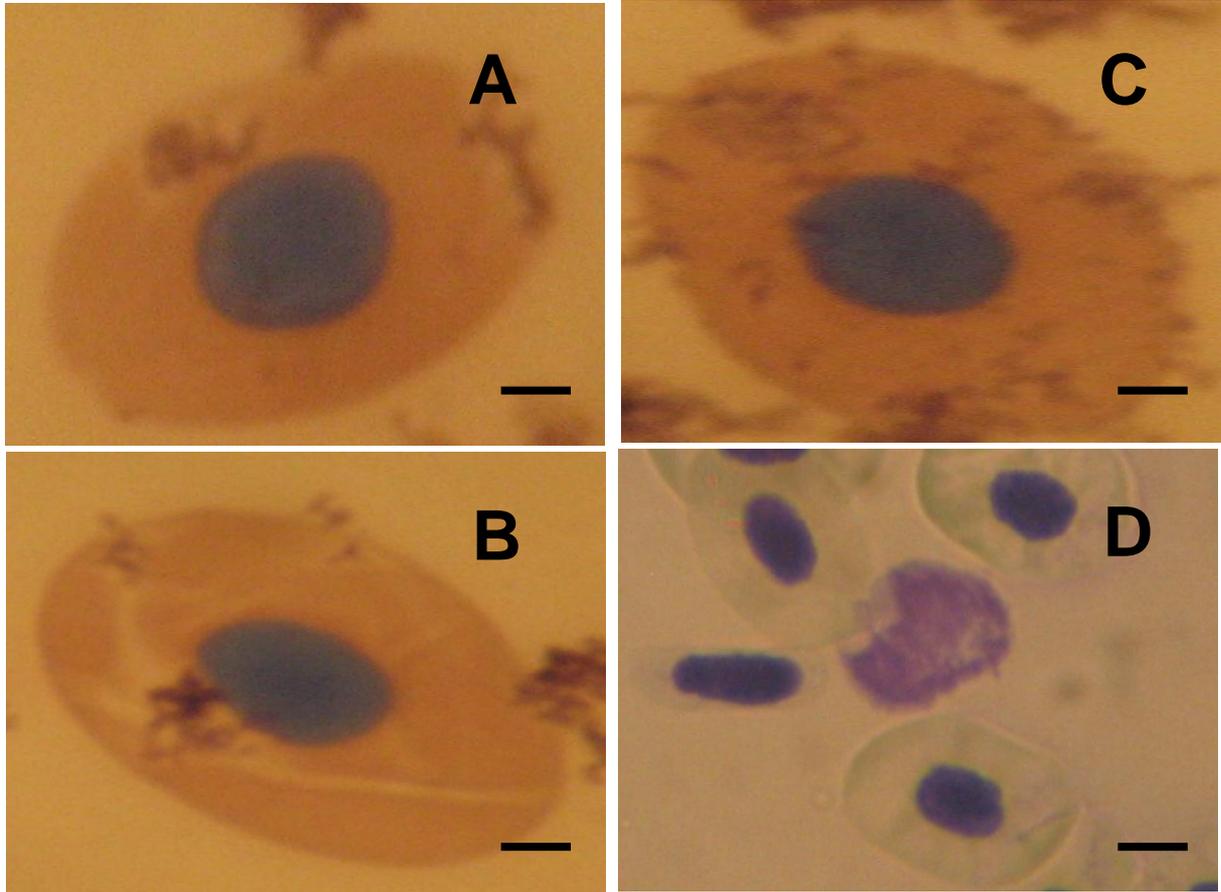


Figura 5A-D. Identificação de reticulócitos e de metacromasia em células do sangue de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Reticulócitos de *Potamotrygon* sp.; (B) Reticulócitos em *Potamotrygon motoro*; (C) Reticulócitos em *Paratrygon aiereba*; (D) Metacromasia em basófilo de *Potamotrygon* sp. Barra de escala 10 μ m.

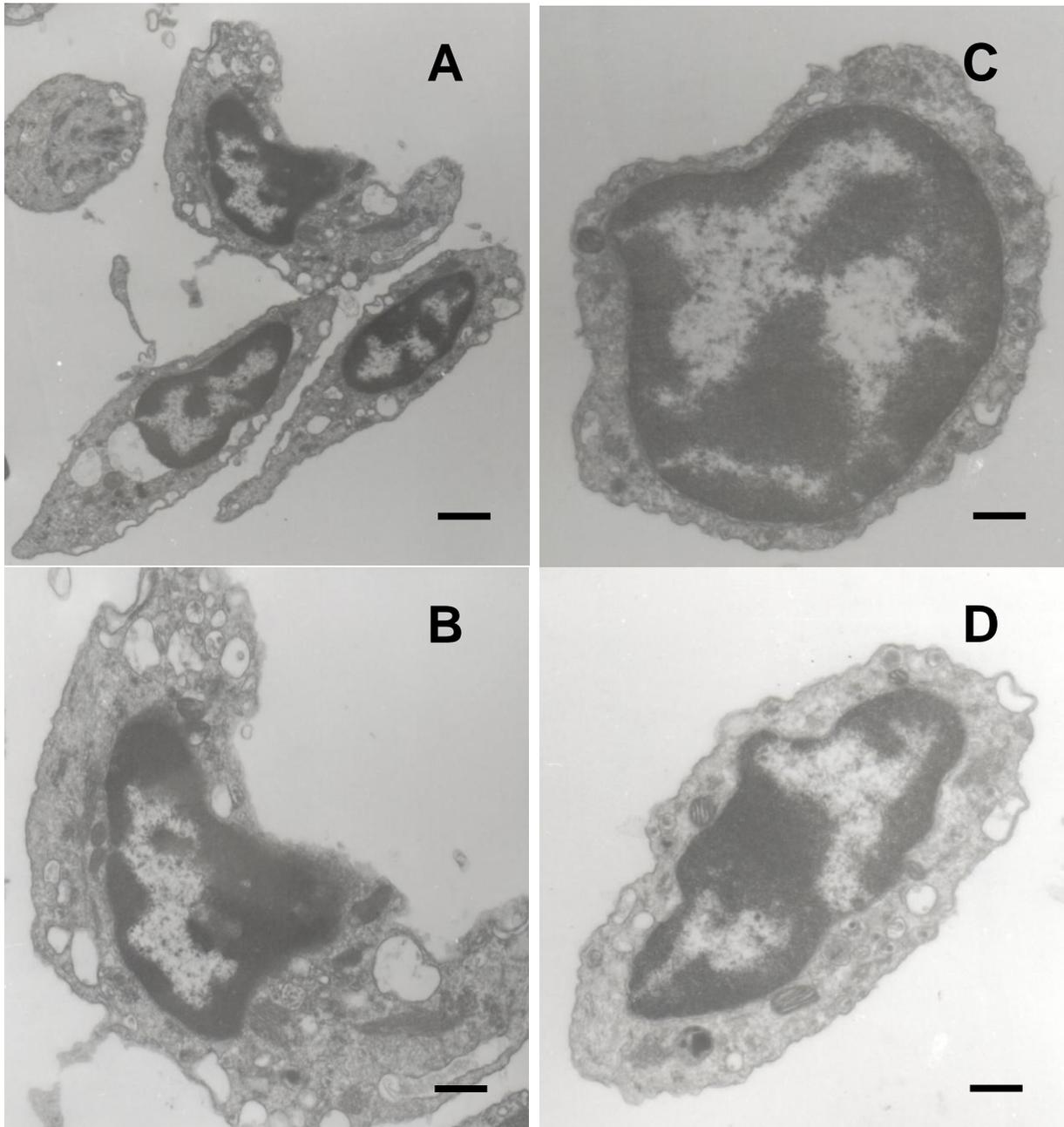


Figura 6A-D. Ultraestruturais das células sanguíneas de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Trombócitos de *Potamotrygon* sp.; (B) Trombócitos de *Potamotrygon motoro*; (C) Linfócitos de *Paratrygon aiereba*; (D) Linfócitos de *Potamotrygon* sp. Aumento de 4000 x.

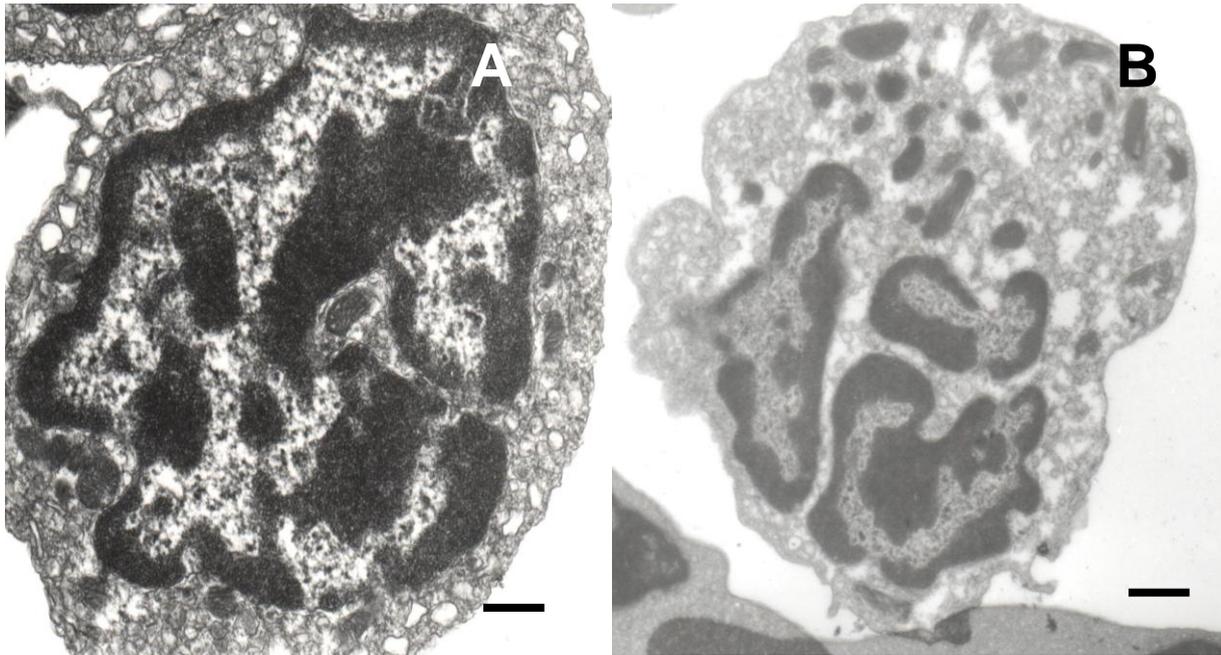


Figura 7A-B. Ultraestruturais das células sanguíneas de arraias de água doce da Amazônia central. (A) Heterófilo de *Potamotrygon* sp.; (B) Heterófilo de *Potamotrygon motoro*. Aumento de 4000 x.

4. DISCUSSÃO

A caracterização morfológica e morfométrica das células do sangue de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* foi estabelecida por Oliveira et al. (2013), que demonstraram a ocorrência de eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos nessas espécies. Porém, Pádua et al (2010) relataram a existência de neutrófilos e eosinófilos no sangue de um indivíduo de *Potamotrygon motoro*, bem como apontam dificuldades para diferenciar neutrófilos de heterófilos. No presente estudo, não foram encontrados neutrófilos, mas somente heterófilos, granulócitos com características morfológicas distintas dos neutrófilos. Porém, heterófilos possuem função similar aos neutrófilos, como por exemplo, atividade fagocítica, como demonstrados pela presença de glicogênio e presença de lipídeos e proteínas em heterófilos das três espécies de arraias amazônicas. O glicogênio é uma importante fonte de reserva energética celular para os mecanismos de defesa inata que ocorrem especialmente durante o processo de fagocitose (UEDA et al., 2001; TAVARES-DIAS, 2006).

Reação PAS-positiva também ocorreu em trombócitos de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*, mas uma fraca reação positiva também em linfócitos e monócitos. Os trombócitos são células que atuam nos processos de coagulação sanguínea (HAYHOE; QUAGLINO, 1994), mas que representam um papel relevante também na atividade de imune (TAVARES-DIAS, 2006).

Diversos estudos citoquímicos foram conduzidos em leucócitos de diferentes espécies de peixes teleósteos (CAXTON-MARTINS, 1979; ZINKL et al., 1991; TAVARES-DIAS, 2006) e demonstram a falta de uniformidade na nomenclatura dos granulócitos. Em Chondrichthyes, Hine e Wain (1988) estudaram tais células em quimeras *Callorhynchus milii*, *Chimaera phantasma*, *Hydrolagus novaezelandiae*, *Hydrolagus* sp., *Harriotta raleighana* e *Rhinochimaera pacifica*, descreveram que a enzima esterase desses holocefalos são muito diferentes das encontradas em elasmobrânquios. Para espécies de potamotrigonídeos este é o primeiro estudo visando à determinação das funções dos tipos celulares sanguíneos.

Não foi observada reação de peroxidase em qualquer célula do sangue das três espécies de arraias. Em heterófilos de *Carassius auratus* também não ocorreu reação peroxidase-positiva (ZINKL et al., 1991). A peroxidase é uma importante enzima lisossômica que participa na digestão intracelular e uma das suas principais características é a marcação em eosinófilos e neutrófilos, granulócitos ausentes nas espécies de arraias de água doce aqui estudadas. Em algumas espécies de teleósteos, a ausência da peroxidase parece estar acompanhada do desenvolvimento compensatório de outros componentes antibacterianos como, por exemplo, as proteínas catiônicas (TAVARES-DIAS, 2006; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007).

Como os basófilos são leucócitos pouco frequentes no sangue de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* por meio da reação positiva de metacromasia foi possível confirmar a existência desse tipo de granulócito. Além disso, nesses potamotrigonídeos foi demonstrado a presença de lipídios em trombócitos e linfócitos, mas em menor intensidade nos heterófilos. Similarmente, em *Xiphophorus helleri* reação sudanofílica foi também encontrada em linfócitos e monócitos (SCHÜTT et al., 1997). Porém, em outros teleósteos essa reação tem sido descrita nos grânulos de neutrófilos (ZINKL et al. 1991; VEIGA et al., 2000). Os leucócitos fagocíticos podem utilizar lipídios como fonte de energia,

degradando tais constituintes por atuação das enzimas citoplasmáticas (LORENZI, 1999).

Neste estudo, reação por azul de bromofenol foi observada nos grânulos de heterófilos e basófilos, indicando a presença de proteínas gerais. Pádua et al. (2010) também observaram reação positiva em basófilos, eosinófilos e neutrófilos de *Potamotrygon motoro*. Em tartarugas amazônicas, reação positiva para azul de bromofenol foi relatada em heterófilos e basófilos (OLIVEIRA et al., 2011). A função das proteínas nos grânulos dos leucócitos está associada à defesa contra microrganismos, provocando sua morte quando são liberadas após a ruptura dessas células.

Em potamotrigonídeos deste estudo, foram observados reticulócitos, revelado pela presença de ribonucleoproteína no interior de alguns eritrócitos. Quantidades elevadas de ribonucleoproteínas indicam liberação prematura dos eritrócitos na corrente sanguínea (TAVARES-DIAS, 2006). Portanto, a quantificação do número de reticulócitos circulantes pode fornecer informações sobre a atividade eritropoiética e conseqüentemente sobre o estado de saúde dos animais.

A análise ultraestrutural dos trombócitos do sangue de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* mostraram que essas células são ricas em organelas citoplasmáticas. Tal característica foi também relatada para *Brycon orbignyanus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006) e *Ictalurus punctatus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007). As características ultraestruturais dos linfócitos de arraias de água doce foram similares às descritas para *B. orbignyanus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006) e *Ictalurus punctatus* (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007).

5. CONCLUSÃO

Este estudo reforça a existência de eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos no sangue das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. A composição citoquímica revelou que os heterófilos são os granulócitos de maior importância no sistema imunológico desses potamotrigonídeos, uma vez que apresentaram glicogênio, lipídios e proteínas básicas, sendo estas substâncias diretamente relacionadas à atividade fagocítica. Os aspectos ultraestruturais revelam que trombócitos e principalmente os heterófilos são células ricas em organelas citoplasmática, além do mais existe um

padrão conservador nos aspectos ultraestruturais das células das arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. As informações aqui obtidas servem de comparação para essas espécies em outros ambientes, bem como em situações adversas tais como estresse ou doenças infecciosas ou parasitárias.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processos 925/03, 2203/05, 2204/05, 2459/08 e 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 486289/2006-0, 40872/2006-4 e 408795/2006-9). O autor principal agradece a concessão da bolsa de Doutorado fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. 171 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA, Manaus, 1998.
- AZEVEDO, A.; LUNARDI, L.O. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of turtle (*Chrysemys dorsalis*). Acta Histochemica, 105, 99-105, 2003.
- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, Uréia e Conteúdo de Oxigênio no Sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). 67 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 1997.
- CASALETTI-ROSA, L.; LUNARDI, L.O. Comparative study of the localization of nonspecific esterase activity (Naphthyl butyrate) in leucocytes from reptiles, birds and fish. Brazilian Journal of Morphology Science 14, 72, 1997.
- CAXTON-MARTINS, A.E. Cytochemical studies of cell population in peripheral blood smears of two west African teleosts. Journal Anat, 128:2, 269-276, 1979.
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. Journal Aquatic of Science 7, 62-90, 1995.
- DUNCAN, W.P.; INOMATA, S.O.; FERNANDES, M.N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010.
- HAYHOE, F.G.J.; QUALIGNO, D. Haematological Cytochemistry. London: Churchill Livingstone, 1994.
- HINE, P.M.; WAIN, J.M. The enzyme cytochemistry of leucocytes in blood and haematopoietic tissues of holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 22:57-62, 1988.

- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27, 137-138, 1965.
- LISON, L. Lipides et lipoproteins. Paris: Gauthier Villars. 184 p, 1960.
- LORENZI, T.F. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo: MDSI. 641p, 1999,
- MAZIA, D.; BREWER, P.A.; ALFERT, M. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.*, v. 104, 57-67, 1953.
- OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, W.R.; PANTOJA-LIMA, J.; ARAÚJO, S.B.; ARAÚJO, M.L.G.; MARCON, J.L.; TAVARES-DIAS, M. Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. *Veterinarski Arhiv*, 81(5): 657-670, 2011.
- OLIVEIRA, A.T. Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e estruturais das células sanguíneas de três espécies de arraia de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas, Brasil. 202 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2013.
- PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M. Características morfológicas, morfométricas e citoquímicas das células sanguíneas da arraia ocelada *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii, Potamotrygonidae): estudo de caso. *Ensaio e Ciência*, 14(1): 147-158, 2010.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-215, 1963.
- SCHÜTT, D.A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *Journal Applied Ichthyology*, 14:83-89, 1997.
- TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 68, 1822–1833, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 38: 209-215, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1): 49-54, 2007.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277, 2001.
- VALE, A.; AFFONSO, A.; SILVA, M.T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 183-198, 2002.
- VEIGA, M.L.; EGAMI, M.I.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18(2): 245-250, 2000.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 475-478, 1958.

ZINKL, J.G.; COX, W.T.; KONO, C.S. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative haematology international*, 1:187-195, 1991.

CAPÍTULO 6

Parâmetros hematológicos, aspectos físicos e químicos da água de três espécies de arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Médio Rio Negro, estado do Amazonas

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Carmel do Nascimento Pereira², Marcio Quara Carvalho Santos³, Maria Lúcia Góes de Araújo⁴, Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos⁵, Rejane Souza de Aquino Sales⁶, Paulo Henrique Aride Rocha⁷, Jackson Pantoja-Lima⁸, Elizabeth Gusmão Affonso⁹, Jaydione Luiz Marcon¹⁰, Marcos Tavares-Dias¹¹

1. Biólogo, Doutor em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
2. Graduanda em Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM
3. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Escola Estadual Sólon de Lucena, Manaus, AM
4. Oceanógrafa, Doutora em Diversidade Biológica, Pesquisadora da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.
5. Biólogo, Mestre em Diversidade Biológica, Professor da Faculdade Metropolitana de Manaus (FAMETRO), Manaus, AM.
6. Engenheira Agrônoma, Mestre em Agricultura no Trópico Úmido, Técnica de Laboratório da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM
7. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
8. Engenheiro de Pesca, Doutor em Ecologia, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
9. Farmacêutica, Doutora em Aqüicultura, Pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM.
10. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), Macapá, AP
11. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo estudar comparativamente a hematologia e os parâmetros físicos e químicos dos locais de ocorrência de indivíduos neonatos, jovens, subadultos, adultos machos, adultos fêmeas e fêmeas prenhas das espécies *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. Nas arraias cururus os indivíduos neonatos apresentam parâmetros referentes à série vermelha inferior as demais classes de desenvolvimento. Nos aspectos referentes ao trombograma e ao leucograma, houve um padrão conservador entre o estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e estágio de prenhas. Em *P. motoro* e em *P. aiereba* as variáveis referentes ao hemograma, a bioquímica e o leucograma, apresentaram poucas variações entre os aspectos biológicos da espécie, demonstrando que estas variáveis não são bons critérios para diferenciar-las dentro da mesma espécie. Em relação às características físicas e químicas das águas dos locais de ocorrências das arraias cururus foi possível determinar que neonatos tem uma preferência por águas menos ácidas, por outro lado os jovens preferem águas mais frias e com baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Nas arraias *P. motoro* e *P. aiereba* não houve diferenças entre o estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual ou prenhas, nos aspectos físicos e químicos da água dos locais de ocorrências desses potamotrigonídeos. Em conclusão, na arraia cururu o estágio de desenvolvimento é um fator importante para diferenciar as propriedades hematológicas bem como as propriedades da água, portanto, deve-se ter cuidado ao fazer comparações com outras espécies. Entretanto nas arraias *P. motoro* e *P. aiereba* essa característica biológica não exerce influência tanto sobre as características hematológicas quanto sobre as características da água. Ao confrontar os aspectos hematológicos e as características da água entre as arraias *Potamotrygon* sp, *P. motoro* e *P. aiereba*, pode-se observar um caráter conservador entre as espécies, principalmente sobre as características do leucograma e trombograma. Em relação às propriedades da água apenas indivíduos subadultos e prenhas possuem diferenças nas propriedades da água, esses resultados ressaltam que dentro de uma mesma bacia a hematologia e as propriedades físicas e químicas da água não são diferenciadas entre as arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*, oriundas do Arquipélago de Mariuá, Amazonas.

Palavras-chave: hematologia, ontogenia, potamotrigonídeos, dimorfismo sexual, prenhas, comparativo, água

ABSTRACT

This work has the objective to study hematology, physical and, chemical parameters of the local occurrence of individuals neonates, young, subadult, adult males, adult females and pregnant females of the species *Potamotrygon* sp. (stingray cururu), *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*. In stingrays cururus individuals newborns have parameters for red series below the other classes of development. Aspects relating to thrombogram and the leukogram, there was a conservative standard between the stage of development, and sexual dimorphism stage pregnant. In *P. motoro* and *P. aiereba* variables on blood count, biochemistry and leukogram showed little variation among biological species, demonstrating that these variables are not good criteria to differentiate them within the same species. Regarding the physical and chemical characteristics of the waters of the local occurrences of stingrays cururus was determined that neonates have a preference for less acidic waters, on the other hand young people prefer cooler water with low dissolved oxygen concentrations. In stingrays *P. motoro* and *P. aiereba* no

differences between the stage of development, sexual dimorphism or pregnant, the physical and chemical aspects of water from local occurrences of these potamotrigonids. In conclusion, the stingray cururu stage of development is an important factor to differentiate hematologic properties and the properties of water, so you must be careful when making comparisons with other species. However stingrays in *P. motoro* and *P. aiereba* biological trait does not influence much on the characteristics of hematological and water features. When we compare the hematological aspects and characteristics of water between the stingrays *Potamotrygon* sp, *P. motoro* and, *P. aiereba*, one can observe a conservative character between species, mainly on the characteristics of the leukogram and trombogram. Regarding the properties of water only subadult and pregnant individuals have differences in the properties of water, these results confirmed that within the same basin hematology and physical and chemical properties of water are not differentiated between the stingrays *Potamotrygon* sp., *P. motoro* and, *P. aiereba*, coming from the Archipelago Mariuá, Amazonas.

Keywords: hematology, ontogenic, potamotrigonídeos, sexual dimorphism, pregnancy, comparative, water

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente a investigação dos parâmetros do sangue em peixes tem sido utilizada para se determinar estresse e patologias (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS; MORAES, 2006; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007a; PAVLIDIS et al., 2007). O eritrograma pode ser usado para diagnosticar anemia, bem como para caracterizar as distintas estratégias em populações de peixes, no que refere-se à demanda metabólica por oxigênio (WILHELM FILHO et al., 1992), além de ser o principal indicador sobre as distintas estratégias fisiológicas adaptativas relacionadas às variações ambientais (VAL et al., 1992; ALMEIDA-VAL et al., 1999). O perfil bioquímico plasmático é também uma importante ferramenta biológica para se avaliar de situações de estresse, dieta e regulação de íons corpóreos.

Em peixes, uma das maneiras mais simples de avaliar o sistema imunológico dos peixes é a avaliação das alterações quantitativas e qualitativas dos leucócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007; PAVLIDIS et al., 2007). Outra importante contribuição da análise dos parâmetros hematológicos, embora pouco utilizada, é o auxílio dessa ferramenta nas relações sistemáticas entre espécies (PAVLIDIS et al., 2007).

Um aspecto característico dos peixes é a ampla variação nos parâmetros sanguíneos (PARMA-CROUX, 1994; KORI-SIAKPERE et al., 2005), em geral

atribuídas a fatores tais como variação genética, estado nutricional, sexo, idade, estresse de captura, procedimentos de manipulação e amostragem sanguínea (HRUBEC et al., 2001; KORI-SIAKPERE et al., 2005; SVOBODOVÁ et al., 2008). Embora a hematologia seja uma ferramenta útil, tem sido pouco usada para espécies em seu ambiente natural (KORI-SIAKPERE et al., 2005), principalmente, em arraias de água doce da América do Sul. Tais estudos concentram-se em elasmobrânquios marinhos. Porém, as informações sobre parâmetros sanguíneos de arraias *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* permitirão o estabelecimento de valores de referências para essas potamotrigonídeos de grande importância sócio-econômica para a região Norte do Brasil, seja como peixe ornamental ou para alimentação (DUNCAN et al., 2010).

O presente trabalho teve por objetivo estudar comparativamente a hematologia, parâmetros físicos e químicos dos locais de ocorrência de *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* em diferentes estágio de desenvolvimento (neonatos, jovens, subadultos, adultos machos, adultos fêmeas e fêmeas prenhas) do Arquipélago de Mariuá, Estado Amazonas, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O arquipélago de Mariuá é considerado o maior conjunto de ilhas de água doce do mundo, com um total de aproximadamente 1.600 ilhas que abriga uma rica biodiversidade de peixes ornamentais, incluindo as arraias *Potamotrygon* sp (arraia cururu), *P. motoro* e *P. aiereba*. As águas desse arquipélago têm coloração preta e são banhadas pelo médio Rio Negro, que apresentam como característica o baixo pH, baixas concentrações de oxigênio dissolvido e de íons, o que determina águas com baixa condutividade elétrica e reflete a escassez de compostos nitrogenados e elementos alcalinos e alcalinos terrosos (DUNCAN et al., 2009; CHAO et al. 2001; SOUZA et al. 2006). As arraias foram capturadas nos vários habitats desse deste arquipélago, que fica localizado nas proximidades do município de Barcelos, Amazonas, Brasil. Todos os animais foram capturados com breve autorização (Licença N^o 15116-1) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

2.2. Espécies alvos

Três espécies de arraias de água doce foram escolhidas para serem investigadas no presente estudo, são elas: *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. A arraia *Potamotrygon* sp. é a principal espécie ornamental de potamotrigonídeos, sendo responsável por aproximadamente 50% das exportações (IBAMA, 2008). Essa arraia apresenta pequeno porte e pode atingir no máximo 45 cm de largura do disco. É uma espécie ainda em processo de descrição científica, mas com sua identificação bem definida. A arraia cururu apresenta segregação sexual com ciclo reprodutivo anual e regulado pelo nível do rio, envolvendo a cópula na vazante e parto na seca (ARAÚJO, 1998). Sua distribuição é endêmica e restrita ao médio Rio Negro, ocorrendo em ambientes de liteira, com baixo fluxo de água e correnteza, típicos das áreas marginais de igapó (BARCELLOS, 1997; ARAÚJO, 1998).

A segunda espécie de arraia de maior representatividade no mercado internacional é *P. motoro*, responsável por 30% das exportações (IBAMA, 2008). Com ampla distribuição pela bacia Amazônica (CARVALHO et al., 2003), essa espécie atinge tamanho de 70 cm e possui segregação sexual. A espécie apresenta ciclo reprodutivo anual com período de cópula na seca, gravidez na enchente e parto no início da cheia. Durante esse período existe disputa de machos por fêmeas adultas para a cópula (Araújo, comunicação pessoal). Seu habitat compreende áreas com fundo lamacento, onde existe a influência mais visível do fluxo de água (observação pessoal).

Além dessas espécies, *Paratrygon aiereba* também tem importância comercial no estado do Amazonas. Possui grande porte, atingindo até 130 cm de largura do disco e chegando a pesar mais de 60 Kg. Apresenta segregação sexual e segregação espacial por tamanhos, na qual jovens e subadultos de ambos os sexos tendem a ficar agregados na mesma área. Por outro lado, machos e fêmeas adultas encontram-se isolados em diferentes áreas (ARAÚJO, 1999; CHARVET-ALMEIDA et al, 2005). Esta espécie apresenta distribuição ampla ao longo da bacia Amazônica, sendo predominantemente explorada pela pesca comercial. Seu habitat preferencial se constitui de regiões de praias, com pouca intensidade de corrente de água (observação pessoal). Na bacia do rio Tapajós vem sendo observada redução dos estoques naturais dessa espécie, devido à exploração pesqueira em larga

escala para obtenção de filé (Araújo, comunicação pessoal). No estado do Amazonas, alguns frigoríficos localizados no município de Iranduba também têm intensificado a compra desses animais para o processamento e comercialização de filés congelados, sem nenhum controle na exploração desse pescado. Esse cenário preocupa e desperta a necessidade de planos de manejo adequados para a conservação desse grupo de elasmobrânquios oriundos da América do Sul (CARVALHO et al., 2003).

2.3. Captura, classificação etária dos animais e coleta sangüínea

No período de dezembro de 2006 a outubro de 2010, 10 coletas de campo foram realizadas com auxílio de rede de mão (rapiché), lanterna de cabeça e remo. Um total de 357 arraias *Potamotrygon* sp. (28 neonatos, 10 jovens, 76 subadultos e 243 adultos; sendo 129 machos e 114 fêmeas das quais 29 estavam prenhas), 65 arraias *Potamotrygon motoro* (3 neonatos, 48 jovens, 3 subadultos e 11 adultos, sendo 8 machos e 3 fêmeas das quais uma estava prenha) e 48 arraias *Paratrygon aiereba* (9 neonatos, 16 jovens, 20 subadultos e 3 adultos, sendo 1 macho e duas fêmeas, das quais uma estava prenha) foram coletadas.

Após a captura os animais foram imediatamente anestesiados com Eugenol (0,2 g/L) e os procedimentos de manuseio e coleta sangüínea seguiram as recomendações de Oliveira et al., (2012). O anticoagulante utilizado para a coleta sangüínea foi o EDTA 10%, os animais foram classificados de acordo com o dimorfismo sexual e as fêmeas diferenciadas pela ausência ou presença da gestação. A classe de tamanho foi determinada a partir da largura do disco/LD, nas arraias *Potamotrygon* sp. a classificação (neonatos, $LD \leq 9,0$ cm; jovens, $9,0 < LD \leq 12,0$ cm; subadultos, $12,0 < LD < 16,0$ cm; adultos, $LD \geq 16,0$ cm) seguiu as recomendações de Araújo (1998), nas arraias *P. motoro* (neonatos, $LD \leq 14,0$ cm; jovens, $14,1 < LD \leq 35,0$ cm; subadultos $35 < LD \leq 40$; adultos, $LD > 40,0$ cm) foi seguida as recomendações de Araújo (1999) e nas arraias *P. aiereba* (neonatos, $LD \leq 22,0$ cm; jovens, $22,0 < LD \leq 30,0$ cm; subadultos, $30,0 < LD \leq 51,0$ cm; adultos, $LD > 51,0$ cm) foram seguidos as recomendações de Araújo (2011). Fêmeas prenhas foram identificadas conforme recomendações de Araújo (1998). O dimorfismo sexual foi estabelecido em observação macroscópica usando a presença

(machos) ou ausência (fêmeas) do cláspes. Após todos estes procedimentos e recuperadas da anestesia, todas as arraias foram devolvidas para seus respectivos locais de captura.

2.4. Parâmetros sanguíneos e métodos de análise

O sangue coletado foi dividido em duas alíquotas, uma para a determinação do eritrograma, leucograma e trombograma, e outra para obtenção do plasma e posterior dosagem dos constituintes bioquímicos. A contagem de eritrócitos (RBC) foi feita em câmara de Neubauer após diluição em solução de formol-citrato, o hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito e a concentração de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina. A partir desses dados foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas seguindo as recomendações de Oliveira (2008) e usadas para m utilizadas para a contagem de leucócitos e trombócitos totais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006), bem como para a contagem diferencial dos leucócitos que se baseia na contagem de 200 tipos leucocitários de interesse.

O plasma foi obtido após centrifugação a 750 G, este foi congelado em nitrogênio líquido (-86°C) até o momento das análises bioquímicas. As concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais e uréia foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos quantificados por kits comerciais (Doles, GO, Brasil) específicos para cada parâmetro. A dosagem dos íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram analisados por fotometria de chama (Micronal b462, Brasil) e os níveis de cloreto (Cl⁻) por método colorimétrico usando kit comercial (Doles, GO, Brasil).

2.5. Análise da água

Amostras de água para a avaliação das propriedades físico-químicas, como temperatura (°C), pH, condutividade (µS/cm) e oxigênio dissolvido (mg/L),

foram determinados no local de captura de cada animal, utilizando-se aparelho digital multi-paramétrico. Amostras de águas foram coletadas e armazenadas em gelo e posteriormente transportadas a laboratório para análise de outros parâmetros, como dureza (mg/L), alcalinidade (mg/L), amônia total (mg/L) e nitrito (mg/L), seguindo metodologia previamente descrita por Boyd; Tucker (1992). Os níveis de sódio (mEq/L) e potássio (mEq/L), foram analisados em amostras de água preservadas e refrigeradas trazidas do campo para análise por fotometria de chama (BOYD; TUCKER, 1992), utilizando o aparelho Micronal B 462.

2.6. Análise estatística

Para exclusão dos *outliers* foi empregado o teste estatístico Steam and life, posteriormente o teste de normalidade também foi empregado para averiguação da normalidade dos dados. Quando os dados apresentaram normalidade foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA) para comparação dos seguintes grupos (neonatos, jovens, subadultos, machos adultos, fêmeas adultas e prenhas). Quando os dados não apresentaram normalidade o teste de Mann-Witney foi empregado. Após a divisão pelo dimorfismo sexual, do estado de prenhas e das fases do desenvolvimento, foram comparados estatisticamente pelo teste de ANOVA ou de Kruskal Wallis (KW) entre as três espécies investigadas. Os resultados estatísticos foram expressos em média e desvio padrão (DP), sendo que todos os testes estatísticos aplicados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os valores médios e desvio padrão das medidas biométricas de neonatos, jovens, subadultos, machos adultos, fêmeas adultas e fêmeas prenhas das arraias *Potamotrygon* sp. são mostrados na Tabela 1, em *Potamotrygon motoro* na Tabela 2 e em *Paratrygon aiereba* na Tabela 3.

Os parâmetros hematológicos das arraias *Potamotrygon* sp. (Tabela 4), *Potamotrygon motoro* (Tabela 5) e *Paratrygon aiereba* (Tabela 6) envolvendo o estágio de desenvolvimento, o dimorfismo sexual e o estado de prenhas, apresentaram elevado desvio padrão, principalmente nos compostos bioquímicos, leucograma e trombograma. .

Os neonatos de *Potamotrygon* sp. mostraram valores da série vermelha inferiores as demais classes de desenvolvimento, como também dos níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol. Porém, não houve diferenças quanto ao trombograma e leucograma, (Tabela 4).

Para *P. motoro* (Tabela 5) e *P. aiereba* (Tabela 6) o hemograma e a bioquímica sanguínea apresentaram poucas variações entre as diferentes fases do desenvolvimento dos animais, indicando que tais variáveis não são critérios adequados para diferenciar essas fases de vida desses animais.

Em relação às características físicas e químicas das águas dos locais de ocorrência das arraias cururus foi possível determinar que neonatos tenham uma preferência por águas menos ácidas, por outro lado os jovens preferem águas mais frias e com baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Tabela 7). Nas arraias *P. motoro* e *P. aiereba* não houve diferenças para os estágios de desenvolvimento, dimorfismo sexual ou prenhes no que se refere aos parâmetros físicos e químicos da água no ambiente de ocorrências desses animais (Tabela 8 e 9). Ademais, os resultados das comparações hematológica por meio dos testes estatísticos empregados no presente estudo encontram-se na Tabela 10 e a comparação dos parâmetros físicos e químicos da água encontram-se na Tabela 11.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) entre espécimes neonatos, jovens, subadultos e adultos (machos, fêmeas e prenhas) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Dados biométricos	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 28	N= 10	n= 76	Machos n= 129	Fêmeas n= 85	Prenhas n= 29
Largura do disco (cm)	8.06 \pm 0.84	11.16 \pm 0.75	14.36 \pm 0.91	19.51 \pm 2.53	20.29 \pm 3.13	22.57 \pm 3.14
Comprimento total (cm)	15.85 \pm 1.89	19.40 \pm 1.45	25.04 \pm 2.12	31.84 \pm 3.68	32.56 \pm 5.25	35.57 \pm 3.76
Peso (g)	35.26 \pm 10.76	79.10 \pm 13.17	154.71 \pm 52.34	418.60 \pm 157.92	493.71 \pm 268.24	625.34 \pm 311.82

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de *P. motoro* entre espécimes neonatos, jovens e adultos (machos, e fêmeas oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil).

Dados biométricos	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 3	n= 48	n= 3	Machos n= 8	Fêmeas n= 2	Prenhas n= 1
Largura do disco (cm)	12.87 \pm 1.62	23.95 \pm 4.85	38.00 \pm 1.73	48.31 \pm 2.78	46.50 \pm 2.12	48.00
Comprimento total (cm)	25.67 \pm 4.04	41.31 \pm 8.42	57.70 \pm 11.64	79.00 \pm 4.46	76.00 \pm 8.48	82.00
Peso (g)	131.67 \pm 57.73	689.02 \pm 444.50	2693.33 \pm 633.19	5852.50 \pm 744.73	4950.00 \pm 777.82	5500.00

Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão para os parâmetros biométricos de *P.aiereba* entre espécimes neonatos, jovens, subadultos e adultos (machos, fêmeas e prenhas) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Dados biométricos	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 9	n= 16	n= 20	Machos n= 1	Fêmeas n= 1	Prenhas n= 1
Largura do disco (cm)	19.21 \pm 2.28	25.98 \pm 2.26	35.70 \pm 5.36	52.00	82.50	75.00
Comprimento total (cm)	31.94 \pm 6.28	41.48 \pm 5.65	99.57 \pm 226.46	72.00	105.00	105.00
Peso (g)	428.56 \pm 298.60	760.81 \pm 209.44	1885.20 \pm 1824.52	8.000	30.000	18760.00

Tabela 4. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia *Potamotrygon* sp. oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de ANOVA).

Parâmetros	Adultos					
	Neonatos	Jovens	Subadultos	Machos	Fêmeas	Prenhas
	n= 28	N= 10	n= 76	n= 129	n= 85	n= 29
Hct (%)	14.62 ± 3.74 ^a	29.00 ± 1.93 ^b	23.72 ± 5.33 ^c	23.20 ± 5.24 ^c	23.24 ± 4.47 ^c	23.92 ± 5.49 ^{bc}
Hb (g/dL)	2.25 ± 0.70 ^a	4.00 ± 0.93 ^b	4.34 ± 0.83 ^b	4.53 ± 0.96 ^b	4.43 ± 1.07 ^b	4.69 ± 0.75 ^b
RBC (milhões/ μ L)	0.35 ± 0.08 ^a	0.44 ± 0.05 ^{ab}	0.43 ± 0,11 ^{bc}	0.42 ± 0.11 ^{bc}	0.41 ± 0.11 ^{ac}	0.42 ± 0.08 ^{ac}
VCM (fL)	420.43 ± 83.14 ^a	500.96 ± 197.49 ^{ab}	552.09 ± 153.72 ^b	573.57 ± 170.89 ^b	583.76 ± 139.00 ^b	548.25 ± 122.68 ^b
HCM (pg)	62.83 ± 14.94 ^a	73.01 ± 12.42 ^{ac}	97.76 ± 24.36 ^{bc}	102.10 ± 24.60 ^b	108.79 ± 31.66 ^b	104.13 ± 26.56 ^b
CHCM (%)	15.43 ± 4.32 ^a	21.12 ± 9.46 ^b	18.44 ± 4.10 ^b	19.64 ± 4.62 ^b	19.07 ± 4.53 ^b	18.39 ± 2.65 ^{ab}
Glicose (g/dL)	41.25 ± 8.99 ^a	20.40 ± 5.45 ^b	32.44 ± 9.57 ^c	31.67 ± 9.78 ^c	30.02 ± 13.07 ^{bc}	30.00 ± 10.64 ^{bc}
Triglicerídeos (mM/L)	62.00 ± 21.15 ^a	30.83 ± 13.36 ^b	56.81 ± 16.99 ^a	60.55 ± 19.95 ^a	63.69 ± 27.47 ^a	67.48 ± 20.69 ^a
Colesterol (mM/L)	76.61 ± 22.79 ^a	32.63 ± 6.56 ^b	50.87 ± 21.61 ^{bc}	57.44 ± 23.53 ^c	49.24 ± 22.56 ^{bc}	48.66 ± 19.56 ^{bc}
Proteínas totais (g/dL)	0.85 ± 0.28 ^a	0.96 ± 0.01 ^{abc}	1.02 ± 0.32 ^{ac}	1.18 ± 0.34 ^b	1.14 ± 0.40 ^{bc}	1.36 ± 0.43 ^b
Uréia (mM/L)	1.60 ± 0.61 ^a	3.07 ± 0.19 ^b	1.44 ± 0.68 ^a	1.33 ± 0.44 ^a	1.42 ± 0.61 ^a	1.09 ± 0.24 ^a
Cl ⁻ (mM/L)	125.53 ± 10.63 ^a	139.64 ± 2.47 ^a	126.65 ± 20.30 ^a	124.37 ± 19.59 ^a	126.81 ± 21.60 ^a	122.03 ± 16.83 ^a
Na ⁺ (mEq/L)	135.69 ± 14.16 ^a	137.56 ± 9.26 ^a	139.95 ± 16.84 ^a	143.06 ± 19.82 ^a	144.59 ± 22.78 ^a	148.14 ± 20.00 ^a

K ⁺ (mEq/L)	8.79 ± 1.44 ^a	7.82 ± 0.19 ^a	10.07 ± 1.25 ^a	9.44 ± 2.19 ^a	8.99 ± 2.95 ^a	8.97 ± 1.66 ^a
Leucócitos (μL)	2763.00 ± 526.75 ^a	3112.71 ± 231.58 ^{ab}	5925.05 ± 3515.51 ^b	3459.20 ± 1630.16 ^a	3114,35 ± 5041.65 ^a	3823.90 ± 3041.73 ^{ab}
Trombócitos (μL)	564.00 ± 288.41 ^a	1406.50 ± 60.77 ^a	791.31 ± 637.58 ^a	822.76 ± 669.13 ^a	862.96 ± 523.85 ^a	774.30 ± 694.68 ^a
Linfócitos (%)	45.85 ± 9.78 ^a	44.50 ± 3.93 ^a	43.45 ± 15.05 ^a	44.15 ± 15.84 ^a	40.98 ± 16.91 ^a	37.30 ± 12.74 ^a
Linfócitos (μL)	1240.84 ± 425.38 ^a	1386.75 ± 358.05 ^a	2342.88 ± 1662.43 ^a	1688.59 ± 985.68 ^a	2119.49 ± 1757.62 ^a	1452.56 ± 1279.50 ^a
Monócitos (%)	27.15 ± 3.46 ^a	22.37 ± 8.33 ^a	30.26 ± 8.85 ^a	29.74 ± 14.71 ^a	30.38 ± 11.63 ^a	36.89 ± 9.17 ^a
Monócitos (μL)	748.32 ± 221.17 ^a	894.75 ± 14.15 ^{ab}	1882.81 ± 1163.39 ^b	1205.21 ± 847.74 ^a	698.60 ± 379.53 ^a	1537.97 ± 1214.49 ^{ab}
Heterófilos (%)	23.85 ± 12.95 ^a	28.50 ± 7.52 ^a	21.04 ± 11.90 ^a	19.10 ± 9.82 ^a	19.98 ± 10.75 ^a	23.80 ± 9.90 ^a
Heterófilos (μL)	761.10 ± 152.34 ^{ab}	656.60 ± 15.66 ^{ab}	1028.49 ± 516.49 ^b	688.22 ± 363.91 ^a	615.76 ± 277.34 ^a	908.20 ± 731.67 ^{ab}
Basófilos (%)	3.00 ± 0.82 ^{ab}	4.62 ± 2.00 ^{ab}	4.16 ± 3.41 ^a	2.37 ± 2.17 ^b	2.58 ± 2.73 ^{ab}	3.00 ± 2.00 ^{ab}
Basófilos (μL)	136.09 ± 130.96 ^{ab}	114.19 ± 17.24 ^{ab}	244.08 ± 216.19 ^a	111.12 ± 117.33 ^a	79.31 ± 95.81 ^a	124.83 ± 126.95 ^{ab}

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 5. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia *P. motoro* oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW).

Parâmetros	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	N= 3	n= 48	N= 3	Machos	Fêmeas	Prenhas
				n= 8	n= 2	n= 1
Hct (%)	18.00 ± 0.00 ^a	21.35 ± 1.96 ^a	20.00 ± 5.29 ^a	21.25 ± 4.17 ^a	20.00 ± 2.83 ^a	18.00 ^a
Hb (g/dL)	2.62 ± 0.47 ^a	3.90 ± 0.75 ^a	3.69 ± 1.53 ^a	3.47 ± 0.96 ^a	4.11 ± 1.77 ^a	2.86 ^a
RBC (milhões/ μ L)	0.26 ± 0.47 ^{ade}	0.42 ± 0.09 ^{bc}	0.35 ± 0.03 ^{ace}	0.32 ± 0.03 ^{de}	0.32 ^e	0.32 ^e
VCM (fL)	709.09 ± 94.47 ^a	484.93 ± 98.18 ^a	569.69 ± 141.05 ^a	757.55 ± 179.58 ^a	474.23 ± 124.83 ^a	562.50 ^a
HCM (pg)	101.49 ± 6.28 ^{ac}	88.61 ± 16.34 ^a	104.29 ± 39.89 ^{ac}	121.43 ± 26.53 ^c	91.82 ± 3.38 ^{ac}	89.43 ^{ac}
CHCM (%)	14.55 ± 2.62 ^a	18.62 ± 2.81 ^a	17.89 ± 3.84 ^a	16.36 ± 3.61 ^a	20.15 ± 6.02 ^a	15.90 ^a
Glicose (g/dL)	31.86 ± 16.22 ^a	34.56 ± 9.56 ^a	31.97 ± 10.08 ^a	28.88 ± 10.18 ^a	20.06 ± 8.73 ^a	13.89 ^a
Triglicerídeos (mM/L)	58.69 ± 4.83 ^a	60.84 ± 20.68 ^a	82.03 ± 37.01 ^a	81.42 ± 20.53 ^a	75.90 ± 8.12 ^a	70.16 ^a
Colesterol (mM/L)	69.76 ± 6.32 ^a	51.58 ± 23.46 ^a	37.85 ± 5.64 ^a	68.97 ± 40.38 ^a	84.82 ± 7.67 ^a	79.40 ^a
Proteínas totais (g/dL)	0.78 ± 0.42 ^a	0.97 ± 0.31 ^a	0.70 ± 0.04 ^a	1.32 ± 0.44 ^a	1.47 ± 0.40 ^a	1.19 ^a
Uréia (mM/L)	6.75 ± 1.71 ^a	1.60 ± 0.46 ^b	0.96 ± 0.50	2.07 ± 0.61	0.92 ± 0.79	0.36

Cl ⁻ (mM/L)	122.21 ± 12.99 ^a	119.09 ± 10.70 ^a	124.33 ± 0.18	113.69 ± 4.00	128.81 ± 3.24	125.00
Na ⁺ (mEq/L)	126.12 ± 22.32 ^a	137.27 ± 17.17 ^a	134.02 ± 7.67	141.37 ± 7.05	134.00	116.30
K ⁺ (mEq/L)	11.60 ^a	9.59 ± 1.57 ^a	9.94 ± 0.87 ^b	8.50 ± 0.95 ^b	8.00 ^b	7.60 ^b
Leucócitos (μL)	3055.00 ^a	2908.25 ± 617.34 ^a	8140.00 ± 8923.69 ^a	2520.00 ± 499.87 ^a	2500.00 ^a	4000.00 ^a
Trombócitos (μL)	940.00 ^a	816.00 ± 621.16 ^a	850.00 ± 1202.08 ^a	800.00 ± 507.81 ^a	1200.00 ^a	500.00 ^a
Linfócitos (%)	50.00 ^a	42.50 ± 11.84 ^a	43.25 ± 25.81 ^a	45.60 ± 10.92 ^a	59.00 ^a	50.00 ^a
Linfócitos (μL)	1527.50 ^a	1700.23 ± 1262.11 ^a	457.50 ^a	1078.45 ± 399.49 ^a	1475.00 ^a	2000.00 ^a
Monócitos (%)	28.00 ^a	27.82 ± 8.04 ^a	26.50 ± 2.12 ^a	26.20 ± 4.27 ^a	30.00 ^a	20.00 ^a
Monócitos (μL)	855.40 ^a	1367.84 ± 872.15 ^a	2251.75 ± 2537.45 ^a	649.65 ± 224.72 ^a	750.00 ^a	800.00 ^a
Heterófilos (%)	20.00 ^a	23.72 ± 9.96 ^a	28.00 ± 31.11 ^a	26.60 ± 15.52 ^a	8.00 ^a	35.00 ^a
Heterófilos (μL)	611.00 ^a	860.88 ± 416.65 ^a	891.00 ± 33.94 ^a	742.12 ± 128.16 ^a	200.00 ^a	1400.00 ^a
Basófilos (%)	2.00 ^a	4.19 ± 3.03 ^a	2.25 ± 3.18 ^a	2.67 ± 0.58 ^a	3.00 ^a	5.00 ^a
Basófilos (μL)	61.10 ^a	181.03 ± 178.05 ^a	325.12 ± 459.80 ^a	98.40 ± 142.99 ^a	75.00 ^a	200.00 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 6. Comparação hematológica do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes da arraia *P. aiereba* oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW).

Parâmetros	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 9	n= 16	N= 20	Machos	Fêmeas	Prenhas
				n= 1	n= 1	n= 1
Hct (%)	23.00 ± 4.36 ^a	27.41 ± 3.12 ^a	25.74 ± 4.90 ^a	32.00 ^a	18.00 ^a	22.00 ^a
Hb (g/dL)	4.55 ± 1.90 ^a	3.84 ± 0.76 ^a	3.78 ± 0.63 ^a	4.90 ^a	2.77 ^a	5.40 ^a
RBC (milhões/ μ L)	0.36 ± 0.08 ^a	0.38 ± 0.10 ^a	0.36 ± 0.07 ^a	0.390 ^a	0.41 ^a	0.48 ^a
VCM (fL)	642.84 ± 93.17 ^a	752.98 ± 193.31 ^a	734.49 ± 167.07 ^a	820.51 ^a	439.02 ^a	458.33 ^a
HCM (pg)	110.33 ± 53.06 ^a	110.89 ± 29.47 ^a	107.65 ± 36.62 ^a	125.64 ^a	67.56 ^a	112.50 ^a
CHCM (%)	19.44 ± 6.33 ^a	14.32 ± 3.05 ^b	14.05 ± 2.61 ^b	15.31 ^{ab}	15.39 ^{ab}	24.55 ^{ab}
Glicose (g/dL)	13.01 ± 3.70 ^a	17.17 ± 6.52 ^a	17.60 ± 3.75 ^a	27.58 ^a	13.46 ^a	26.91 ^a
Triglicerídeos (Mm/L)	87.55 ± 43.78 ^a	105.36 ± 57.65 ^a	104.94 ± 45.85 ^a	117.97 ^a	55.05 ^a	126.56 ^a
Colesterol (mM/L)	72.64 ± 34.40 ^a	63.56 ± 15.77 ^a	56.67 ± 21.52 ^a	72.14 ^a	25.79 ^a	56.27 ^a
Proteínas totais (g/dL)	1.37 ± 0.57 ^a	1.28 ± 0.17 ^a	1.50 ± 0.13 ^a	2.05 ^{ac}	1.30 ^a	2.75 ^c
Uréia (mM/L)	4.85 ± 2.48 ^a	4.31 ± 2.86 ^a	4.31 ± 3.28 ^a	1.65 ^a	1.42 ^a	2.84 ^a

Cl ⁻ (mM/L)	124.20 ± 10.00 ^a	122.39 ± 0.70 ^a	114.49 ± 15.61 ^a	136.30 ^a	130.11 ^a	149.02 ^a
Na ⁺ (mEq/L)	135.11 ± 14.12 ^a	144.32 ± 2.88 ^a	136.40 ± 16.27 ^a	119.85 ^a	132.00 ^a	117.06 ^a
K ⁺ (mEq/L)	8.73 ± 1.20 ^a	9.20 ± 1.71 ^a	9.62 ± 1.53 ^a	9.88 ^a	7.00 ^a	7.88 ^a
Leucócitos (μL)	2970.00 ± 479.88 ^a	2696.67 ± 545.73 ^a	2859.50 ± 765.30 ^a	4515.00 ^a	3000.00 ^a	2228.00 ^a
Trombócitos (μL)	636.00 ± 280.86 ^a	610.00 ± 367.56 ^a	700.00 ± 461.04 ^a	2150.00 ^b	1040.00 ^{ab}	1418.00 ^{ab}
Linfócitos (%)	48.14 ± 10.22 ^a	47.05 ± 9.82 ^a	44.50 ± 8.76 ^a	45.00 ^a	52.00 ^a	51.00 ^a
Linfócitos (μL)	1447.33 ± 138.85 ^a	1228.80 ± 482.03 ^a	1220.95 ± 442.01 ^a	2031.75 ^a	1560.00 ^a	1136.28 ^a
Monócitos (%)	29.00 ± 1.09 ^a	28.35 ± 4.57 ^a	26.81 ± 4.49 ^a	30.50 ^a	26.00 ^a	17.00 ^a
Monócitos (μL)	878.27 ± 39.61 ^a	733.27 ± 243.06 ^a	789.88 ± 2877.38 ^a	1377.07 ^a	780.00 ^a	378.76 ^a
Heterófilos (%)	20.00 ± 11.94 ^a	21.75 ± 13.56 ^a	23.23 ± 13.20 ^a	16.50 ^a	20.00 ^a	26.00 ^a
Heterófilos (μL)	652.40 ± 39.73 ^a	899.40 ± 1.20 ^a	760.13 ± 212.00 ^a	744.97 ^a	600.00 ^a	579.28 ^a
Basófilos (%)	2.83 ± 0.75 ^a	3.44 ± 0.82 ^a	3.50 ± 1.12 ^a	8.00 ^b	2.00 ^a	6.00 ^{ab}
Basófilos (μL)	159.89 ± 141.21 ^a	190.95 ± 147.47 ^a	177.67 ± 179.79 ^a	361.20 ^a	60.00 ^a	133.68 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 7. Comparação do estágio de desenvolvimento, dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de ANOVA).

Parâmetros	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 20	n= 9	n= 65	Machos	Fêmeas	Prenhas
				n= 84	n= 66	n= 24
Ph	4.49 ± 0.23 ^a	4.06 ± 0.09 ^{bc}	4.20 ± 0.21 ^{bc}	4.10 ± 0.13 ^b	4.11 ± 0.13 ^b	4.26 ± 0.37 ^c
Temperatura (°C)	29.64 ± 0.44 ^{ad}	28.03 ± 0.40 ^b	28.95 ± 1.06 ^c	29.12 ± 0.91 ^{ac}	29.64 ± 0.34 ^d	29.25 ± 0.53 ^{acd}
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4.33 ± 0.17 ^{abc}	4.04 ± 0.23 ^b	4.35 ± 0.36 ^{abc}	4.43 ± 0.54 ^{abc}	4.41 ± 0.20 ^{abc}	4.55 ± 0.14 ^c
Condutividade (µS/cm)	13.16 ± 2.18 ^a	11.99 ± 0.94 ^a	12.66 ± 1.74 ^a	13.07 ± 2.60 ^a	12.90 ± 2.85 ^a	12.25 ± 2.26 ^a
Amônia (mg/L)	0.058 ± 0.030 ^a	0.71 ± 0.06 ^b	0.25 ± 0.34 ^{ac}	0.30 ± 0.33 ^c	0.33 ± 0.36 ^c	0.04 ± 0.03 ^a
Nitrito (mg/L)	0.011 ± 0.004 ^{ac}	0.004 ± 0.001 ^{bd}	0.01 ± 0.01 ^{cd}	0.01 ± 0.01 ^{bd}	0.01 ± 0.01 ^{bd}	0.01 ± 0.01 ^a
Dureza (mg/L)	2.75 ± 1.23 ^{abc}	3.35 ± 0.06 ^{abc}	4.00 ± 3.41 ^{abc}	5.23 ± 5.01 ^c	3.34 ± 1.61 ^b	2.40 ± 1.87 ^b
Alcalinidade (mg/L)	3.35 ± 1.25 ^a	2.45 ± 0.08 ^a	8.56 ± 8.71 ^b	3.27 ± 2.07 ^a	4.31 ± 0.63 ^a	2.92 ± 1.59 ^a
Na ⁺ (mg/L)	21.44 ± 4.04 ^a	73.24 ± 1.41 ^b	19.31 ± 6.36 ^a	18.71 ± 7.29 ^a	19.48 ± 9.21 ^a	20.03 ± 5.67 ^a
K ⁺ (mg/L)	11.09 ± 2.34 ^a	16.68 ± 2.91 ^a	12.95 ± 5.42 ^a	13.16 ± 4.48 ^a	15.52 ± 7.11 ^a	13.50 ± 5.88 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 8. Comparação do estágio de desenvolvimento, do dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia *P. motoro* oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW).

Parâmetros	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	n= 3	n= 40	n= 3	Machos	Fêmeas	Prenhas
				n= 7	n= 2	n= 1
pH	4.30 ± 0.17 ^a	4.25 ± 0.26 ^a	4.17 ± 0.15 ^a	4.39 ± 0.26 ^a	4.15 ± 0.07 ^a	3.80 ^a
Temperatura (°C)	29.43 ± 0.51 ^a	28.99 ± 1.26 ^a	29.07 ± 2.00 ^a	29.26 ± 0.76 ^a	28.65 ± 1.91 ^a	31.00 ^a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4.49 ± 0.18 ^a	4.27 ± 0.39 ^a	4.37 ± 0.40 ^a	4.26 ± 0.14 ^a	4.20 ± 0.43 ^a	3.70 ^a
Condutividade (µS/cm)	14.03 ± 1.75 ^a	12.58 ± 1.71 ^a	12.70 ± 0.99 ^a	13.36 ± 1.84 ^a	14.10 ± 2.55 ^b	20.00 ^a
Amônia (mg/L)	0.040 ± 0.017 ^a	0.33 ± 0.34 ^a	0.25 ± 0.37 ^a	0.17 ± 0.26 ^a	0.41 ± 0.57 ^a	0.85 ^a
Nitrito (mg/L)	0.013 ± 0.001 ^a	0.007 ± 0.004 ^a	0.008 ± 0.005 ^a	0.013 ± 0.005 ^a	0.009 ± 0.003 ^b	0.03 ^a
Dureza (mg/L)	1.83 ± 1.53 ^a	3.85 ± 3.01 ^a	4.83 ± 5.39 ^a	2.90 ± 1.04 ^a	3.25 ± 3.18 ^a	3.30 ^a
Alcalinidade (mg/L)	2.38 ± 1.77 ^a	7.83 ± 8.52 ^a	9.31 ± 9.35 ^a	3.26 ± 1.21 ^a	11.11 ± 12.60 ^a	25.00 ^a
Na ⁺ (mg/L)	19.35 ± 0.13 ^a	29.70 ± 24.14 ^a	19.28 ^a	31.19 ± 23.36 ^a	28.45 ^a	8.00 ^a
K ⁺ (mg/L)	11.86 ± 3.67 ^a	13.52 ± 4.48 ^a	12.35 ± 5.01 ^a	10.90 ± 2.16 ^a	13.60 ± 0.44 ^a	7.20 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 9. Comparação do estágio de desenvolvimento, do dimorfismo sexual e do estado de prenhes sobre os parâmetros físicos e químicos da água dos locais de ocorrência da arraia *P. aiereba* oriundos do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil (teste de KW).

Parâmetros	Neonatos	Jovens	Subadultos	Adultos		
	N= 9	n= 15	n= 19	Machos	Fêmeas	Prenhas
				n= 1	n= 1	n= 1
pH	4.49 ± 0.20 ^a	4.43 ± 0.24 ^a	4.48 ± 0.25 ^a	4.20 ^a	4.60 ^a	4.20 ^a
Temperatura (°C)	29.61 ± 0.42 ^a	29.71 ± 0.43 ^{ab}	29.65 ± 0.46 ^{ab}	31.00 ^b	29.00 ^a	29.30 ^{ab}
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4.28 ± 0.18 ^a	4.43 ± 0.16 ^a	4.32 ± 0.21 ^a	4.46 ^a	4.50 ^a	4.29 ^a
Condutividade (µS/cm)	13.08 ± 1.91 ^a	13.52 ± 2.52 ^a	13.09 ± 1.81 ^a	14.00 ^a	12.00 ^a	12.30 ^a
Amônia (mg/L)	0.07 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ^a	0.10 ^a	0.02 ^a
Nitrito (mg/L)	0.011 ± 0.003 ^a	0.011 ± 0.004 ^a	0.011 ± 0.004 ^a	0.009 ^a	0.015 ^a	0.014 ^a
Dureza (mg/L)	2.81 ± 0.53 ^a	2.35 ± 1.58 ^a	2.71 ± 1.29 ^a	0.50 ^a	5.00 ^a	1.50 ^a
Alcalinidade (mg/L)	4.09 ± 0.54 ^a	2.93 ± 1.19 ^a	3.36 ± 1.23 ^a	2.75 ^a	4.40 ^a	1.65 ^a
Na ⁺ (mg/L)	21.56 ± 4.54 ^a	23.84 ± 5.67 ^a	20.19 ± 2.96 ^a	10.11 ^a	19.28 ^a	28.45 ^a
K ⁺ (mg/L)	9.63 ± 0.70 ^a	11.92 ± 1.93 ^a	9.37 ± 1.35 ^a	7.85 ^a	10.57 ^a	13.29 ^a

Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas

Tabela 10. Comparação hematológica das arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba* capturadas no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Variáveis	Neonatos			Jovens			Subadultos			Machos adultos			Fêmeas adultas			Prenhas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hct (%)	a	ab	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Hb (g/dL)	a	a	b	a	a	a	a	ab	b	a	b	ab	a	a	a	a	a	a
RBC (milhões/ μ L)	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	a	b	ab	a	a	a	a	a	a
VCM (fL)	a	b	b	a	a	b	a	ab	b	a	b	ab	a	a	a	a	a	a
HCM (pg)	a	ab	a	a	b	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CHCM (%)	a	a	a	a	a	b	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Glicose (g/dL)	a	a	b	a	b	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Triglicerídeos (mM/L)	a	a	a	a	a	b	a	ab	b	a	b	b	a	a	a	a	ab	b
Colesterol (mM/L)	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Proteínas totais (g/dL)	a	ab	b	ab	a	b	a	a	b	a	ab	b	a	a	a	a	a	b
Uréia (mM/L)	a	b	b	ab	a	b	a	a	b	a	b	ab	a	a	a	a	b	c
Cl ⁻ (mM/L)	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Na ⁺ (mEq/L)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
K ⁺ (mEq/L)	a	a	a	a	b	ab	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Leucócitos (μL)	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a
Trombócitos (μL)	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Linfócitos (%)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Linfócitos (μL)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Monócitos (%)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Monócitos (μL)	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a
Heterófilos (%)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Heterófilos (μL)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Basófilos (%)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	a	a	a
Basófilos (μL)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

1: *Potamotrygon* sp.; 2: *Potamotrygon motoro*; 3: *Paratrygon aiereba*

* Letras diferentes na mesma categoria significam diferenças estatísticas entre as espécies

Tabela 11. Comparação dos parâmetros físicos e químicos dos locais de ocorrência das arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba* capturadas no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Variáveis	Neonatos			Jovens			Subadultos			Machos adultos			Fêmeas adultas			Prenhas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
pH	a	a	a	a	ab	b	a	ab	b	a	b	ab	a	a	b	a	a	a
Temperatura (°C)	a	a	a	a	ab	b	a	ab	b	a	a	a	a	b	ab	a	b	ab
Oxigênio dissolvido (mg/L)	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a
Condutividade (µS/cm)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	ab
Amônia (mg/L)	a	a	a	a	b	c	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	b	a
Nitrito (mg/L)	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	ab	a	a	a	a	b	a
Dureza (mg/L)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Alcalinidade (mg/L)	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	b	a	a	b	a
Na ⁺ (mg/L)	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	b	ab	a	a	a	a	a	a
K ⁺ (mg/L)	a	a	a	a	ab	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

1: *Potamotrygon* sp.; 2: *Potamotrygon motoro*; 3: *Paratrygon aiereba*

* Letras diferentes na mesma categoria significam diferenças estatísticas entre as espécies

4. DISCUSSÃO

Em elasmobrânquios, incluindo as arraias de água doce, é demonstrando que esses apresentam menor quantidade de eritrócitos no sangue, porém, o tamanho desse tipo celular é de duas a três vezes maior que o observado em peixes teleósteos (SAUNDERS, 1966; LUER et al., 2004; WILHELM FILHO et al., 1992). Como conseqüência, os elasmobrânquios apresentam mais HCM e menor Hb que os teleósteos, diferenças que resultam em um sangue com baixa viscosidade (hemodiluído). Estes fatores coadunados apontam as arraias como animais com baixa demanda por oxigênio e baixa taxa metabólica sendo, portanto, mais sedentários que os tubarões e os teleósteos (WILHELM FILHO et al., 1992).

Não foram observadas diferenças hematológicas influenciadas pelo sexo, bem como pela prenhez nas três espécies de potamotrigonídeos investigadas. Essa característica havia sido observadas por Oliveira (2008) para a arraia *Potamotrygon* sp. e também em tubarões da espécie *Scyliorhinus canícula* (TUDOR, 1984).

O hemograma da arraia cururu demonstrou que Hct de neonatos é inferior as demais faixas de desenvolvimento, essa característica é confirmada pelo menor numero de eritrócitos (RBC), bem como um menor VCM. Essa ser explicada pelo cuidado parental da arraia cururu durante a fase de indivíduo neonatos que proporciona uma baixa no metabolismo e por conseqüência uma exigência menor por oxigênio (OLIVEIRA, 2008), por outro lado em *P. motoro* e *P. aiereba* o hemograma não diferiu nas fases de desenvolvimento. Provavelmente os ajustes no hemograma da arraia cururu devam ser por conta do hábitat que as mesmas tem preferências (igapós), entretanto, pode ser que o tamanho seja o fator determinante nessa diferenciação, haja visto, os neonatos da arraia cururu são menores do que os retratados para *P. motoro* e *P. aiereba*.

Na bioquímica plasmática em neonatos da arraia *P. sp.* os níveis de glicose, triglicerídeos e proteínas totais foram superiores aos retratados para jovens, subadultos e adultos, no presente estudo essas variações foram atribuídas a presença do vitelo presente nessa fase de desenvolvimento (ARAÚJO, 1998 Oliveira (2008). *P. motoro* e *P. aiereba* não houveram variação ao longo do desenvolvimento nas variáveis da bioquímica plasmática analisadas, embora nessas espécies também ocorram variação ontogênica na dieta.

Na análise do trombograma e leucograma um padrão muito conservador foi observado ao longo do desenvolvimento em todas as três espécies estudadas, esses resultados foram diferentes dos retratados por Oliveira (2008) o qual descreveu alterações em algumas variáveis do leucograma e atribuiu esse a diferenciação por conta da perda do cuidado parental na fase descrita como jovem, entretanto, naquele estudo houve um baixo número amostral.

É notório que ao analisar o perfil hematológico da arraia *Potamotrygon* sp. o estágio de desenvolvimento deve ser considerado um critério de separação, principalmente sobre neonatos e jovens. Em compensação o perfil hematológico ao longo do desenvolvimento das arraias *P. motoro* e *P. aiereba* não constituem em critérios para separação nessas categorias, porém, faz se considerar o baixo número amostral de indivíduos neonatos, subadultos, machos adultos, fêmeas adultas e prenhas da arraia *P. motoro*. Além de um baixo número amostral de indivíduos adultos da arraia *P. aiereba*, o qual pode ser atribuído a limitação do instrumento de pesca utilizado.

Nos aspectos físicos e químicos da água em um estudo recente foi observado que diferentes tipos de água pode ser um fator de distribuição zoogeográfica em integrantes da família Potamotrygonidae na bacia Amazônica (DUNCAN; FERNANDES, 2011). Nesse sentido quando se considera o estágio de desenvolvimento, o sexo e o estado de prenhes, na arraia cururu foi constatado que indivíduos neonatos possuem uma nítida preferência por águas mais alcalinas, essa característica é pode ser uma estratégia adaptativa ao sangue hemodiluído, o que reflete em um sistema imunológico ainda em processo de formação, por outro lado, fêmeas prenhas tem preferência por águas mais ácidas o que pode ser uma estratégia de cuidado parental haja vista nas áreas de igapós ocorre grande competitividade de alimentos e uma presença acentuada de biodiversidade íctica, essa característica não foi descrita nas variáveis biológicas investigadas quando se analisou separadamente as arraias *P. motoro* e *P. aiereba*. De uma maneira geral os aspectos físicos e químicos da água investigadas no presente estudo apresentam resultados similares aos descritos por Duncan e Fernandes (2011) quando estudaram arraias *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *P. motoro* e *P. aiereba* também no Arquipélago de Mariuá, Amazonas.

Na análise comparativa das três espécies investigadas os indivíduos neonatos da arraia cururu possuem menores valores de Hct que as arraias *P.*

motoro e *P. aiereba*, essa característica demonstram que essa variável foi diferenciada entre as espécies por conta das variações ocorridas no VCM, a partir dessa observação é possível descrever que neonatos da arraia cururu são indivíduos menos ativos que *P. motoro* e *P. aiereba*, respectivamente.

Em indivíduos jovens de *P. motoro* foi observado valores inferiores do Hct quando comparados a *Potamotrygon* sp. e *P. aiereba*, entretanto, essa alteração não foi explicada pelos valores do RBC e VCM. Em subadultos houve uma característica marcante onde a espécie *Potamotrygon* sp. apresentou maiores valores dos níveis de Hb, RBC, VCM e CHCM, demonstrando que subadultos da arraia cururu possuem uma maior capacidade de transportar oxigênio quando comparados a *P. aiereba*.

Devido ao baixo número amostral de indivíduos da arraia *P. aiereba* uma análise comparativa incluindo essa deve ser interpretada com cautela, no presente estudo foi demonstrado que a arraia cururu possui maior capacidade de transportar oxigênio do que a arraia *P. motoro*. Entre fêmeas adultas e prenhas não foram observadas diferenças na série vermelha do sangue entre as três espécies de arraias investigadas. De maneira geral quando comparados indivíduos adultos os resultados do presente estudo corroboram os resultados obtidos por Oliveira (2008), Duncan et al., (2009), Brinn et al., (2011), Brito (2012) e Lemos (2011) quando investigaram várias espécies de arraias da família Potamotrygonidae.

Nas variáveis da bioquímica plasmática as diferenças observadas foram com a arraia *P. aiereba* o qual apresentou valores inferiores dos níveis de glicose, elevados níveis de proteínas e baixos de uréia, quando comparados as arraias *Potamotrygon* sp e *P. motoro*. Em subadultos de *P. aiereba* foi observado diferenças das demais arraias, os níveis de glicose foram baixos e os níveis de triglicerídeos elevados, além do mais houve diferença nos níveis de proteínas totais e uréia. De maneira geral, para os indivíduos adultos foram observados similaridades entre as três espécies investigadas, as possíveis diferenças observadas devem ser oriunda da dieta diferentes que existem entre as espécies, haja vista a arraia cururu *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) é uma espécie generalista, *P. motoro* é uma espécie que tem preferência por crustáceos, enquanto *P. aiereba* tem preferência por pequenos teleósteos (SHIBUYA et al., 2009).

Os trombócitos de elasmobrânquios são células envolvidas, primariamente, no processo de coagulação (WALSH; LUER, 2004; LUER et al.,

2004), mas que participam também nos mecanismos de defesa (HUNT; ROWLEY, 1986). Em indivíduos neonatos e jovens o leucograma e trombograma não diferiram nas três espécies investigadas, demonstrando um caráter conservador em relação ao sistema imunológico nessas faixas de desenvolvimento, tais resultados também foram descritos por Oliveira (2008). Em indivíduos subadultos foram observadas alterações entre as três espécies de arraias na variável leucograma o qual na arraia cururu foi demonstrado valores superiores aos retratados na arraia *P. aiereba*. Ademais, não foram observadas diferenças nas arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*, na fase de adultos, incluindo machos, fêmeas e prenhas.

Em relação aos aspectos físicos e químicos do rio Negro onde foi realizado o presente estudo, este possui águas pretas com alta concentração de carbono orgânico dissolvido, poucos sedimentos em suspensão, média transparência, poucos íons dissolvidos o que confere a característica ácida das águas (RICKEY et al., 1990). Duncan e Fernandes (2011) analisando as características do Rio Negro demonstraram que existe heterogeneidade dentre de uma mesma localidade (Arquipélago de Mariuá) nas propriedades físicas e químicas, e que isto pode ser um fator determinante na preferência de habitats de espécies, bem como na distribuição geográfica. Toffoli et al., (2008) reforçaram esses estudos sugerindo principalmente que os rios são responsáveis pelos fluxos genéticos em potamotrigonídeos.

Indivíduos neonatos, jovens, machos adultos e fêmeas adultas apresentaram propriedades da água similares quando comparadas as três espécies dentro dos estágios de desenvolvimento e do dimorfismo sexual. A partir dessa característica pode-se afirmar que *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba* apesar de possuírem nítida preferências de habitats e em muitas vezes povoarem as mesmas localidades, observação confirmada durante as atividades de campo, essa descrição pode ser explicada por conta dos diferentes ciclos reprodutivos que as mesmas possuem e que estão regulados pelo nível do rio (ARAÚJO, 2011; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005; ARAÚJO, 1998). Por outro lado ao ser analisados subadultos e prenhas, a arraia cururu ocupou águas bem diferentes das águas de *P. aiereba*, apesar do baixo número amostral em algumas características. Essa observação permite diferenciar a arraia cururu de *P. aiereba* haja vista a primeira tem uma nítida preferência por áreas de igapós enquanto a outra tem preferência por praias, os quais possuem propriedades físicas e químicas da água diferentes.

Em conclusão, na arraia cururu o estágio de desenvolvimento é um fator importante para diferenciar as propriedades hematológicas bem como as propriedades da água, portanto, deve-se ter cuidado ao fazer comparações com outras espécies. Entretanto nas arraias *P. motoro* e *P. aiereba* essa característica biológica não exerce influência tanto sobre as características hematológicas quanto sobre as características da água. Ao confrontar os aspectos hematológicos e as características da água entre as arraias *Potamotrygon* sp, *P. motoro* e *P. aiereba*, pode-se observar um caráter conservador entre as espécies, principalmente sobre as características do leucograma e trombograma. Em relação às propriedades da água apenas indivíduos subadultos e prenhas possuem diferenças nas propriedades da água, esses resultados ressaltam que dentro de uma mesma bacia a hematologia e as propriedades físicas e químicas da água não são diferenciadas entre as arraias *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *P. motoro* e *P. aiereba*, oriundas do Arquipélago de Mariuá, Amazonas.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processos 925/03, 2203/05, 2204/05, 2459/08 e 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 486289/2006-0, 40872/2006-4 e 408795/2006-9). O autor principal agradece a concessão da bolsa de Doutorado fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; WALKER, I. Long-and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. *In: Biology of tropical fishes*. VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. pp. 185-206. Manaus, 1999.
- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. 1998. 171 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA, Manaus. 1998.
- ARAÚJO, M. L. G. Plano de Monitoramento de arraias de água Doce. 1999. 31 p. Convênio IBMA-AM/ACEPOAM. 1999.
- ARAÚJO, M.L.G. Dinâmica de população e conservação de *Paratrygon aiereba* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas 2011. 106 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus. 2011.

- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, uréia e conteúdo de oxigênio no sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). 1997. 67p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 1997.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Auburn University, 183 p, 1992.
- BRINN, R.P.; MARCON, J.L.; GOMES, D.M. ABREU, L.C.; BALDISSEROTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon* cf. *histris*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 162: 139-145, 2012.
- BRITO, F.M.M. Variáveis hematológicas, hormonais, bioquímicas, séricas e fauna parasitária em quatro espécies de raias do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) de vida livre. 2012. 55 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2012.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). *In*: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (orgs.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América. Porto Alegre, Edipucrs, p. 22-28, 2003.
- CHAO, N.L., PETRY, P., PRANG, G., SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba. EDUA, Manaus, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. *J. Northw Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165-171, 2005.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; ARAÚJO, M.L.G.; FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 74, p. 956-960, 2009.
- DUNCAN, W.P.; INOMATA, S.O.; FERNANDES, M.N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010.
- DUNCAN, W.P.; FERNANDES, M.N. Physicochemical characterization of the White, Black, and clearwater Rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(3): 454-464, 2011.
- HUNT, T.C.; ROWLEY, A.F. Studies on the reticulo-endothelial system of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. I. Endocytic activity of fixed cells in gills & peripheral blood leucocytes. *Cell and Tissue Research* 244, 215- 226, 1986.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L. Age-Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet Clin Path* 30, 8-15, 2001.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Instrução Normativa Nº. 204/2008.
- KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J.E.G.; IDOGE, E. Haematological characteristics of the African snakehead, *Parachanna obscura*. *African J. of Biotech.*, 4, 527-530, 2005.
- LEMOS, J.R.G. Índices parasitários e parâmetros fisiológicos de arraias cururu (*Potamotrygon* cf. *histris*) exportadas como peixes ornamentais: ferramentas para avaliação do estado de saúde da espécie. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2011.

- LUER, C.A.; WALSH, C.J.; BODINE, A.B. The Immune System of sharks, skates, and rays. In: Biology of sharks and their relatives. CARRIER, J.C.; MUSICK, J.A.; HEITHAUS, M.R. (eds.) New York, CRC Marine Biology, 369-389, 2004.
- OLIVEIRA, A.T.; LEMOS, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C; ARAÚJO, M.L.G.;TAVARES-DIAS, M.;MARCON, J.L. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias. Embrapa Amapá, Macapá, 18p, 2012.
- PARMA-CROUX, M.J. Some haematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). Rev de Hydrobiologia Trop. 27, 113-119, 1994.
- PAVLIDIS, M., FUTTER, W.C., KATHARIO, P., DIVANACH, P. Blood cells of six Mediterranean mariculture fish species. J App Ichth. 23, 70-73, 2007.
- RICKEY, J.E.; HEDGES, J.I.; DEVOL, A.H.; QUAY, P.D.; VICTORIA, R.; MARTINELLI, L.; FORSBERG, B.R. Biogeochemistry of carbon in the Amazon River. Limnology and Oceanography, 35: 352-371, 1990.
- SAUNDERS, D.C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. Transactions. American Microscopy Society 85, 427-449, 1966.
- SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4, n. 4, p. 466- 465, 2009.
- SOUZA, F.K.S.; BARBOSA, R.P.; FREITAS, C.E.C. Peixes do médio Rio Negro uma abordagem ecológica: Manaus, EDUA, 2006.
- SVOBODOVÁ, Z.; KROUPOVÁ, H.; MODRÁ, H.; FLAJSHANS, M.; RANDÁK, T.; SAVINA, L.V.; GELA, D. Haematological profile of common carp spawners of various breeds. J App Ichth 24, 55-59, 2008.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia em peixes teleósteos. Villimpress: Ribeirão Preto, SP, 144 p, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus*, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. Hidrobiológica, 16(3): 273-276, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. Veterinary Clinical Pathology 36, 49-54, 2007.
- TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M. P.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FARIAS, I. P. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). Genetic and Molecular Biology, 31: 324–336, 2008.
- TUDOR, M. Preliminary evaluation of α – aminolevulinic acid dehydratase in blood of lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) from the middle Adriatic. Institut za Oceanografiju i ribarstvo 55, 1-5, 1984.
- VAL, A.L.; AFFONSO, E.G.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Adaptive features of Amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus* cf. *nigricans*, Osteichthyes). Physiological Zoology 65(4): 832-843, 1992.
- WALSH, C.J.; LUER, C.A. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. SMITH, M.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. COLUMBUS (eds.), Ohio Biological Survey. 307-323, 2004.
- WILHELM FILHO, D.; EBLE, G.J.; KASSNER, G.; CAPRARIO, F.X.; DAFRÉ, A.L.; OHIRA, M. Comparative Hematology in Marine Fish. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 102A, p. 311-321, 1992.

CAPÍTULO 7

INTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA EM ARRAIAS DE ÁGUA DOCE

Adriano Teixeira de Oliveira¹, Paulo Henrique Aride Rocha², Jackson Pantoja-Lima³, Jaydione Luiz Marcon⁴, Marcos Tavares-Dias⁵

1. Biólogo, Doutorando em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
2. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
3. Engenheiro de Pesca, Doutor em Ecologia, Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Presidente Figueiredo, AM.
4. Biólogo, Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM
5. Biólogo, Doutor em Aquicultura, Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), Macapá, AP

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo investigar o perfil hematológico e os parâmetros físico-químicos da água, comparando e correlacionando ecologicamente entre neonatos e jovens de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. A Análise de componentes principais (PCA) do hemograma revelou um total 72,92% de variação, constituindo-se em um sistema de diferenciação na demanda por oxigênio. *Potamotrygon* sp. apresenta diferenciação no eixo X quando comparada a *P. aiereba*, por outro lado *P. motoro* constitui-se como uma espécie intermediária que apresenta as características do hemograma interagindo tanto com *Potamotrygon* sp. quanto com *P. aiereba*. A interação entre as variáveis bioquímica demonstram um total de 64,67% dos fatores o qual foi possível diferenciar, quando se considera o eixo X, principalmente a arraia *Potamotrygon* sp. de *P. aiereba*, tendo *P. motoro* com os aspectos mais próximos a *Potamotrygon* sp, mais ainda tendo uma aspecto de intermediária entre as demais. Esses aspectos de diferenciação de ambiente de preferência corroboraram a PCA obtida no presente estudo e confirmam que essas espécies podem ser diferenciadas quando se considerar as variáveis referentes ao hemograma e bioquímica. Nos íons, no trombograma e no leucograma, não foi possível diferenciar as espécies. O PCA das propriedades da água foi constituído por 68,57% de diferenciação que se constituiu principalmente no eixo x (49,44%). É possível confirmar que *P. motoro* tem a capacidade de habitar as áreas preferências de *Potamotrygon* sp. e *P. aiereba*, além do mais esta possui uma localidade que as demais arraias não são encontradas. Conclui-se que *Potamotrygon* sp., apresenta padrões diferenciados de *P. aiereba*, além do mais *P. motoro* é mesmo uma espécie que apresenta características intermediárias entre as descritas, o qual pode ser considerada uma espécie com distribuição mais ampla em seus aspectos ecofisiológicos.

Palavras-chave: Hematologia; Potamotrygonídeos; Ecofisiologia; Diferenças.

ABSTRACT

This work aims to investigate the hematologic and physical-chemical parameters of water, comparing and correlating ecologically among neonates and young of *Potamotrygon* sp. (stingray cururu), *Potamotrygon motoro* and *Paratrygon aiereba*. The Principal component analysis (PCA) of the hemogram revealed a total 72.92% of variation, constituting a system of differentiation of oxygen demand. *Potamotrygon* sp. shows differentiation in the axis X when compared to *P. aiereba*, moreover *P. motoro* constitutes itself as an intermediate species that has the characteristics of hemogram interacting with *Potamotrygon* sp. as with *P. aiereba*. The interaction between the biochemical variables show a total of 64.67% of the factors which it was possible to differentiate, when considering the axis X, especially the stingray *Potamotrygon* sp and *P. aiereba*, having *P. motoro* with aspects closest to *Potamotrygon* sp, having a further aspect of intermediate between the others. These aspects of differentiation environment preferably corroborated the PCA obtained in the present study confirm that these species can be distinguished when considering the variables referring to the hemogram and biochemistry. In ions, in thrombogram, and leucogram was not possible to differentiate the species. The PCA properties of the water was comprised of 68.57% of differentiation that consisted mainly in the axis X (49.44%). Can you confirm that *P. motoro* has the ability to inhabit areas preferences of *Potamotrygon* sp. and *P. aiereba*, besides this has a location that other stingrays are not found. It was concluded that *Potamotrygon* sp. presents

different patterns of *P. aiereba* furthermore *P. motoro* is even a species that has characteristics intermediate between those described above, which can be considered a species with wider distribution in ecophysiological aspects.

Keywords: Hematologic; Potamotrygonidae; Ecophysiology; Differences.

1. INTRODUÇÃO

Entre os integrantes da ictiofauna Amazônica as arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) exercem grande importância social e econômica, principalmente no seu uso como peixes ornamentais, o qual a sua exploração ocorre apenas sobre os indivíduos neonatos e jovens (ARAÚJO et al., 2004; DUNCAN et al., 2010). No estado do Amazonas a principal localidade de exploração desse recurso é o Arquipélago de Mariuá localizado no médio Rio Negro, nessa localidade a exploração ornamental ocorre predominantemente sobre as espécies *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *Potamotrygon motoro* (IBAMA, 2008), entretanto, a espécie *Paratrygon aiereba* em muitas vezes vem sendo comercializada com a denominação de outra espécie (exemplo *Potamotrygon orbigny*) haja vista existe uma dificuldade acentuada pela fiscalização dos órgãos competentes principalmente na identificação das espécies.

A diferença entre as espécies (*Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*) está muito além dos padrões de colorações. *Potamotrygon* sp. apresenta pequeno porte e pode atingir no máximo 45 cm de largura do disco. É uma espécie ainda em processo de descrição científica, mas com sua identificação bem definida. A arraia cururu apresenta segregação sexual com ciclo reprodutivo anual e regulado pelo nível do rio, envolvendo a cópula na vazante e parto na seca (ARAÚJO, 1998). Sua distribuição é endêmica e restrita ao médio Rio Negro, ocorrendo em ambientes de liteira, com baixo fluxo de água e correnteza, típicos das áreas marginais de igapó (BARCELLOS, 1997; ARAÚJO, 1998), além do mais é uma espécie com hábito alimentar generalista com uma variação de preferência de crustáceos, insetos e pequenos teleósteos (SHIBUYA et al., 2009).

P. motoro possui ampla distribuição pela bacia Amazônica (CARVALHO et al., 2003), essa espécie atinge tamanho de 70 cm e possui segregação sexual. A espécie apresenta ciclo reprodutivo anual com período de cópula na seca, gravidez na enchente e parto no início da cheia (ARAÚJO, 2011). Durante esse período existe disputa de machos por fêmeas adultas para a cópula (Araújo, comunicação

peçoal). Seu habitat compreende áreas com fundo lamacento, onde existe a influência mais visível do fluxo de água (observação pessoal), além do mais a sua preferência alimentar é por crustáceos (SHIBUYA et al., 2009).

P. aiereba possui grande porte, atingindo até 130 cm de largura do disco e chegando a pesar mais de 60 Kg. Apresenta segregação sexual e segregação espacial por tamanhos, na qual jovens e sub-adultos de ambos os sexos tendem a ficar agregados na mesma área. Por outro lado, machos e fêmeas adultas encontram-se isolados em diferentes áreas (ARAÚJO, 1999; CHARVET-ALMEIDA et al, 2005). Esta espécie apresenta distribuição ampla ao longo da bacia Amazônica, sendo predominantemente explorada pela pesca comercial. Seu habitat preferencial se constitui de regiões de praias, com pouca intensidade de corrente de água (observação pessoal), além do mais o item preferencial dessa espécie são pequenos teleósteos (SHIBUYA et al., 2009).

Apesar desses aspectos diferenciados entre a maioria das características ecológicas e biológicas, não existe qualquer investigação sobre as interações e diferenças entre os aspectos fisiológicos e as características físico-químicas da água de seus locais de ocorrência natural. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo investigar o perfil fisiológico (hemograma, bioquímica plasmática, leucograma e trombograma), os parâmetros físicos e químicos da água, comparando e correlacionando ecologicamente entre as arraias *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O arquipélago de Mariuá é considerado o maior conjunto de ilhas de água doce do mundo, com um total de aproximadamente 1.600 ilhas que abriga uma rica biodiversidade de peixes ornamentais, incluindo as arraias *Potamotrygon* sp (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*. Entre os anos de 2006 a 2011 um total de 114 animais foram capturas com auxílio de rede de mão (rapichê) e lanterna de cabeça, com prévia autorização (Licença N^o 15116-1) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Após a captura os animais foram anestesiados com Eugenol (0,2 g/L) e os

procedimentos de manuseio e coleta sanguínea seguiram as recomendações de Oliveira et al., (2012).

A classe de tamanho foi determinada a partir da largura do disco (LD), nas arraiais *Potamotrygon* sp. a classificação seguiu as recomendações de Araújo (1998), nas arraiais *P. motoro* foi seguida as recomendações de Araújo (1999) e nas arraiais *P. aiereba* foram seguidos as recomendações de Araújo (2011). Após a determinação do peso corporal e do comprimento total (CT), todas as arraiais foram devolvidas para os locais onde foram capturadas. Os animais capturados foram classificados com sendo neonatos ou jovens, sendo um total de 38 da espécie de *Potamotrygon* sp, 51 de *P. motoro* e 25 de *P. aiereba*.

O sangue coletado foi dividido em duas alíquotas, uma para a determinação do hemograma, leucograma e trombograma, e outra para obtenção do plasma e posterior dosagem dos constituintes bioquímicos e dos íons plasmáticos. No hemograma a contagem de eritrócitos (RBC) foi determinada em câmara de Neubauer, o hematócrito (Ht) foi determinado pelo método do microhematócrito e a concentração de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina. A partir desses dados foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas seguindo as recomendações de Oliveira (2008) o qual foi utilizada para a determinação do trombograma e leucograma. As extensões foram utilizadas para a contagem total de leucócitos e de trombócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006), bem como para a contagem diferencial dos leucócitos que se baseia na contagem de 200 tipos leucocitários e posterior determinação do percentual de cada tipo celular existente.

O plasma foi obtido após centrifugação a 750 G, este foi congelado em nitrogênio líquido (-86°C) até o momento das análises bioquímicas. As variáveis da bioquímica plasmáticas tais como a glicose, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais e uréia foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos quantificados por kits comerciais (Doles, GO, Brasil) específicos para cada parâmetro. A dosagem dos íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram analisados por

fotometria de chama (Micronal b462, Brasil) e os níveis de cloreto (Cl⁻) por método colorimétrico usando kit comercial (Doles, GO, Brasil).

Amostras de água para a avaliação das propriedades físico-químicas, como temperatura (°C), pH, condutividade (µS/cm) e oxigênio dissolvido (mg/L), foram determinados no local de captura de cada animal, utilizando-se aparelho digital multi-paramétrico. Amostras de águas foram coletadas e armazenadas em gelo e posteriormente transportadas a laboratório para análise de outros parâmetros, como dureza (mg/L), alcalinidade (mg/L), amônia total (mg/L) e nitrito (mg/L), seguindo metodologia previamente descrita por Boyd; Tucker (1992). Os níveis de sódio (mEq/L) e potássio (mEq/L), foram analisados em amostras de água preservadas e refrigeradas trazidas do campo para análise por fotometria de chama (BOYD; TUCKER, 1992), utilizando o aparelho Micronal B 462. Para averiguação das interações ou diferenças dos aspectos hematológicos e das propriedades físicas e químicas da água foi empregado a estatística multivariada exploratória por meio da análise de componentes principais (PCA). Essas análises foram divididas em hemograma (6 variáveis), bioquímicas plasmática (5 variáveis), íons plasmáticos (3 variáveis), trombograma e leucograma (10 variáveis) e propriedades físico-químicas da água (10 variáveis), as interações foram consideradas significativas quando a soma dos eixo X e Y foram maiores ou iguais a 60%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da LD e do peso corpóreo estão representados na Tabela 1, o que demonstram que as arraias *Potamotrygon* sp., são as menores entre as arraias estudadas. A PCA do hemograma (Figura 1) das três espécies de arraias estudadas revelou um total 72,92% de variação, constituindo-se em um sistema de diferenciação na demanda por oxigênio, haja vista, os estudos realizados que investigaram o hemograma de arraias de água doce, associaram a série vermelha a atividade e capacidade respiratória (OLIVEIRA, 2008; LEMOS, 2011; BRITO, 2012). A arraia *Potamotrygon* sp. apresenta uma clara diferenciação no eixo X quando comparada a *P. aiereba*, por outro lado *P. motoro* constitui-se como uma espécie intermediária que apresenta as características do hemograma interagindo tanto com *Potamotrygon* sp. quanto com *P. aiereba*. Oliveira (2013) retratou que existe

diferença de habitats entre essas três espécies, sendo que *Potamotrygon* sp. é uma espécie que tem preferência por áreas de igapós, *P. aiereba* tem preferência por praias e *P. motoro* habita áreas intermediárias entre os igapós e as praias, classificadas por ele como áreas de fundo lamacento. Esses aspectos de diferenciação de ambiente de preferência corroboraram a PCA obtida no presente estudo e confirmam que essas espécies podem ser diferenciadas quando se considerar as variáveis referentes ao hemograma.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão para a biometria em neonatos e jovens das arraias *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba* do Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Variáveis	<i>Potamotrygon</i> sp.	<i>P. motoro</i>	<i>P. aiereba</i>
Largura do disco (cm)	.888 \pm 1.60	23.30 \pm 5.40	23.54 \pm 3.99
Comprimento total (cm)	16.78 \pm 2.37	40.37 \pm 9.02	38.05 \pm 7.41
Peso corpóreo (g)	46.80 \pm 22.57	654.90 \pm 451.21	641.20 \pm 289.19

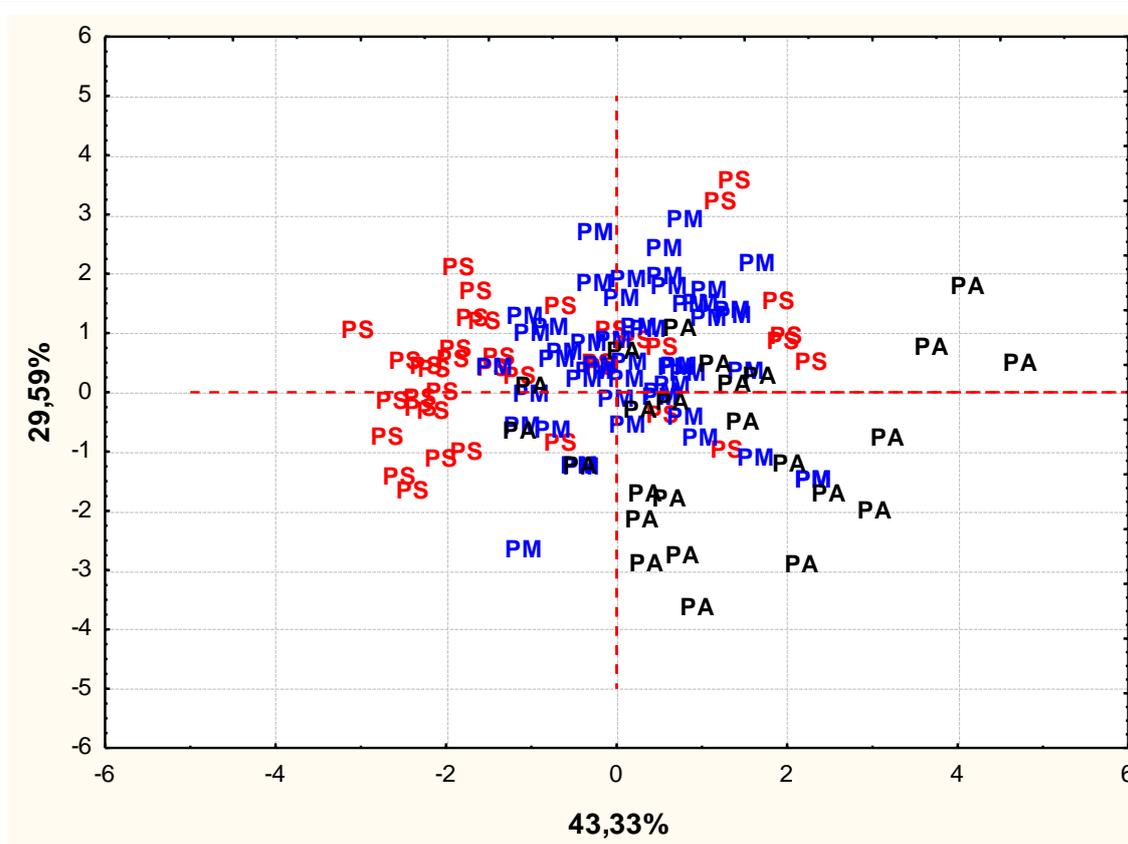


Figura 1. Análise de PCA do hemograma de *Potamotrygon* sp. (PS), *P. motoro* (PM) e *P. aiereba* (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

A PCA da bioquímica plasmática e dos íons estão representados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A interação entre as variáveis bioquímica demonstram um total de 64,67% dos fatores o qual foi possível diferenciar, quando se considera o eixo X, principalmente a arraia *Potamotrygon* sp de *P. aiereba*, tendo *P. motoro* com os aspectos mais próximos a *Potamotrygon* sp, mais ainda tendo uma aspecto de intermediária entre as demais, similares aos resultados encontrados no hemograma o qual foi associada ao hábitat preferencial (OLIVERA, 2013), bem como pela preferência alimentar (SHIBUYA et al., 2009) nessa PCA. Nos íons houve uma similaridade entre as espécies o qual haviam sido descritos por Oliveira (2013), bem como em trabalhos descritos por Duncan et al., (2009), haja vista as águas do rio Negro possuem baixas concentrações de íons (DUNCAN; FERNANDES, 2011).

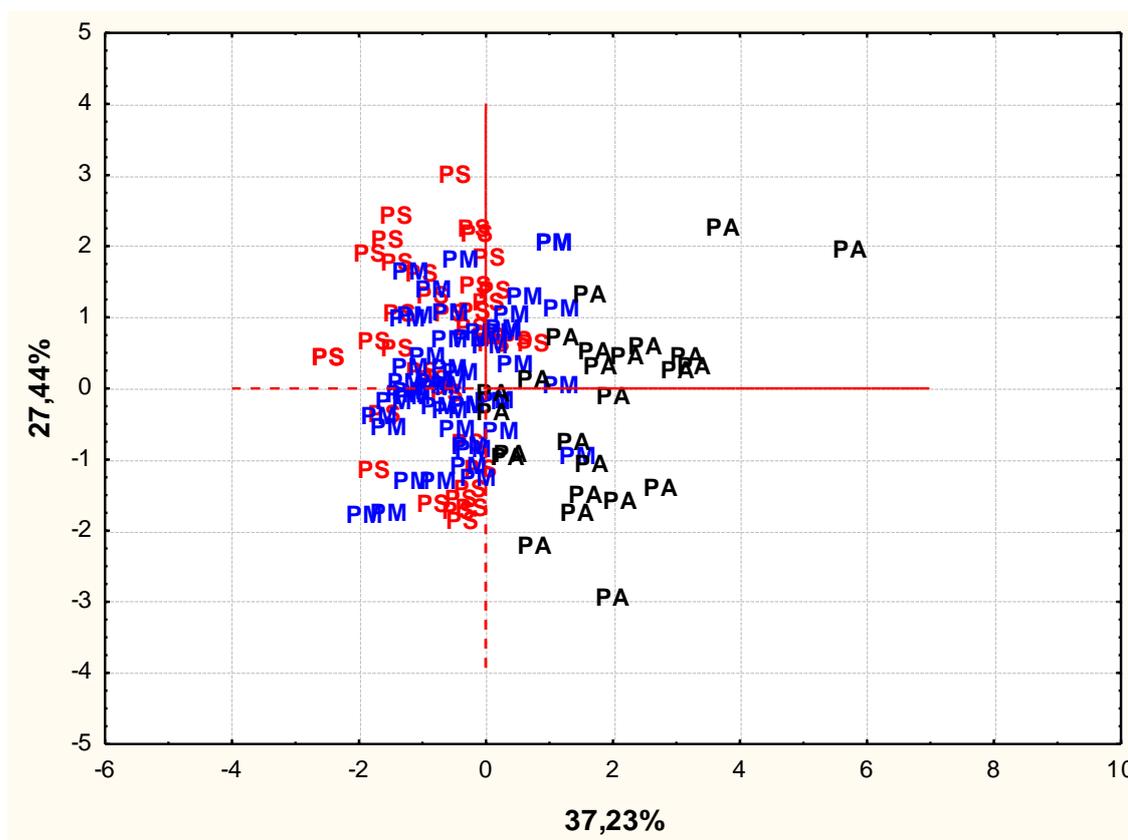


Figura 2. Análise de PCA da bioquímica plasmática de *Potamotrygon* sp. (PS), *P. motoro* (PM) e *P. aiereba* (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

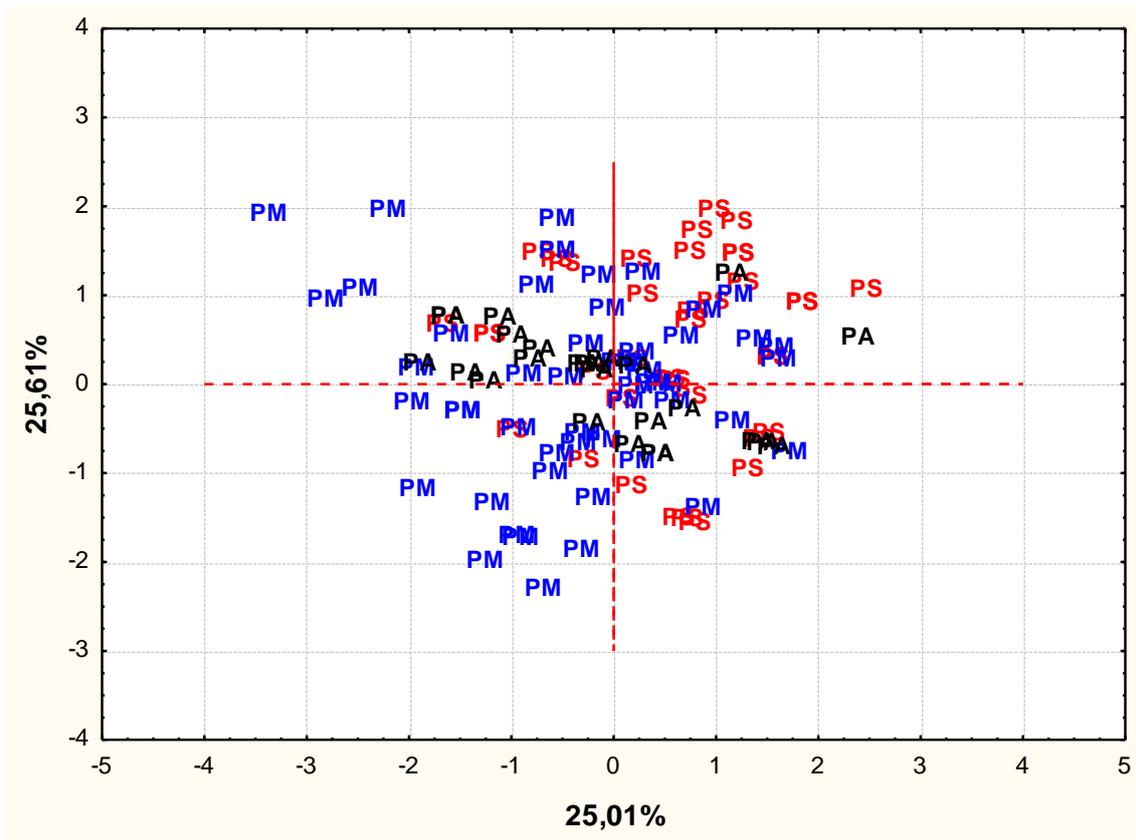


Figura 3. Análise de PCA dos íons de *Potamotrygon* sp. (PS), *P. motoro* (PM) e *P. aiereba* (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

A análise do PCA do leucograma e trombograma (Figura 4) apresentou valores de diferenciações de 57,43%, o qual não se pode considerar que as arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba* possuam sistemas imunológicos diferentes, essa característica também foi retratado por Oliveira (2013) que afirmou que esse possui um caráter conservador. Entretanto de acordo com a Figura 4, fica nítido que *P. motoro* apresenta um padrão similar a outras espécies, porém, um padrão diferente que não é constituído pelas demais espécies também é característica da figura, este deve tratar-se de um ajuste no sistema imunológico dessa espécie, haja vista em muitas vezes *P. motoro* é capturada nas áreas preferência de *Potamotrygon* sp. e *P. aiereba*.

A figura 5 demonstra o PCA das propriedades da água dos locais de captura das arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*, este foi constituído por 68,57% de diferenciação que se constituiu principalmente no eixo x (49,44%).

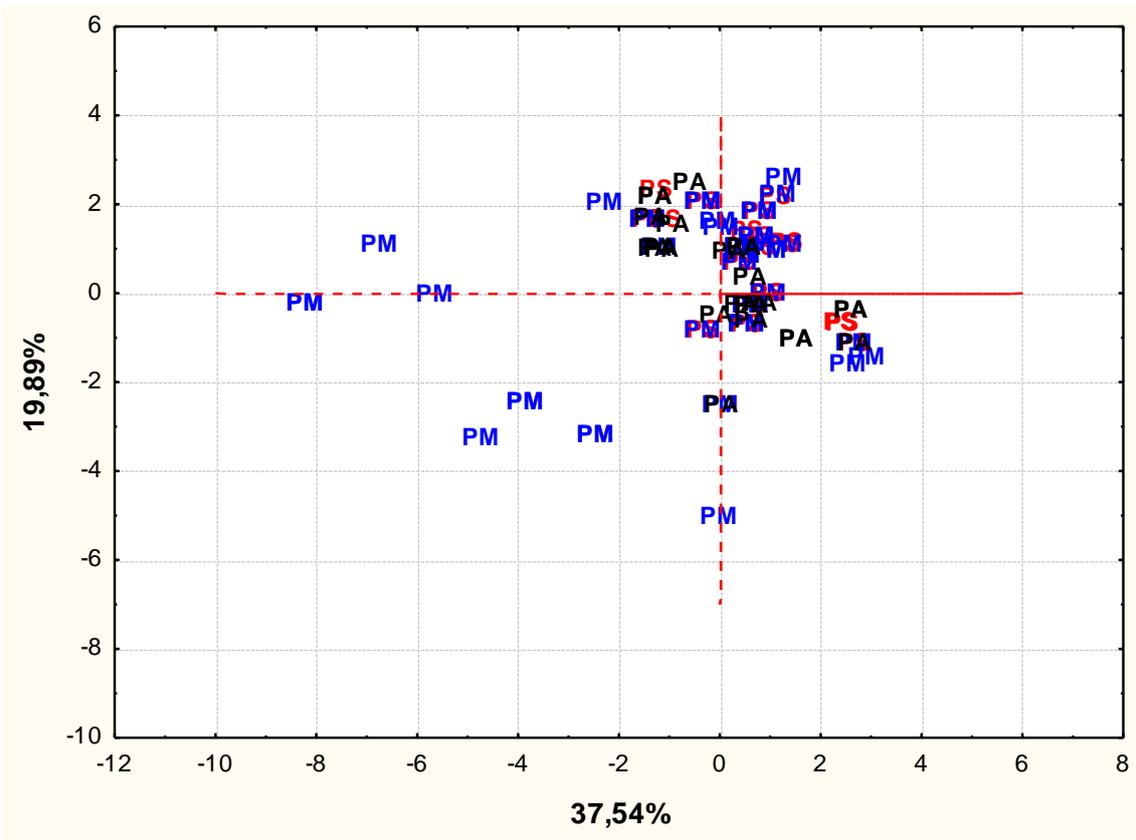


Figura 4. Análise de PCA do trombograma e leucograma de *Potamotrygon* sp. (PS), *P. motoro* (PM) e *P. aiereba* (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

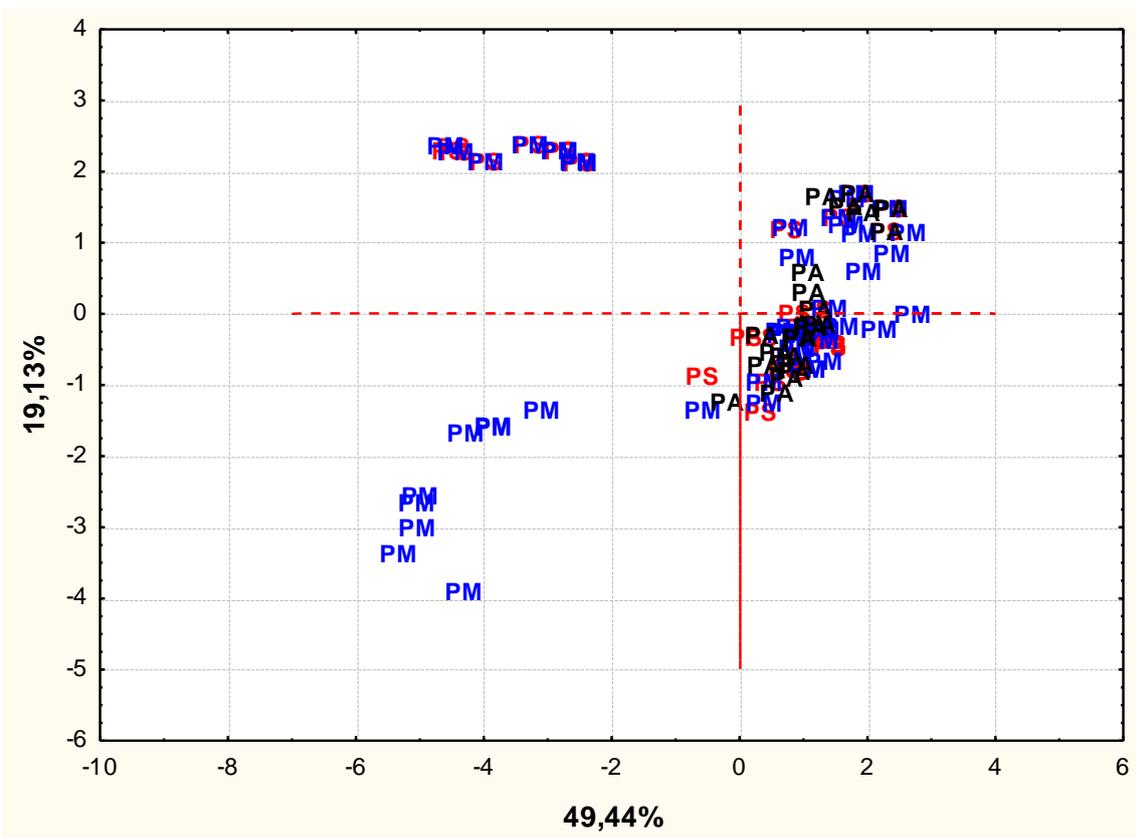


Figura 5. Análise de PCA das propriedades da água dos locais de ocorrência de *Potamotrygon* sp. (PS), *P. motoro* (PM) e *P. aiereba* (PA) coletados no Médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

É possível confirmar que *P. motoro* tem a capacidade de habitar as áreas preferências de *Potamotrygon* sp. e *P. aiereba*, além do mais esta possui uma localidade que as demais arraias não são encontradas. Esses resultados confirmam os dados obtidos no hemograma e na bioquímica do plasma do presente estudo.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho evidência a integração entre os aspectos biológicos, ecológicos, hematológicos e das propriedades das águas dos locais de ocorrência de arraias de água doce da Amazônia. Este permite concluir que a arraia *Potamotrygon* sp., apresenta padrões diferenciados de *P. aiereba*, além do mais *P. motoro* é mesmo uma espécie que apresenta características intermediárias entre as descritas, o qual pode ser considerada uma espécie com distribuição mais ampla em seus aspectos ecofisiológicos, que podem ser empregados em investigações que evidenciem o manejo e a conservação.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM, processos 925/03, 2203/05, 2204/05, 2459/08 e 126/08) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos 486289/2006-0, 40872/2006-4 e 408795/2006-9). O autor principal agradece a concessão da bolsa de Doutorado fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. 1998. 171 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA, Manaus, 1998.
- ARAÚJO, M. L. G. Plano de Monitoramento de arraias de água Doce. 1999. 31 p. Convênio IBMA-AM/ACEPOAM. 1999.

- ARAÚJO, M.L.G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20, info 08, p. 1-6, 2004.
- ARAÚJO, M.L.G. Dinâmica de população e conservação de *Paratrygon aiereba* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas 2011. 106 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus. 2011.
- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, uréia e conteúdo de oxigênio no sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). 1997. 67p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 1997.
- BRITO, F.M.M. Variáveis hematológicas, hormonais, bioquímicas, séricas e fauna parasitária em quatro espécies de raias do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) de vida livre. 2012. 55 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2012.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Auburn University, 183 p, 1992.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). *In*: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (orgs.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América. Porto Alegre, Edipucrs, p. 22-28, 2003.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. *J. Northw Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165-171, 2005.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; ARAÚJO, M.L.G.; FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 74, p. 956-960, 2009.
- DUNCAN, W.P.; INOMATA, S.O.; FERNANDES, M.N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Instrução Normativa Nº. 204/2008.
- LEMO, J.R.G. Índices parasitários e parâmetros fisiológicos de arraias cururu (*Potamotrygon* cf. *histris*) exportadas como peixes ornamentais: ferramentas para avaliação do estado de saúde da espécie. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2011.
- OLIVEIRA, A.T. Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 202 p., 2013.
- OLIVEIRA, A.T.; LEMO, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C; ARAÚJO, M.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias. Embrapa Amapá, Macapá, 18p, 2012.
- OLIVEIRA, A.T. Caracterização hematológica de *Potamotrygon* cf. *histris*: subsídios ao manejo e conservação da espécie. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 118 p, 2008.
- SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle

Negro River, Amazonas, Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4, n. 4, p. 466- 465, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus*, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. Hidrobiológica, 16(3): 273-276, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

Nos últimos anos houve um avanço significativo no conhecimento sobre as arraias de água doce, entretanto, ainda existe uma diversidade por ser descoberta e descrita na família Potamotrygonidae. A exploração sobre as arraias de água doce é mais lucrativa quando estas são usadas como animais de aquarofilia, o sistema de cotas brasileiro é um mecanismo viável para a manutenção de populações de potamotrigonídeos em ambientes naturais, entretanto, deve ocorrer o aumento da fiscalização para reduzir ou eliminar a comercialização ilegal. Existe uma grande aversão as arraias de água doce de uma maneira geral, as pessoas não sabem de sua importância e de como elas podem ser utilizadas para obtenção de renda. Medidas que visem o esclarecimento sobre os potamotrigonídeos devem ser empregadas nas cidades que são banhadas por bacias onde existe esse recurso. Ampla variação citogenética foi observada nos potamotrigonídeos, além do mais foi detectado o sistema XX/XY nesse grupo de elasmobrânquios. Os potamotrigonídeos exploram diversos habitats em sistema natural, vem sendo observado em outro sistema diferente dos locais de origem natural invasão por esses organismos. Entre os aspectos biológicos estudados até o presente momento os aspectos alimentares e a parasitologia são os onde existem maior informações. Os aspectos alimentares e a parasitologia variam de acordo com a espécie ou ainda de acordo com a bacia de ocorrência. Notoriamente os aspectos da biologia reprodutiva são complexos e existe uma semelhança aos mamíferos do que a peixes teleósteos. Os aspectos fisiológicos são ainda pouco elucidados, existindo investigações principalmente nos ajustes regulatórios, bem como na caracterização e identificação de células sanguíneas. As informações disponíveis até o momento na literatura são essenciais para esse grupo de elasmobrânquios que ocorrem naturalmente apenas na América do sul, servindo para futuras práticas em trabalhos de pesca, aquicultura, ecologia, genética, evolução, manejo e principalmente para a conservação.

Devem ser considerados sempre os procedimentos mais seguros para o manuseio adequado de arraias de água doce durante a obtenção de amostras biológicas, incluindo a colheita de sangue, evitando assim a ocorrência de acidentes graves com os ferrões desses animais aquáticos. Portanto, recomenda-se a colheita de sangue de arraias de água doce por punção do vaso branquial devido a maior segurança para o manipulador, pela facilidade, precisão e rapidez nesse

procedimento. Além disso, a punção do vaso branquial reduz o sofrimento dos animais, causado geralmente pelo estresse de manuseio e pela contenção mecânica fora da água.

Em arraiais *Potamotrygon* sp., para a conservação de amostras de sangue não é recomendado o uso de citrato de sódio 3.2%, que demonstrou ser um anticoagulante pouco eficiente. Porém, para a determinação da glicose plasmática e do eritrograma os anticoagulantes usados não influenciaram os parâmetros analisados, embora durante a contagem microscópica dos eritrócitos em câmara de Neubauer se tenha observado amostras com sinais de coagulação quando usado EDTA 10%, heparina 2.500 e 5.000 UI. Apesar disso, não houve alterações no RBC, VCM e CHCM. Para a dosagem de proteínas totais em plasma sanguíneo o anticoagulante ideal é a heparina 2.500 e 5.000 UI. Portanto, esses resultados indicam que para evitar qualquer sinal de coagulação do sangue deve ser coletar amostras diretamente com qualquer uma dessas concentrações de anticoagulantes.

É possível que todas as arraiais de água doce apresentem eritrócitos, eritroblastos, trombócitos, linfócitos, monócitos, heterófilos e basófilos, o que se constitui em um caráter conservados da família Potamotrygonidae quando considerado os tipos celulares sanguíneos (CANFIELD, 1998). A morfologia e o tamanho dos diferentes tipos celulares são similares aos de tubarões e arraiais marinhas. A caracterização dos diferentes tipos leucocitários e de trombócitos em arraiais de água doce providencia um conhecimento básico desses tipos celulares e podem ser correlacionados com as condições de saúde desses animais que são de extrema importância na aquarioria do estado do Amazonas.

A composição citoquímica revelou que os heterófilos são as células mais importantes do sistema imunológico dos potamotrigonídeos, uma vez que apresentaram glicogênio, lipídios e proteínas básicas, sendo estas diretamente relacionadas à atividade fagocítica. Os aspectos ultraestruturais revelam que trombócitos e principalmente os heterófilos são células ricas organelas citoplasmática, além do mais existe um padrão conservador nos aspectos ultraestruturais das células das arraiais *Potamotrygon* sp., *Potamotrygon motoro* e *Paratrygon aiereba*.

Na arraia cururu o estágio de desenvolvimento é um fator importante para diferenciar as propriedades hematológicas bem como as propriedades da água,

portanto, deve-se ter cuidado ao fazer comparações com outras espécies. Entretanto nas arraias *P. motoro* e *P. aiereba* essa característica biológica não exerce influência tanto sobre as características hematológicas quanto sobre as características da água. Ao confrontar os aspectos hematológicos e as características da água entre as arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*, pode-se observar um caráter conservador entre as espécies, principalmente sobre as características do leucograma e trombograma. Em relação às propriedades da água apenas indivíduos subadultos e prenhas possuem diferenças nas propriedades da água, esses resultados ressaltam que dentro de uma mesma bacia a hematologia e as propriedades físicas e químicas da água não são diferenciadas entre as arraias *Potamotrygon* sp., *P. motoro* e *P. aiereba*, oriundas do Arquipélago de Mariuá, Amazonas.

Existe uma evidência a integração entre os aspectos biológicos, ecológicos, hematológicos e das propriedades das águas dos locais de ocorrência de arraias de água doce da Amazônia. Este permite concluir que a arraia *Potamotrygon* sp., apresenta padrões diferenciados de *P. aiereba*, além do mais *P. motoro* é mesmo uma espécie que apresenta características intermediárias entre as descritas, o qual pode ser considerada uma espécie com distribuição mais ampla em seus aspectos ecofisiológicos, que podem ser empregados em investigações que evidenciem o manejo e a conservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ACHENBACH, G.M.; ACHENBACH, S.V.M. Notas acerca de algunas especies de raya fluvial (Batoidei, Potamotrygonidae) que frecuentan el sistema hidrografico del Paraná médio en el departamento La Capital (Santa Fe – Argentina). Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino, v. 8, p. 1-34, 1976.
- ADEYEMO, O.K.; OKWILAGWE, O.O.; AJANI, F. Comparative assessment of sodium EDTA and heparin as anticoagulants for the evaluation of haematological parameters in cultured and feral African catfish (*Clarias gariepinus*). Braz. J. Aquat. Sci. Technol., 13(1):19-24, 2009.
- ALLEN, P. Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* Steindachner and the effects of heparin on these. Comp. Biochem. Physiol., 106A: 355- 358, 1993.
- ALMEIDA, M.P.; BARTHEM, R.B.; VIANA, A.S.; CHARVET-ALMEIDA, P. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4 n. 1, p. 1-11, 2009.
- ALMEIDA, M.P.; LINS, P.M.O.; CHARVET-ALMEIDA, P.; BARTHEM, R.B. Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). Brazilian Journal Biology, v. 70, n. 1, p. 155-162, 2010.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL,A.L.; WALKER, I. Long-and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: *Biology of tropical fishes*. VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. pp. 185-206. Manaus, 1999.
- ALVARENGA, F.M.S.; LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Absence of metazoan gill parasites on *Potamotrygon falkneri* (Potamotrygonidae) and its ecological implications in the upper Paraná River floodplain, Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 4, n. 4, p. 589-592, 2009.
- ANTONIAZZI, M.M.; BENVENUTI, L.A.; LIRA, M.S.; JARED, S.G.S.; GARRONE NETO, D.; JARED, C.; BARBARO, K.C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stinger of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. Toxicon, v. 57, p. 297-303, 2011.
- ARAGORT, W.; ALVAREZ, M.F.; LEIRO, J.L.; SANMARTÍN, M.L. Blood protozoans in elasmobranchs of the family Rajidae from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 63-68, 2005.
- ARAÚJO, M.L.G. Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas. 1998. 171 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /INPA, Manaus, 1998.
- ARAÚJO, M. L. G. Plano de Monitoramento de arraias de água Doce. Convênio IBMA-AM/ACEPOAM, 31 p, 1999.
- ARAÚJO, M.L.G. Resultados do Monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no Rio Tapajós. 39 p. Relatório Técnico N° 01, 2004.
- ARAÚJO, M.L.G. Dinâmica de população e conservação de *Paratrygon aiereba* (Chondrichthyes-Potamotrygonidae) no médio Rio Negro, Amazonas 2011. 106 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus. 2011.

- ARAÚJO, M.L.G.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC 20, info 08, p. 1-6, 2004.
- ARAÚJO, M.L.G.; DUNCAN, W.L.P.; MELO, S.V. Plano de monitoramento de arraias de água doce. Relatório Final, 78 p., 2005.
- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Veterinary Clinical Pathology* 34, 115, 123, 2005.
- AZEVEDO, A.; LUNARDI, L.O. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of turtle (*Chrysemys dorbignii*). *Acta Histochemica*, 105, 99-105, 2003.
- BARCELLOS, J.F.M. Amônia, uréia e conteúdo de oxigênio no sangue de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). 1997. 67p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 1997.
- BATISTA, W.S. Caracterização tecnológica e perfil de ácidos graxos em arraias de água doce. Dissertação (Mestrado). 2008. 62 p. Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2008.
- BITTNER, A.; LANG, S. Some aspects of the osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (*Potamotrygon hystrix*) - I. Serum osmolality, sodium and chloride content, water content, hematocrit and urea level. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 67, p. 9-13, 1980.
- BLAXHALL, P.C. The haematological assessment of health of freshwater fish. A review of selected literature. *J. Fish Biol.* 4: 593-604, 1972.
- BOLASINA, S.N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, Andrews, v. 14, n. 6, p. 569- 575, 2006.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Auburn University, 183 p, 1992.
- BRINN, R.P.; MARCON, J.L.; GOMES, D.M. ABREU, L.C.; BALDISSEROTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon* cf. *hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 162: 139-145, 2012.
- BRITO, F.M.M. Variáveis hematológicas, hormonais, bioquímicas, séricas e fauna parasitária em quatro espécies de raias do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) de vida livre. 2012. 55 p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2012.
- BROOKS, D.R.; THORSON, T.B. Two tetraphyllidean cestodes from the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* Duméril, 1852 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Colombia. *Journal of Parasitology*, v. 62, p. 943–947, 1976.
- BROOKS, D.R.; MAYES, M.A.; THORSON, T.B. Systematic review of cestodes infecting freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) including four new species from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v. 48, n. 1, p. 43–64, 1981.
- BROOKS, D.R. Origins, diversification, and historical structure of the helminth fauna inhabiting neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae). *Journal of Parasitology*, v. 78, n. 4, p. 588–595, 1992.
- BROOKS, D.R.; AMATO, J.F.R. Cestode parasites in *Potamotrygon motoro* (Natterer) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from southwestern Brazil,

- including *Rhinebothroides mclennanae* n. sp. (Tetraphyllidea: Phyllobothriidae), and a revised host-parasite checklist for helminths inhabiting neotropical freshwater stingrays. *Journal of Parasitology*, v. 78, p. 393–398, 1992.
- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A.L. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35(4): 471-476, 2004.
- CANFIELD, P.J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal* 76, 793-800, 1998.
- CAIRA, J.N.; HEALY, C.J. Elasmobranchs as hosts of metazoan parasites. In: CARRIER, J.C.; MUSICK, J.A.; HEITHAUS, M.R. (Ed.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. p. 523-551, 2004.
- CAMPBELL, R.A.; MARQUES, F.; IVANOV, V. A. *Paroncomegas araya* (Woodland, 1934) n. gen. et comb. (Cestoda: Trypanorhyncha: Eutetrarhynchidae) from the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* in South America. *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 2, p. 313–320, 1999.
- CARRIER, J; MUSICK, J.A.; HEITHAUS, M.R. *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, 2004.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2776, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.N.; ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (orgs.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central América*. Porto Alegre, Edipucrs, p. 22-28, 2003.
- CARVALHO, M.R.; RAGNO, M.P. Na Unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. Nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis avulsos de Zoologia*, v. 51, n. 7, p. 101-138, 2011.
- CARVALHO, M.R.; PEREZ, M.H.S.; LOVEJOY, N.R. *Potamotrygon tigrina*, a new species of freshwater stingray from the upper Amazon basin, closely related to *Potamotrygon schroederi* Fernandes-Yépez, 1958(Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2827, p. 1-30, 2011.
- CASALETTI-ROSA, L.; LUNARDI, L.O. Comparative study of the localization of nonspecific esterase activity (Naphthyl butyrate) in leucocytes from reptiles, birds and fish. *Brazilian Journal of Morphology Science* 14, 72, 1997.
- CASTEX, M.N. Uma nueva especie de raya fluvial: *P. labradori*. *Neotropica*, v. 9, n. 30, p. 117-121, 1963.
- CASTEX, M.N. Estado actual de los estudios sobre la raya fluvial neotropical. *Ver. Mus. Prov. Cs. Nat. Santa Fé. Número extraordinário del cincuentenario*, p. 9-34, 1964.
- CASTEX, M.N. Bases para el estudio de las rayas de água dulce del sistema Amazônico. Nuevas sinonímias de "*Potamotrygon motoro*" (M. H., 1841). *Atlas do Simpósio sobre a biota Amazônica*, v. 3, p. 89-92, 1967.
- CAXTON-MARTINS, A.E. Cytochemical studies of cell population in peripheral blood smears of two west African teleosts. *Journal Anat*, 128:2, 269-276, 1979.
- CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba*. EDUA, Manaus, 2001.

- CHARVET-ALMEIDA, P. Ocorrência, biologia e uso das raias de água doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). 2001. 213 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Pará/ UFPA, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P. Resultados do monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no rio Xingu. 2004. 45 p. Relatório Técnico, 2004.
- CHARVET-ALMEIDA, P. História natural e conservação das raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no médio rio Xingu, área de influência do projeto hidrelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil). 2006. 376 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba/ UFPB, 2006.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R.S.; ALMEIDA, M.P. *Paratrygon aiereba*: A multi-species complex (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists*. Tampa, Flórida, 2005a.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon basin. *J. Northw Atl. Fish. Sci.*, v. 35, p. 165-171, 2005b.
- CLARKE, S.; WHITMORE, D.H.; MCMAHON, R.F. Considerations of blood parameters of largemouth bass, *Micropterus salmonides*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 14:147-158, 1979.
- CLEWLEY, A.; KOCAN, R.M.; KOCAN, A.A. An intraerythrocytic parasite from the spiny dogfish, *Squalus acanthias* L., from the Pacific Northwest. *Journal of Fish Diseases* 25, 693-696, 2002.
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. *Journal Aquatic of Science* 7, 62-90, 1995.
- COOPER, A.R.; MORRIS, S. The blood respiratory, haematological, acid-base and ionic status of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*, during recovery from anaesthesia and surgery: a comparison with sampling by direct caudal puncture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 119: 895-903, 1998.
- CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). 2006. Twenty-second meeting of the Animals Committee, Lima (Peru), 7–13 July 2006, AC22 Doc. 17.4, Conservation and management of sharks: species affected by trade. Disponível em <http://www.cites.org/eng/com/ac/22/E22-17-4.pdf> (Acessado em 18/02/2013).
- CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). 2009. Twenty-fourth meeting of the Animals Committee, Geneva (Switzerland), 20-24 April 2009, AC24 Doc. 14.2, Conservation and management of sharks and stingrays: regional workshop on South American freshwater stingrays. Disponível em <http://www.cites.org/common/com/AC/24/EFS24-14-02.pdf> (Acessado em 18/02/2013).b
- COMPAGNO, L.J.V.; COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: OETINGER, M.I. & ZORZI, G.D. (eds.). *The Biology of freshwater elasmobranchs*. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, p. 7: 62-90, 1995.
- CRUZ, V.P. Estudos citogenéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na bacia superior do rio

- Paraná. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/ UNESP, Botucatu, São Paulo, 2009.
- CRUZ, V.P.; SHIMABUKURO-DIAS, C.K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ in *Potamotrygon* aff. *motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 9, n. 1, p. 201-208, 2011.
- DAMATTA, R.A.; RIBEIRO, M.L.S.; CARVALHO, T.M.U.; NASCIMENTO, J.L.M. *Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes*. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Tavares-Dias, M. Embrapa, Amapá, Macapá, 314-329, 2009.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional ecology* 22, 760-772, 2008.
- DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *CR Biologie*, v. 329, p. 483-493, 2006.
- DOMINGUES, M.V.; MAQUES, F.P.L. Revision of *Potamotrygonocotyle* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Platyhelminthes: Monogenoidea: Monocotylidae), with descriptions of four new species from the gills of freshwater stingrays *Potamotrygon* spp. (Rajiformes: Potamotrygonidae) from the La Plata river basin. *Systematic Parasitology*, v. 67, n. 3, p. 157-174, 2007.
- DOMINGUES, M.V.; PANCERA, N.C.M.; MARQUES, F.P.L. Monogenoideans parasites of freshwater stingrays (Rajiformes, Potamotrygonidae) from the Negro River, Amazon, Brazil: species of *Potamotrygonocotyle* (Monocotylidae) and *Paraheteronchocotyle* (Hexabothriidae). *Folia Parasitologica*, v. 54, p. 177-190, 2007.
- DOMINGUES, M.V.; MARQUES, F.P.L. Phylogeny and taxonomy of *Potamotrygonocotyle* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Monogenoidea: Monocotylidae) with a description of four new species. *Journal of Helminthology*, v. 1, p. 1-28, 2010a.
- DOMINGUES, M.V.; MARQUES, F.P.L. *Ergasilus trygonophilus* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) from state of Pará, Brazil. *Sociedade Brasileira de Zoologia*, v. 27, n. 5, p. 829-833, 2010b.
- DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.; CLAUSS, T.M. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark *Rhincodon typus*. *Aquatic Biology* 9, 177-183, 2010.
- DUFTY, A.M.; CLOBERT, J.; MOLDER, A.P. Hormones, developmental plasticity and adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 17, 190-196, 2002.
- DUNCAN, W.L.P. Habitat, morfologia branquial e osmorregulação das arraias de água doce da bacia Amazônica (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). 2008. 173 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar, São Paulo, 2008.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; ARAÚJO, M.L.G.; FERNANDES, M.N. Ionic regulation and Na^+K^+ -ATPase activity in gills and kidney of the freshwater *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, v. 74, p. 956-960, 2009.

- DUNCAN, W.P.; INOMATA, S.O.; FERNANDES, M.N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 5, n. 2, p. 13-22, 2010a.
- DUNCAN, W.P.; COSTA, O.T.F.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Functional morphology of the Gill in Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): implications for adaptation to freshwater. *Physiological and Biochemistry Zoology*, 83(1): 19-32, 2010b.
- DUNCAN, W.P.; FERNANDES, M.N. Physicochemical characterization of the White, Black, and clearwater Rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(3): 454-464, 2010.
- ESTEBAN, M.A.; MUNOZ, J.; MESENGUER, J. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *The anatomical record* 258, 80-89, 2000.
- FREDERICO, R.G. Filogeografia e Conservação de *Paratrygon aiereba* Dumeril (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica. 2006. 67 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus. 2006.
- FORSTER, O.C. Impacto das arraias (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na população ribeirinha e demais frequentadores do Alto curso do rio Paraná e alguns afluentes. 2009. 86 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ UNESP, Botucatu, São Paulo, 2009.
- GARRONE NETO, D. Considerações sobre a reprodução de duas espécies de raias (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do Alto Rio Paraná, sudeste do Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 5, n. 1, p. 101-111, 2010.
- GARRONE NETO, D.; CARVALHO, L.C.N. Nuclear-follower foraging associations among Characiformes fishes and Potamotrygonidae rays in clean waters environments of Teles Pires and Xingu rivers basins, Midwest Brazil. *Biota Neotropica*, v. 11, n. 4, p. 359-362, 2012.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Acidentes Por Raias. *In*: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD JR., V. (Eds.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Second ed. Sarvier, São Paulo, p. 295–305, 2009,
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., V. Arraias em rios da região sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 82-88, 2010.
- GARRONE NETO, D.; SAZIMA, I. The more stirring the better: cichlid fishes associate with foraging potamotrygonid rays. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, n. 3, p. 499-501, 2009.
- GARRONE NETO, D.; HADDAD JR., 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, 2006.
- GARRONE NETO, D.; UIEDA, V.S. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 81-88, 2012.
- GRIFFITH, R.W.; PANG, P.K.T.; SRIVASTAVA, A.K.; PICKFORD, G.E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and diluted sea water. *Biology Bulletin*, v. 144, p. 304-320, 1973.

- HAYHOE, F.G.J.; QUALIGNO, D. *Haematological Cytochemistry*. London: Churchill Livingstone, 1994.
- HAYWARD, L.S.; WINGWELD, J.C. Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 365–371, 2004.
- HATTINGH, J. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology, Heidelberg*, v.355, n.4, p.347-352, 1975.
- HAWKEY, C.M.; DENNETT, T.B. *Color Atlas of Comparative Veterinary Hematology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 187 p, 1989.
- HINE, P.M.; WAIN, J.M. The enzyme cytochemistry of leucocytes in blood and haematopoietic tissues of holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 22:57-62, 1988.
- HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Digestive system. In: HAMLETT, W.C. *Sharks, skater and rays: the biology of elasmobranch fishes*. John Hopkins University Press, Baltimore, p. 144-173, 1999.
- HUNT, T.C.; ROWLEY, A.F. Studies on the reticulo-endothelial system of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. I. Endocytic activity of fixed cells in gills & peripheral blood leukocytes. *Cell and Tissue Research* 244, 215-226, 1986.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L. Age-Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet Clin Path* 30, 8-15, 2001.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1998. Portaria Federal Nº. 022/1998.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2005. Instrução Normativa Nº. 027/2005.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. Instrução Normativa Nº. 118/2006.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Instrução Normativa Nº. 204/2008.
- INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazônica*, 35(2): 289-295.
- INOUE, L.A.K.A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Biodiversidade Pampeana, Uruguaiana*, v. 2, p. 10-15, 2004.
- ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; HISANO, H.; JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M.L. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ciência Rural (UFSC. Impresso)*, v. 40, p. 1557-1561, 2010.
- ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; PIETRO, P.S.; HISANO, H. Procedimentos básicos para a colheita de sangue em peixes. *Circular Técnica (Embrapa Agropecuária Oeste)*, v. 17, p. 1-8, 2010.
- ISHIHARA, M.; TANIUCHI, T. A strange potamotrygonid Ray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Orinoco River System. In: OETINGER, M.I.; ZORZI, G.D. (eds.). *Biology of freshwater elasmobranchs*. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, v. 7, p. 62-90, 1995.
- IP, Y.K.; TAM, W.L.; WONG, W.P.; LOONG, A.M.; HIONG, K.C.; BALLANTYNES, J.S.; CHEW, S.F. A comparison of the effects of environmental ammonia exposure on the Asian freshwater stingray *Himantura signifer* and the

- Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 3625-3633, 2003.
- IVANOV, V. A. A new species of *Rhinebothroides* Mayes, Brooks & Thorson, 1981 (Cestoda: Tetracystidae) from the ocellate river stingray in Argentina, with amended descriptions of two other species of the genus. *Syst. Parasitol.*, Dordrecht, v. 58, p. 159-174, 2004.
- IVANOV, V.A. A new species of *Acanthobothrium* (Cestoda: Tetracystidae: Onchobothriidae) from the ocellate river stingray, *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), in Argentina. *The Journal of Parasitology*, v. 91, n. 2, p. 390-396, 2005.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA. 409 p, 1993.
- JEZINI, A.L. Eritrograma e bioquímica plasmática da arraia *Potamotrygon motoro* (Natterer in Müller and Henle, 1841) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas. 2011. 41 p. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, 2011.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27, 137-138, 1965.
- KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J.E.G.; IDOGE, E. Haematological characteristics of the African snakehead, *Parachanna obscura*. *African J. of Biotech.*, 4, 527-530, 2005.
- LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Digenea, Nematoda, Cestoda and Acanthocephala, parasites in Potamotrygonidae (Chondrichthyes) from the upper Paraná River floodplain, states of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List*, v. 4, n. 2, p. 115-122, 2008.
- LACERDA, A.C.F.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Ecology of endoparasites of the fluvial stingray *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazil. Journal Biology*, v. 69, p. 2, p. 297-303, 2009.
- LASSO, C.A.; RIAL, A.B.; LASSO-ALCALÁ, O. Notes on the biology of the freshwater stingrays *Paratrygon aiereba* (Müller and Henle, 1841) and *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Venezuelan llanos. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*. v. 2, n. 3, p. 39-52, 1996.
- LEMOES, J.R.G. Índices parasitários e parâmetros fisiológicos de arraias cururu (*Potamotrygon* cf. *histris*) exportadas como peixes ornamentais: ferramentas para avaliação do estado de saúde da espécie. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2011.
- LISON, L. *Lipides et lipoproteins*. Paris: Gauthier Villars. 184 p, 1960.
- LONARDONI, A.P.; GOULART, E.; OLIVEIRA, E.F.; ABELHA, M.C.F. Hábitos alimentares e sobreposição trófica das raias *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 3, n. 28, p. 195-202, 2006.
- LORENZI, T.F. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo: MDSI. 641p, 1999,
- 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* 117, 207-257, 1996.

- LOVEJOY, N.R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A.P. Marine incursion into South America. *Nature*, v. 396, p. 421-422, 1998.
- LUER, C.A.; WALSH, C.J.; BODINE, A.B. The Immune System of sharks, skates, and rays. In: *Biology of sharks and their relatives*. Carrier, J. C., Musick, J. A. & Heithaus, M. R. (eds.) New York, CRC Marine Biology, 369-389, 2004.
- LUCHETTI, N.M.; MARQUES, F.P.L.; CHARVET-ALMEIDA, P. A new species of *Potamotrygonocestus* Brooks & Thorson, 1976 (Eucestoda: Tetracystidae) from *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello & Thorson (Myliobatoidea: Potamotrygonidae) and a redescription of *Potamotrygonocestus chaoi* Marques, Brooks & Araujo, 2003. *Systematic Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 131-145, 2008.
- MAFUVADZE, B.; ERLWANGER, K.H. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinarski Archiv, Zagreb*, v.77, n.5, p.427- 434, 2007.
- MAINWARING, G.; ROWLEY, A.F. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology: part A: physiology*, v.80, n.1, p.85-91, 1985.
- MAGALHÃES, K.W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A.A.; MARQUES, E.E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: Potamotrygon cf. scobina and Potamotrygon gr. orbignyi. *Toxicon*, 47, 575-583, 2006.
- MARQUES, F.P.L. Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time. 2000. 325 p. Tese PhD, University of Toronto, 2000.
- MARQUES, F.P.L.; BROOKS, D.R.; ARAÚJO, M.L.G. Systematics and phylogeny of *Potamotrygonocestus* (Platyhelminthes, Tetracystidae, Onchobothriidae) with descriptions of three new species from freshwater potamotrygonids (Myliobatoidea, Potamotrygonidae). *Zoologica Scripta*, v. 32, p. 367–396, 2003.
- MARQUES, F.P.L.; BROOKS, D.R. Taxonomic review of *Rhinebothroides* (Eucestoda: Tetracystidae: Phyllobothriidae), parasites of freshwater stingrays (Rajiformes: Myliobatoidei: Potamotrygonidae). *The Journal of Parasitology*, v. 89, p. 944–1017, 2003.
- MAYES, M.A.; BROOKS, D.R.; THORSON, T.B. Two new species of *Acanthobothrium* van Beneden 1849 (Cestoidea: Tetracystidae) from freshwater stingrays in South America. *The Journal of Parasitology*, v. 64, p. 838–841, 1978.
- MAZIA, D.; BREWER, P.A.; ALFERT, M. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.*, v. 104, 57-67, 1953.
- MCCOMB, D.M.; GELSLEICHTER, J.; MANIRE, C.A.; BRINN, R.; BROWN, C.L. Comparative thyroid hormone concentration in maternal serum and yolk of the bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*) from two sites along the coast of Florida. *General and Comparative Endocrinology*. 144: 67-173, 2004.
- MENORET, A.; IVANOV, V.A. A new species of tetracystidean (Cestoda) from the Largespot River stingray, *Potamotrygon falkneri* (Potamotrygonidae: Chondrichthyes), from the Paraná basin. *J. Parasitol.*, v. 95, n. 4, p. 994–999, 2009.
- MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A.; RODRÍGUEZ, A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy research and technique* 57, 491-497, 2002.

- MIRACLE, A.L.; ANDERSON, M.K.; LITMAN, R.T.; WALSH, C.J.; LUER, C.R.A.; ROTHENBERG, E.V.; LITMAN, G.W. Complex expression patterns of lymphocyte-specific gene during the development of cartilaginous fish implicate unique lymphoid tissues in generating an immune repertoire. *International Immunology*, v. 13, n. 4, p. 567-580, 2001.
- MORAVEC, F. Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region. Praga: Academia, p. 210-212, 1998.
- MOREAU, M.A.; COOMES, O.T. Aquarium fish exploitation in western Amazonia: conservation issues in Peru. *Env Conserv.*, v. 34, p. 12–22, 2007.
- MORO, G.; CHARVET, P.; ROSA, R.S. Aspectos da alimentação da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da bacia do rio Parnaíba, Nordeste do Brasil. *Revista Nordestina de Biologia*, v. 20, n. 2, p. 47-57, 2011.
- MORO, G.; CHARVET, P.; ROSA, R.S. Insectivory in *Potamotrygon signata* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), an endemic freshwater stingray from the Parnaíba River basin, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, n. 4, p. 885-891, 2012.
- MORROW, W.J.W.; PULSFORD, A. Identification of peripheral blood leukocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. *Journal of Fish Biology* 17, 461-475, 1980.
- NIKINMA, A. Vertebrate red blood cells. Springer-Verlag. 262 p, 1990.
- NG, H.H.; TAN, H.H.; YEO, D.C.J.; NG, P.K.L. Stingers in a strange land: South American freshwater stingrays (Potamotrygonidae) in Singapore. *Biol Invasions*, v. 12, p. 2385-2388, 2010.
- ODDONE, M.C.; VELASCO, G.; CHARVET, P. Record of the freshwater stingrays *Potamotrygon brachyuran* and *P. motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) in the lower Uruguay River, South America. *Acta Amazonica*, v. 42(2): 299-304, 2012.
- OKUNO, T.; NELSON, C.A. Anticoagulant activity of heparin in intravenous fluids. *Journal of Clinical Pathology*, London, v.28, n.6, p.494-497, 1975.
- OLD, J.M.; HUVENEERS, C. Morphology of the blood cells from three species of wobbegong sharks (*Orectolobus* species) on the east coast of New South Wales. *Zoo Biology* 25, 73-82, 2006.
- OLIVEIRA, A.T. Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e estruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas, Brasil. 202 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2013.
- OLIVEIRA, A.T. Caracterização hematológica de *Potamotrygon* cf. *histris*: subsídios ao manejo e conservação da espécie. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas/ UFAM, Manaus, 2008.
- OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, W.R.; PANTOJA-LIMA, J.; ARAÚJO, S.B.; ARAÚJO, M.L.G.; MARCON, J.L.; TAVARES-DIAS, M. Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. *Veterinarski Arhiv*, 81(5): 657-670, 2011.
- OLIVEIRA, A.T.; LEMOS, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C; ARAÚJO, M.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias. Embrapa Amapá, Macapá, 18p, 2012.
- PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M. Características morfológicas, morfométricas e citoquímicas das células sanguíneas da arraia

- ocelata *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii, Potamotrygonidae): estudo de caso. *Ensaio e Ciência*, v. 14, n. 1, p. 147-158, 2010.
- PANTANO-NETO, J. Estudo preliminar da anatomia descritiva e funcional associada à alimentação em raias de água-doce (Potamotrygonidae, Myliobatiformes, Elasmobranchii). 2001. 92 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo/ USP, São Paulo, 2001.
- PARMA-CROUX, M.J. Some haematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Rev de Hydrobiologia Trop.* 27, 113-119, 1994.
- PAVLIDIS, M.; FUTTER, W.C.; KATHARIO, P.; DIVANACH, P. Blood cells of six Mediterranean mariculture fish species. *Journal Applied Ichthyology* 23, 70-73, 2007.
- PEDROSO, C.M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M.P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M.S.; HADDAD JR., V.; BARBARO, K.C.; ANTONIAZZI, M.M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, v. 50, p. 688–697, 2007.
- PERALTA, L.; SOLANO, A.; CARVALHO, J. R.; MATOS, E.; SERRA-FREIRE, N. M. Ocorrência de *Argulus juparanaensis* Lemos de Castro, 1950 (Branchiura, Argulidae) em arraia de fogo *Potamotrygon motoro* (Müller & Henlz, 1841) (Rajiformes: Potamotrygonidae) no Igarapé do Slito. *Entomología y Vectores*, v. 5, n. 1, p. 49-54, 1998.
- QUEIROZ, V.K.D. Caracterização e quantificação de ectoparasitas da arraia (*Potamotrygon cf. hystrix*) da comunidade Daraquá, Barcelos, AM. 2010. 46 p. Monografia em Licenciatura em Ciências Biológicas, Centro Universitário Nilton Lins, 2010.
- RASCHI, W.; MACKANOS, L.A. The structure of the Ampullae of Lorenzini in *Dasyatis garouaensis* and its implications on the evolution of the freshwater electroreceptive system. *Journal of Experimental Zoology*, v. 2, p. 101 -111, 1989.
- REGO, A.A.; DIAS, P.L. Estudos de cestóides de peixes do Brasil. 3ª nota: cestóides de raias fluviais Paratrygonidae. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 36, n. 4, p. 941–956, 1976.
- REYDA, F.B. Intestinal helminths of freshwater stingrays in southeastern Peru, and a new genus and two new species of cestode. *Journal of Parasitology*, v. 94, p. 684–699, 2008.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-215, 1963.
- RICKEY, J.E.; HEDGES, J.I.; DEVOL, A.H.; QUAY, P.D.; VICTORIA, R.; MARTINELLI, L.; FORSBERG, B.R. Biogeochemistry of carbon in the Amazon River. *Limnology and Oceanography*, 35: 352-371, 1990.
- RIJN, J.A.V.; REINA, R.D. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish & Shellfish Immunology*. 1-5, 2010.
- RINCON, G. Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no rio Paranã-Tocantins. Tese (Doutorado). 2006. 132 p. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/ UNESP, Rio Claro, São Paulo, 2006.
- RINCON, G.; CHARVET-ALMEIDA, P. O monitoramento da pesca ornamental de raias de água doce está sendo efetivo? Problemas e possíveis soluções nas esferas envolvidas. *Elasmovisor*, v. 9, p. 4- 6, 2006.

- ROSA, R.S. A systematic revision of the South American stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). 1985. 523 p. PhD Thesis. School of Marine Sciences. College of William and Mary, Virginia. University Microfilms International, Ann Arbor, Michigan, 1985.
- ROSA, R.S.; CASTELLO, H.P.; THORSON, T.B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, v. 2, p. 447-458, 1987.
- ROSA, R.S.; DE CARVALHO, M.R.; WANDERLEY, C.A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 1-8, 2008.
- ROSA, R.S.; CHARVET-ALMEIDA, P.; QUIJADA, C.C.D. Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays. In: CARRIER, J.F.; MUSICK, J.A. & HEITHAUS, M.R. Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation. CRC Press, p. 241-286, 2010.
- SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. *Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Tavares-Dias M. Embrapa, Amapá, Macapá, 330-345, 2009.
- SAUNDERS, D.C. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Transactions. American Microscopy Society* 85, 427-449, 1966.
- SCHÜTT, D.A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *Journal Applied Ichthyology*, 14:83-89, 1997.
- SHERBURNE, S. Cell types, differential cell counts, and blood cell measurements of a Portuguese shark, *Centroscymnus coelolepis*, captured at 700 fathoms. *Fishery bulletin* 71, 435-439, 1973.
- SHIBUYA, A. Morfologia funcional dos mecanismos de alimentação em raias Myliobatoidei, com ênfase em espécies de Potamotrygonidae do médio Rio Negro. 2009. 142 p. Tese (Doutorado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 2009.
- SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 4, n. 4, p. 466- 465, 2009.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J.; ARAÚJO, M.L.G.; TANAKA, S. Morphology of lateral line canals in Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Negro River, Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, n. 4, p. 867-876, 2010.
- SHIBUYA, A.; ZUANON, J. Catfishes as prey items of potamotrygonid stingrays in the Solimões and Negro rivers, Brazilian Amazon. *Biota Neotropica*, v. 13, n.1: <http://www.biotaneotropica.org.br/v13n1/en/abstract?short-communication+bn0321301>, 2013
- SHIBUYA, A.; ZUANO, J.; TANAKA, S. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 189-196, 2012.
- SILVA, A.G.C.; GOULART, E. Morfometria de raias continentais (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 29, n. 4, p. 413-419, 2007.

- SILVA, T.B.; UIEDA, V.S. Preliminary data on the feeding habits of the freshwater stingrays *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. *Neotropica*, v. 7, n. 1, p. 221-226, 2007.
- STOSKOPF, M. Hematology of Elasmobranchs. In: Schalm's Veterinary Hematology. WEISS, JM & J WARDROP, Wiley-Blackwell, 6th ed., 1013-1017, 2010.
- SUDAGARA, M.; MOHAMMADIZAREJABADA, A.; MAZANDARANIA, R.; POORALIMOTLAGHA, S. The efficacy of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2009.
- SOUZA, F.K.S.; BARBOSA, R.P.; FREITAS, C.E.C. Peixes do médio Rio Negro uma abordagem ecológica: Manaus, EDUA, 2006.
- SVOBODOVÁ, Z.; KROUPOVÁ, H.; MODRÁ, H.; FLAJSHANS, M.; RANDÁK, T.; SAVINA, L.V.; GELA, D. Haematological profile of common carp spawners of various breeds. *J App Ichth* 24, 55-59, 2008.
- SVOBODOVA, Z.; PRAVDA, D.; PALACKOVA, J. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Edition Methods N. 22, 31 p, 1991.
- TANIUCHI, T.; ISHIHARA, H. Anatomical comparison of clasper of freshwater stingrays (Dasyatidae and Potamotrygonidae). *Japan Journal of Ichthyology*, v. 37, n. 1, p. 10–16, 1990.
- TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 68, 1822–1833, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J.F.M. Peripheral blood cells of the armored Catfish *Hoplosternum littorale* HANCOCK, 1828: A morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 26, 157-162, 2005.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scientiarum* 26, 157-162, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal* 19, 103-110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpress: Ribeirão Preto, SP. 144p, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus*, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica* 16, 273-276, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 49-54, 2007a.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology* 71, 383–388, 2007b.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). *Ciência Animal Brasileira*, v.11, 205-224, 2010.

- TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenosomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Scientiarum* 26, 73–80, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M.; REZENDE, P.C.B. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Veterinarski Arhiv* 77, 355-363, 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S.R. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências*, v.7, n. 2, 205-224, 2009.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Acta Scientiarum: biological science*, Maringá, v.20, n.2, p.151-155, 1998.
- TESHIMA, K.; TAKESHITA, K. Reproduction of the freshwater stingray, *Potamotrygon magdalenae* taken from the Magdalena River System in Colombia, South America. *Bulletin of Seikai National Fisheries Research Institute*, v. 70, p. 11–27, 1992.
- THORSON, T.B.; COWAN, C.M.; WATSON, D.E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, v. 158, p. 375 -377, 1967.
- THORSON, T.B. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. failure to concentrate urea when exposed to saline medium. *Life Science*, v. 9, n. 11, p. 893-900, 1970.
- THORSON, T.B.; WOOTON, R.M.; GEORGI, T.A. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biology Bulletin*, v. 154, p. 508 -516, 1978.
- THORSON, T.B.; LANGHAMMER, J.K.; OETINGER, M.I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 9, n. 1, p. 3–24, 1983.
- TOFFOLI, D. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na bacia amazônica. 2006. 126 p. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 2006.
- TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; ARAÚJO, M.L.G.; ALMEIDA, M. P.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FARIAS, I.P. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetic and Molecular Biology*, 31: 324–336, 2008.
- TUDOR, M. Preliminary evaluation of α – aminolevulinic acid dehydratase in blood of lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) from the middle Adriatic. *Institut za Oceanografiju i ribarstvo* 55, 1-5, 1984.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (*Tilapia*) *niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277, 2001.
- VAL, A.L.; AFFONSO, E.G.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Adaptive features of Amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus* cf. *nigricans*, Osteichthyes). *Physiological Zoology* 65(4): 832-843, 1992.
- VALE, A.; AFFONSO, A.; SILVA, M.T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 183-198, 2002.
- VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): la série blanca. *Gayana* 67, 130-136, 2003.

- VASCONCELOS, H.C.G.; OLIVEIRA, J.C.S. Alimentação de *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) na planície de inundação da APA do Rio Curiaú, Macapá-Amapá-Brasil. *Biota Amazônia*, v. 1, n. 2, p. 66-73, 2011.
- VALENTIM, F.C.A. Citotaxonomia de arraiais de água doce (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) da bacia amazônica Central. 2012. 77 p. Tese (Doutorado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ INPA, Manaus, 2012.
- VALENTIM, F.C.A.; FALCÃO, J.N.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Chromossomes of three freshwater stingrays (Rakiformes Potamotrygonidae) from the Rio Negro basin, Amazon, Brazil. *Genetica*, v. 128, p. 33-39, 2006.
- VÁZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell* 39, 151-160, 2007.
- VAZZOLER, A.E.A.M.; MENEZES, N.A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). *Brazilian Journal Biology*, v. 52, p. 627-640, 1992.
- VEIGA, M.L.; EGAMI, M.I.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18(2): 245-250, 2000.
- VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; NETO, S.W. Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. 303 p, 1998.
- WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C: toxicology and pharmacology*, Elmsford, v.146, n.3, p.331-335, 2007.
- WALSH, C.J.; LUER, C.A. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: *The elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives*. Smith, M.; Warmolts, D.; Thoney, D.; Hueter, R. Columbus (eds.), Ohio Biological Survey. 307-323, 2004.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 475-478, 1958.
- WILHELM FILHO, D.; EBLE, G.J.; KASSNER, G.; CAPRARIO, F.X.; DAFRET, A.L.; OHIRA, M. Comparative Hematology in Marine Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102, 311-321, 1992.
- WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y.O.; GONZALEZ, R.J.; WILSON, R.W.; PATRICK, M.L.; VAL, A.L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 3039- 3054, 2002.
- ZAIDEN, S.F.; BRINN, R.P.; MARCON, J.L.; URBINATI, E.C. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon* cf. *histris*. *Zygote*, p. 1-9, 2010.
- ZAPATA, A.G.; CHIBA, A.; VARAS, A. Cells and tissues of the immune system of fish. In: G. IWAMA; T. NAKANISHI (eds.). *The fish immune system. Organism, pathogen, and environment*. Academic Press, San Diego, California, p. 1-62, 1996.
- ZINKL, J.G.; COX, W.T.; KONO, C.S. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative haematology international*, 1:187-195, 1991.