



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAPHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAPHIA

RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE DE CAPTURA E PERMANÊNCIA NO
ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA *Ginglymostoma cirratum* (BONNATERRE 1778)
CAPTURADOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

MARIA CAROLINA FERRAZ DA SILVA

RECIFE, 2016



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Tecnologia e Geociências
Departamento de Oceanografia
Programa de Pós-graduação em Oceanografia

RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE DE CAPTURA E PERMANÊNCIA NO
ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA *Ginglymostoma cirratum* (BONNATERRE 1778)
CAPTURADOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Maria Carolina Ferraz da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (PPGO - UFPE) como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia, na área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin

Recife

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

S586r Silva, Maria Carolina Ferraz da.
Resposta fisiológica ao estresse de captura e permanência no espinhel em
tubarões-lixia *Ginglymostoma cirratum* (BONNATERRE 1778) capturados
no Estado de Pernambuco / Maria Carolina Ferraz da Silva. -2016.
56 folhas, il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2016.

Inclui Referências.

1. Oceanografia. 2. Elasmobrânquios. 3. Pesca. 4. Hematologia.
5. Ferramentas fisiológicas. 6. Conservação. I. Hazin, Fábio Hissa
Vieira (Orientador). II. Título.

551.46 CDD (22. ed.)

UFPE/BCTG/2016-232

Mestrado em Oceanografia

RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE DE CAPTURA E PERMANÊNCIA NO
ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA *Ginglymostoma cirratum* (BONNATERRE 1778)
CAPTURADOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Maria Carolina Ferraz da Silva

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 31 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin (Orientador) – Presidente
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Lúcia Góes Araújo – Titular Externo

Profa. Dra. Sigrid Neumann Leitão – Titular Interno
Universidade Federal de Pernambuco

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota d’água no mar, mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.**

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

À minha família. Minha mãe, meu pai e meus irmãos pela aprendizagem diária e amor incondicional. Que apesar de todas as nossas diferenças sempre me apoiaram. Amo vocês!

Ao meu orientador Dr. Fábio Hazin, por todo apoio, compreensão, aprendizado e principalmente pela confiança depositada em mim. Obrigada!

Ao André Afonso pelas importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Cleyton Carvalho, pelos diversos esclarecimentos e pela grande colaboração na análise das amostras.

Ao Professor Francisco Leite, pela valiosa contribuição, disponibilidade e aprendizado em grande parte deste trabalho.

À minha amiga e parceira de trabalho, Beth, por toda ajuda na coleta das amostras.

Às minhas queridas amigas de laboratório e da vida, Manu, Ilka, Nat, Nanda e Camila, por todo apoio, carinho e amizade. Amo vocês!

Aos chefes de expedição e pescadores do Bp. Sinuelo e do Bp. Pedrinho, sem vocês esse trabalho não teria sido realizado!

A todos os integrantes dos Laboratórios de Tecnologia Pesqueira (LATEP) e Oceanografia Pesqueira (LOP).

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia.

Ao meu namorado Bruno, por todo amor, dedicação e paciência durante este período da minha vida. Amo você!

A todos os amigos e familiares, que sempre foram tão importantes na minha vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar prováveis alterações fisiológicas relacionadas ao estresse de captura com espinhel em tubarões-lixá *Ginglymostoma cirratum* capturados nas praias do Recife e Região Metropolitana. Para tal, a dissertação foi dividida em dois capítulos que abrangem técnicas diferentes para análise do estresse de captura em tubarões. No primeiro capítulo, foi analisada a resposta secundária ao estresse de captura a partir de uma metodologia já bem estabelecida, por meio da análise dos principais íons e metabólitos presentes no sangue. Os animais foram capturados utilizando dois espinhéis lançados próximo ao canal existente entre as praias de Boa viagem, Piedade e Paiva. Diferenças significativas entre os animais capturados e o grupo controle, mantidos em aquários, foram encontradas apenas para os íons magnésio e cálcio. Em relação às diferenças sexuais nos animais capturados, apenas o metabólito lactato mostrou diferença significativa, tendo sido superior nas fêmeas. O íon potássio, apesar de também ter exibido índices superiores nas fêmeas, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Já no segundo capítulo, o objetivo foi identificar as células sanguíneas encontradas na circulação periférica de tubarões-lixá e utilizar parâmetros hematológicos como a relação entre granulócitos e linfócitos, a contagem diferencial de leucócitos e valores do hematócrito como possíveis indicadores de estresse nesses animais. Foram identificados eritrócitos, linfócitos, monócitos, trombócitos e os granulócitos eosinófilos, neutrófilos e heterófilos na circulação de tubarões-lixá. Apenas um basófilo foi encontrado. Houve significativo aumento na relação granulócito/linfócito (G/L) dos animais capturados em relação ao grupo controle. Os animais capturados apresentaram maior proporção de heterófilos e menor proporção de linfócitos, enquanto o grupo controle apresentou proporções inversas. As fêmeas capturadas apresentaram uma maior relação G/L e uma maior proporção de heterófilos, sugerindo uma resposta mais acentuada ao estresse de captura. Apesar das alterações observadas nos animais capturados, os tubarões-lixá parecem apresentar uma capacidade elevada de resiliência a situações de estresse causadas pela captura, uma vez que todos os animais capturados apresentaram boas condições após sua liberação.

Palavras-chave: elasmobrânquios, pesca, hematologia, ferramentas fisiológicas, conservação

ABSTRACT

This study aimed to analyze physiological changes related to the stress of capture of nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* caught by longline in the beaches of Recife. To this aim, the dissertation was divided into two chapters covering different techniques for the analysis of stress in sharks. In the first chapter, the secondary response to the stress of capture was analyzed by a well-established methodology, including the analysis of major ions and metabolites present in the blood. Significant differences between the animals caught and the control group, kept in aquarium, were found only for magnesium and calcium ions. With regard to sexual differences among the animals caught, the metabolite lactate was significantly higher in females. The potassium ion, although not significantly different, was also higher in females. In the second chapter, the objective was to identify the blood cells found in the peripheral circulation of nurse sharks and, using haematological parameters, such as the ratio of granulocytes and lymphocytes, the differential leukocytes count and hematocrit values assess the level of stress in these animals. The identified cells were erythrocytes, lymphocytes, monocytes, thrombocytes and granulocytes (eosinophils, neutrophils and heterophils). Only one basophil was found. There was a significant increase in the granulocyte/ lymphocyte (G/L) ratio in captured animals in relation to the control group. The captured animals showed a higher proportion of heterophils and a smaller proportion of lymphocytes, while the control group showed the opposite trend. Captured females showed higher G/L and a larger proportion of heterophils when compared with the captured males, suggesting a more pronounced stress response to capture. In spite of the changes observed in the animals caught, nurse sharks seem to have a high resilience to capture since all captured animals were in good condition at gear retrieval.

Keywords: elasmobranchs, fishing, conservation, hematology, physiological tools, conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do tubarão-lixia, <i>Ginglymostoma cirratum</i> (COMPAGNO, 2001)	15
Figura 2. Área de estudo com indicação das zonas de lançamento dos espinhéis (Adaptado de HAZIN; AFONSO, 2013)	19
Figura 3. Tubarão-lixia de cativeiro acomodado em tanque menor para a coleta sanguínea	20
Figura 4. Coleta sanguínea por punção caudal realizada nos tubarões-lixia	21

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Morfologia das células sanguíneas do tubarão-lixia (<i>G. cirratum</i>). Heterofilo (a), neutrófilo (b), linfócito (c), eosinófilo (d), eritrócitos (e), monócito (f), trombócitos (g) e eritroblasto (h)	38
Figura 2.2 Valores do hematócrito para animais capturados e grupo controle de tubarões-lixia	40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 Concentração sérica de íons em exemplares de *G. cirratum* capturados com espinhel e o grupo controle 25

Tabela 1.2 Concentração sérica dos parâmetros glicose, lactato, ureia e proteína total em exemplares de *G. cirratum* capturados com espinhel e o grupo controle 25

Tabela 1.3 Concentração sérica dos parâmetros analisados em machos e fêmeas de tubarões-lixia (*G. cirratum*) capturados com espinhel 26

Tabela 1.4 Concentração dos parâmetros analisados nos animais capturados, grupo controle e indivíduo que veio à óbito de tubarões-lixia (*G. cirratum*) capturados com espinhel 27

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Diferencial de leucócitos e relação G/L de tubarões-lixia (*G. cirratum*) dos animais capturados e grupo controle 39

Tabela 2.2 Valores da contagem diferencial de leucócitos e da relação G/L das fêmeas e machos de tubarões-lixia capturados 39

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
REVISÃO DE LITERATURA	15
METODOLOGIA GERAL	18
CAPÍTULO 1	
ALTERAÇÕES SÉRICAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE DE CAPTURA COM ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA (<i>Ginglymostoma cirratum</i>)	22
1.1 Introdução	22
1.2 Material e Métodos	23
1.3 Resultados	24
1.5 Discussão	28
CAPÍTULO 2	
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS COMO INDICADORES DO ESTRESSE DE CAPTURA COM ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA (<i>Ginglymostoma cirratum</i>)	33
2.1 Introdução	33
2.2 Material e Métodos	35
2.4 Resultados	35
2.5 Discussão	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO GERAL

A Classe Chondrichthyes, que inclui a subclasse Holocephali (quimeras) e a subclasse Elasmobranchii (tubarões e raias), possui atualmente cerca de 1.200 espécies, entre as quais 50 espécies de quimeras, mais de 600 espécies de raias e quase 500 espécies de tubarões, os quais estão, por sua vez, distribuídos em 10 Ordens, 60 Famílias e 186 Gêneros (COMPAGNO, 2001). Até o momento, na costa brasileira, são conhecidas 165 espécies de Chondrichthyes marinhos já descritos ou em revisão taxonômica, com 6 espécies de quimeras, 70 espécies de raias e 89 espécies de tubarões, distribuídos em 6 Ordens, 22 Famílias e 43 Gêneros (ROSA; GADIG, 2014).

Com uma história evolutiva de sucesso, datada do período Devoniano (há mais de 400 milhões de anos), os tubarões estão distribuídos em todos os oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, ocupando diversos ambientes pelágicos e costeiros, incluindo recifes de coral, estuários, talude, plataforma continental, desde a superfície até cerca de 3.000 m de profundidade (COMPAGNO, 1990). Por serem normalmente predadores de topo da cadeia alimentar e consumirem um grande espectro de organismos, estes animais desempenham uma importante função no ecossistema marinho, exercendo um papel fundamental no controle das populações de suas presas (CAMHI et al., 1998).

Algumas características de seu ciclo de vida, como crescimento lento, maturação sexual tardia, baixa fecundidade e alta longevidade (HOENING; GRUBER, 1990), tornam esses animais mais vulneráveis e susceptíveis à sobre-exploração. As principais ameaças aos elasmobrânquios atualmente são a atividade pesqueira, a destruição de habitats e a poluição do ambiente marinho.

A pesca, seja ela dirigida ou incidental, tem influenciado as populações de elasmobrânquios de maneira negativa em vários locais do mundo (CLARKE et al., 2004), situação que tem se agravado nas últimas décadas, em razão do crescimento de pescarias direcionadas a esse grupo. Medidas de gestão para reverter esse quadro têm sido adotadas, tanto por países isoladamente, como por organizações internacionais como a ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*) e a CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), entre as quais se inclui a obrigatoriedade de liberação dos tubarões que estejam vivos no momento do recolhimento do aparelho de pesca (NMFS, 2008).

Porém, a captura e permanência do animal no aparelho de pesca até o momento de sua liberação impõem uma série de fatores estressantes que podem comprometer

gravemente o seu equilíbrio fisiológico e a sua sobrevivência, podendo causar mortalidade mesmo que o animal seja liberado ainda com vida (SKOMAL, 2007).

O estresse pode ser definido como uma condição em que a homeostase de um organismo é alterada por estímulos intrínsecos ou extrínsecos, chamados estressores que são classificados como agudos ou crônicos (WENDELAAR-BONGA, 1997; SKOMAL; BERNAL, 2010). O estresse agudo é resultado da rápida exposição (minutos ou horas) a um determinado estressor. Já o estresse crônico resulta da exposição contínua (dias a semanas) a um ou mais fatores de estresse. Um tubarão exposto a um estressor agudo, como a captura e manipulação, por exemplo, pode posteriormente sofrer estresse crônico devido à capacidade reduzida para se alimentar ou a algum processo infeccioso secundário associado com trauma físico do anzol (SKOMAL; BERNAL, 2010).

Esta resposta ao estresse é integrada e desencadeada em cascata, podendo ser classificada em três níveis: primário, secundário e terciário (MAZEAUD et al., 1977). A resposta primária é neuroendócrina, levando a um rápido aumento nos níveis dos hormônios do estresse, como catecolaminas e corticosteroides plasmáticos (SKOMAL; MANDELMAN, 2012), que induzem a uma série de efeitos secundários, relacionadas às mudanças em parâmetros como glicose, lactato e íons plasmáticos, além de parâmetros hematológicos, como o hematócrito e contagens diferenciais de leucócitos. Por fim, a resposta secundária pode evoluir para um estresse crônico que pode ter efeitos terciários e influenciar o crescimento, a reprodução, mudanças no comportamento, e até mesmo o aumento da susceptibilidade a doenças, podendo trazer graves consequências no nível populacional (WENDELAAR-BONGA, 1997; COOK et al., 2002; SKOMAL, 2007).

Em resposta ao estresse agudo, logo nos primeiros momentos (segundos a minutos), os hormônios catecolaminas são rapidamente secretados na corrente sanguínea com a função de mobilizar e manter os níveis adequados de substratos energéticos e o fornecimento de oxigênio durante períodos de estresse e recuperação metabólica (RANDALL; PERRY, 1992). Nos peixes teleósteos, o cortisol é na maioria das vezes o hormônio usado para quantificação da resposta primária (ROMERO, 2002), porém nos elasmobrânquios o cortisol não está presente, sendo a sua função, aparentemente, realizada pela 1- α -hidroxicorticosterona (HAZON & BALMENT, 1998). Infelizmente, os efeitos deste hormônio ainda são pouco estudados em elasmobrânquios, devido, em grande parte, à dificuldade de sua mensuração (GELSLEICHTER, 2004).

Devido à importância dos íons na manutenção da homeostase e garantia da integridade celular, sódio, potássio, cloreto, magnésio, cálcio e fósforo, têm sido

normalmente utilizados como indicadores das respostas secundárias à captura, além de metabólitos como a glicose e o lactato (CLIFF; THURMAN, 1984; WELLS et al., 1986; HOFFMAYER; PARSONS, 2001; MANIRE et al., 2001, MANDELMAN; FARRINGTON, 2007, SKOMAL; MANDELMAN, 2012; GALLELGHER et al., 2014; OTWAY, 2015).

Entre as respostas secundárias, estão também alterações nos parâmetros hematológicos, como o hematócrito (WELLS et al., 1986) e distribuição das células sanguíneas (SEMEMIUK et al., 2009; PERSKY et al., 2012). Mais recentemente, a utilização de relações entre leucócitos também foi validada para tubarões como um indicador de estresse (VAN RIJN; REINA, 2010). Tais estudos já são utilizados em uma grande diversidade de outros grupos de vertebrados (OBERNIER; BALDWIN, 2006; GROSS; SIEGEL, 1983; GROOMBRIDGE et al., 2004; DAVIS; MAERZ, 2008), porém, ainda há poucos estudos sobre a influência do estresse de captura em parâmetros hematológicos e imunológicos de elasmobrânquios.

A compreensão das consequências biológicas relacionadas à pesca e captura de tubarões se torna especialmente importante para espécies que se encontram ameaçadas de extinção, como é o caso do tubarão-lixo *Gynghimostoma cirratum*. Embora esta espécie tenha sido considerada recentemente como 'ameaçado de extinção', em razão da redução significativa de algumas de suas populações (ROSA; GADIG, 2008), e sua pesca tenha sido proibida no Brasil (IBAMA, 2004), a mesma ainda ocorre com frequência na pesca artesanal, sem que haja praticamente qualquer fiscalização (SANTANDER-NETO et al., 2011).

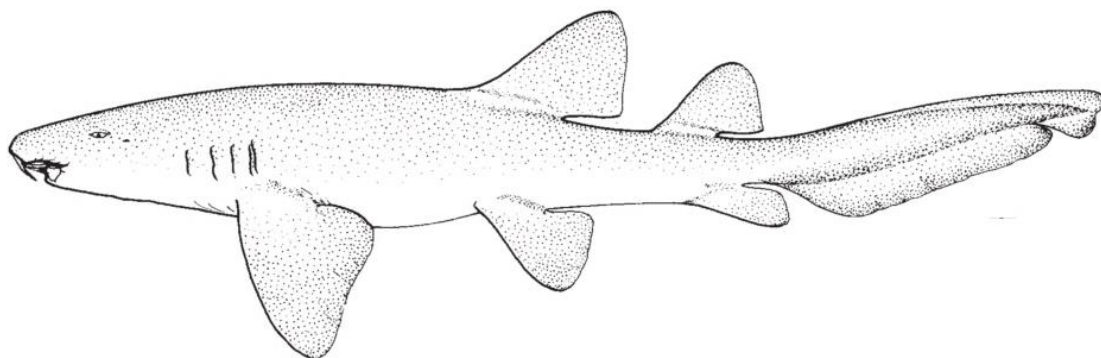
Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar e quantificar o nível de estresse em tubarões-lixo capturados com espinhel a partir da análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos, no intuito de avaliar as condições em que o animal se encontra após a captura e permanência no aparelho de pesca e se a resposta fisiológica a tal situação implica consequências mais graves à sua sobrevivência.

REVISÃO DE LITERATURA

O tubarão-lixo *Ginglymostoma cirratum* (Figura 1) pertence à ordem Orectobeliformes, na qual são conhecidas sete famílias no mundo e apenas duas no Oceano Atlântico. A família Ginglymostomatidae, à qual o tubarão-lixo pertence, é composta por três gêneros e quatro espécies (*G. cirratum*, *G. unami*, *Nebrius ferrugineus*, *Pseudoginglymostoma brevicaudatum*), dos quais somente a espécie *Ginglymostoma cirratum* ocorre no Brasil (GOMES et al., 2010; DEL MORAL-FLORES et al., 2015).

Conhecida popularmente também como lambaru, a espécie tem como principais características morfológicas: a boca terminal com barbilhões nasais moderadamente longos, olhos posteriores aos cantos da boca, espiráculos diminutos no mesmo nível dos olhos, e primeira nadadeira dorsal originando-se sobre ou imediatamente após a origem das nadadeiras pélvicas. As bordas das suas nadadeiras são arredondadas e a nadadeira caudal é alongada, correspondendo a cerca de 25% do comprimento total do corpo (COMPAGNO, 1984, 2001; GOMES et al., 2010). Na região dorsal apresenta uma coloração mais escura em tons de marrom, enquanto a região ventral possui uma coloração mais clara.

Figura 1. Desenho esquemático do tubarão-lixo, *Ginglymostoma cirratum* (COMPAGNO, 2001)



É uma espécie costeira, que habita plataformas continentais e insulares, com ampla distribuição no Oceano Atlântico, presente desde Rhode Island (EUA) até o sudeste do Brasil, e no Oceano Pacífico, desde o Golfo da Califórnia até o Peru. De hábito demersal, é encontrada em fundos rochosos e recifes de coral, ocorrendo desde águas bastante rasas até profundidades superiores a 100m (COMPAGNO, 1984; COMPAGNO, 2001; CASTRO, 2000). No Brasil, é mais abundante nas costas norte e nordeste, com o

limite de sua distribuição situando-se entre os estados de São Paulo e Paraná (GOMES et al., 2010).

Devido às suas características de hábito sedentário e bentônico, o tubarão-lixá é visto com grande frequência em aquários de exposição ao redor do mundo, com relatos de animais que chegaram a viver até quinze anos em cativeiro. Por ser uma espécie de adaptação relativamente fácil a ambientes confinados, o seu comportamento reprodutivo tem sido bastante observado e estudado, a exemplo de KLIMLEY (1980), que detalhou, de forma pioneira, as interações comportamentais de animais cativos, durante a época de reprodução.

CARRIER et al. (1994), por sua vez, descreveram o comportamento de tubarões-lixá no período de acasalamento, tendo sido observado, em alguns eventos, vários machos tentando copular com uma única fêmea.

Uma revisão sobre os principais aspectos biológicos da espécie foi realizada por CASTRO (2000), destacando informações relevantes como tamanho de maturação, período de gestação, ciclo reprodutivo, dieta, habitat, entre outros. Subsequentemente, CARRIER et al. (2003) analisaram a gestação e o potencial reprodutivo em tubarões-lixá por meio de ultrassonografia, observando uma gestação de no mínimo 131 dias e a presença de paternidade múltipla. A ocorrência de paternidade múltipla também foi observada por SAVILLE et al. (2002), a partir da análise de DNA, concluindo que a espécie utiliza este tipo de estratégia reprodutiva como um meio para assegurar a sua variabilidade genética. RÊGO et al. (2015), por sua vez, forneceram a primeira descrição histológica da espermatogênese para a espécie, relatando uma nova forma de desenvolvimento testicular.

A morfologia oral e a capacidade de sucção nestes animais já foram estudadas (MOTTA; WILGA, 1999; MOTTA et al., 2002). CASTRO (2000) em um estudo sobre a alimentação da espécie, que caracterizou a mesma como um predador oportunista, consumindo uma grande variedade de peixes pequenos, principalmente de peixes da família Haemulidae. Da mesma forma, segundo MATOTT et al. (2005), apesar da espécie apresentar uma especialização do aparelho bucal, não possui uma dieta especializada.

CARRIER & LUER (1990) encontraram taxas de crescimento parecidas em indivíduos selvagens, a partir de dados de marcação e recaptura, e em indivíduos mantidos em cativeiro, com uma média de 13.1 ± 9.5 cm/ano, diminuindo naturalmente com o aumento da idade. FERREIRA et al. (2011), estudando a espécie no litoral do Recife,

encontrou taxas de crescimento um pouco maiores com uma média de 15.77 ± 2.53 cm/ano, obtidas a partir de três espécimes recapturados.

A estrutura populacional do tubarão lixa foi avaliada a partir dos dados de desembarques de indivíduos capturados pela pesca artesanal no estado do Ceará por SANTANDER-NETO et al. (2011), com base em aspectos como tamanho e abundância, proporção sexual, incidência e sazonalidade nas capturas. Na Reserva Biológica do Atol das Rocas, CASTRO E ROSA (2005), avaliando a estrutura populacional da espécie a partir de imagens de marcas naturais para o reconhecimento individual, estimaram um tamanho populacional entre 339 e 368 indivíduos.

Trabalhos de marcação e recaptura em indivíduos de tubarões-lixas demonstram que a espécie apresenta movimento migratório relativamente restrito, pequena distribuição e alta fidelidade ao local em que são capturados (CARRIER; LUER, 1990; GARLA, 2004). No litoral do Recife, FERREIRA (2012) analisaram o uso do habitat por tubarões-lixas utilizando dados conjuntos de captura com espinhel e telemetria acústica, concluindo que a espécie esteve presente durante todo o ano na área monitorada, apesar de diferenças no uso do habitat entre os sexos. CREIO (2015), estudando a movimentação desta espécie também no litoral de Recife, com uso de marcas acústicas, confirmou um comportamento de fidelidade ao local, com a realização de eventuais migrações e um maior grau de atividade no período noturno, com a área de estudo sendo provavelmente um local de alimentação. Segundo COMPAGNO (1984), a espécie é geralmente inativa durante o dia, quando é normalmente encontrada próxima ao fundo, apresentando uma maior atividade durante a noite.

HYDER et al. (1983) realizaram estudos para definir os tipos, morfologia e funções específicas das células sanguíneas em tubarões-lixas. Estudos mais atuais, como o de WALSH & LUER (2004), descreveram também as células sanguíneas encontradas na sua circulação periférica. NAPOLEÃO (2007), por exemplo, realizou análises hematológicas, bioquímicas e hormonais em tubarões-lixas em aquários, no intuito de estabelecer valores de referência para vários parâmetros sanguíneos úteis na determinação das condições ótimas de saúde para tubarões mantidos em cativeiro.

GARLA et al. (2006) determinou valores médios de onze parâmetros séricos (glicose, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, cálcio, fosfato, proteína total, albumina, globulina e aspartato aminotransferase/AST) do *G. cirratum* e outras duas espécies de tubarão, *Carcharhinus perezi* e *Negaprion brevirostris*, no Arquipélago de Fernando de Noronha, com alguns dos parâmetros obtidos apresentando variações entre as espécies

que podem tanto estar relacionadas com as condições de obtenção, processamento e armazenamento das amostras em campo como a diferentes respostas ao estresse de captura.

Nenhum trabalho até o momento analisou parâmetros que reflitam os níveis de estresse em tubarões-licha capturados pela pesca. Trabalhos deste escopo, porém, são indispensáveis em razão do nível elevado de ameaça enfrentado pela espécie, sendo fundamental a compreensão dos possíveis riscos à sobrevivência de espécimes que venham a ser eventualmente liberados após a sua captura, considerando-se que a sua pesca se encontra atualmente proibida no país (IBAMA, 2004). Embora a legislação vigente determine que esses animais sejam devolvidos ao mar quando capturados, não se dispõe de nenhuma informação sobre as suas condições fisiológicas e de sobrevivência pós-soltura.

METODOLOGIA GERAL

Área de estudo

A área de estudo abrangeu o litoral do Recife e Região Metropolitana (08°34'S e 34°52'W), incluindo as praias do Pina, Boa Viagem, Piedade, Candeias e Paiva, todas sob a influência do sistema estuarino do Rio Jaboatão. A região apresenta um clima úmido e tropical, com duas estações claramente definidas, uma chuvosa, entre os meses de março e agosto, e uma seca, entre setembro e fevereiro (COUTINHO et al., 1998). A temperatura da água do mar varia de 24°C nos meses chuvosos a 30°C na estação seca (HAZIN et al., 2008). A plataforma continental é estreita, pouco recortada e relativamente plana, com um declive abrupto entre 60 e 80 m de profundidade (KEMPF, 1970).

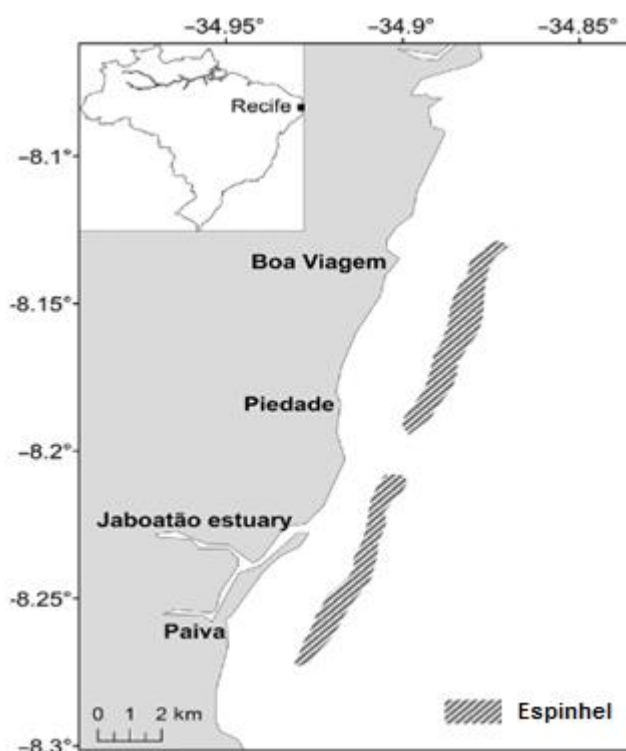
Captura dos indivíduos

A captura dos animais, entre os meses de fevereiro e dezembro de 2014, foi realizada com a utilização de dois espinhéis de fundo, cada um com 4 km de comprimento e 100 anzóis circulares 17/0, lançados no canal existente entre a Praia do Pina e a Praia do Paiva (HAZIN et al., 2008). Os espinhéis eram lançados no período vespertino e recolhidos durante as primeiras horas da manhã do dia seguinte (Figura 2).

Os tubarões capturados foram classificados de acordo com a sua condição em: (1) boa – rápida natação quando liberado; (2) regular - natação lenta quando liberado ou (3) morto. Apenas animais capturados com o anzol na boca foram embarcados para o procedimento de coleta sanguínea (Figura 4). Para tal procedimento, os mesmos eram

acomodados em uma piscina montada no convés do barco (3 m x 1 m), sendo a coleta sanguínea realizada imediatamente após o embarque.

Figura 2. Área de estudo com indicação das zonas de lançamento dos espinhéis (Adaptado de HAZIN; AFONSO, 2013)



Grupo controle

Os valores considerados basais foram obtidos a partir de amostras sanguíneas coletadas de tubarões-licha mantidos em cativeiro no Aquário Natal. Os animais utilizados neste estudo, normalmente, são mantidos em uma piscina para exibição com 300.000 litros de água, porém, no dia da coleta sanguínea foi realizada a limpeza da piscina da qual foi retirada parte da água e os animais foram acondicionados, separadamente, em tanques menores (Figura 3). O procedimento da coleta sanguínea foi realizado assim que os animais foram colocados nos tanques menores para evitar qualquer nível de estresse relacionado ao confinamento. Os animais não apresentavam qualquer alteração comportamental no momento da coleta e todo o procedimento foi acompanhado pelo veterinário do Aquário Natal.

As variáveis da água do tanque onde os animais são mantidos apresentam-se próximas dos níveis ideais recomendados por MOHAN e AIKEN (2004) para elasmobrânquios em cativeiro (temperatura de 22°C, nitrito de 0,25 mL/L-1, amônia de 0,25 mL/L-1 e pH de 7,5).

A alimentação é oferecida aos tubarões a cada dois dias e os itens alimentares consistem basicamente de peixes como, bagre, galo, sardinha, coró, raia entre outros. Os animais foram alimentados 48 horas antes da coleta sanguínea.

Figura 3. Tubarão-lixo de cativeiro acomodado em tanque menor para a coleta sanguínea



Coleta sanguínea

Todos os animais, capturados e grupo controle, tiveram o sangue coletado por punção caudal, seguindo a metodologia proposta por STOKOSPF et al. (1984), utilizando seringas de 20 mL com calibre de 1,60 x 40 mm (Figura 4). O sangue coletado foi colocado em tubos secos para as análises bioquímicas e em tubos com o anticoagulante EDTA para as análises hematológicas, acomodados em isopor com gelo e posteriormente levados ao laboratório.

Figura 4. Coleta sanguínea por punção caudal realizada nos tubarões-lixas (*G. cirratum*)



CAPÍTULO 1: ALTERAÇÕES SÉRICAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE DE CAPTURA COM ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA (*Ginglymostoma cirratum*)

1.1 Introdução

Globalmente, a pesca tem impactado negativamente inúmeras populações de tubarões, expondo estes animais uma série de fatores estressantes que podem comprometer gravemente a sua sobrevivência, uma vez que, mesmo o animal sendo liberado com vida após o recolhimento do aparelho de pesca, o estresse imposto pela captura, manipulação, luta no anzol e exposição ao ar causam alterações substanciais em sua fisiologia com efeitos potencialmente letais (WOOD, 1983; SKOMAL, 2007).

A análise de variáveis que possam elucidar como estes animais respondem do ponto de vista fisiológico a tais interações pode esclarecer os padrões de vulnerabilidade e a capacidade das diferentes espécies de se recuperarem do estresse imposto pelas capturas (GALLAGHER et al., 2014; COOKE et al., 2013). Ferramentas fisiológicas que permitam a análise das consequências da captura de tubarões pelas pescarias são, portanto, essenciais para uma melhor gestão deste importante grupo zoológico (SKOMAL, 2007), o qual já inclui diversas espécies ameaçadas de extinção (DULVY et al. 2014).

Devido à importância na manutenção da homeostase e garantia da integridade celular, íons como sódio, potássio, cloreto, magnésio, cálcio e fósforo, além de metabólitos, como lactato e glicose, encontrados no plasma sanguíneo, são frequentemente utilizados como indicadores da resposta fisiológica ao estresse de captura em tubarões (CLIFF; THURMAN, 1984; WELLS et al., 1986; HOFFMAYER; PARSONS, 2001; MANIRE et al., 2001; SPARGO, 2001; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007; FRICK et al., 2010, MARSHALL et al., 2012, HOFFMAYER et al., 2011; OTWAY, 2015).

Alterações em determinados íons podem fornecer informações importantes sobre o nível do desequilíbrio interno causado pelo evento de captura. Elevações nos níveis do íon potássio, por exemplo, estão relacionadas com o comprometimento da musculatura cardíaca (miocárdio) e consequências letais do estresse em elasmobrânquios (CLIFF; THURMAN, 1984; MANIRE et al., 2001; MOYES et al., 2006; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007; FRICK et al., 2010, MARSHALL et al., 2012). O metabólito lactato também está relacionado com alterações importantes que podem indicar alto nível

de comprometimento do organismo por estar relacionado com o desequilíbrio ácido-base causado pelo exercício intenso de luta no aparelho de pesca, o que já foi mostrado ser a causa da morte em teleósteos (WOOD et al., 1983). Porém, moléculas orgânicas importantes no metabolismo de elasmobrânquios, como é o caso da ureia e dos corpos cetônicos, ainda são negligenciadas em muitos estudos na avaliação do estresse em tubarões.

Devido à grande diversidade de espécies de elasmobrânquios e variação interespecífica na resposta ao estresse (MANDELMAN; SKOMAL, 2009), estudos específicos são necessários para melhor compreender a influência dos eventos de captura nesses animais.

O tubarão-lixo (*Ginglymostoma cirratum*) é uma espécie costeira e insular, de hábito demersal, normalmente associada a recifes de coral (COMPAGNO et al., 2001). Embora tenha sido considerada como 'ameaçada de extinção' no Brasil, em razão da redução significativa de algumas de suas populações (ROSA; GADIG, 2008), com a sua pesca proibida (IBAMA, 2004), a mesma ainda é frequentemente capturada em pescarias artesanais da região nordeste, sem que haja praticamente qualquer fiscalização (SANTANDER-NETO et al., 2011).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo quantificar as concentrações dos principais íons (sódio, cloro, magnésio, cálcio, fósforo e potássio) e metabólitos presentes no sangue de tubarões-lixo como meio avaliador do nível de estresse fisiológico ao qual esses animais são submetidos devido à sua captura e permanência no espinhel.

1.2 Material e Métodos

Quinze tubarões-lixo foram capturados com espinhel, sendo quatro fêmeas e onze machos. As fêmeas tinham comprimento total variando de 156 a 248 cm e os machos de 134 a 260 cm. Todos os animais capturados e utilizados neste estudo estavam em boas condições no momento do embarque e também ao serem liberados, apresentando uma natação rápida e contínua, exceto por um único animal, do sexo masculino, que já se encontrava sem vida no momento do recolhimento do espinhel. O mesmo foi embarcado e teve o sangue coletado, porém seus dados não foram incluídos nas análises juntamente com os demais animais, sendo analisado separadamente.

Para o grupo controle, foram utilizados quatro animais de cativeiro (Aquário Natal), dos quais três eram fêmeas, com comprimento total variando entre 250 e 256 cm,

e um era macho, com comprimento total de 223 cm. Todos os animais apresentavam boas condições no momento da amostragem sanguínea.

Após a coleta sanguínea (ver Metodologia Geral), as amostras de sangue foram colocadas em tubos secos ou com gel para as análises bioquímicas, acondicionados em isopor com gelo e encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram submetidos à centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos para a separação do soro. Após a separação, o soro foi colocado em microtubos de 1,5 ml e congelados a -20 °C até o momento das análises.

Para a análise da concentração dos íons (Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , P^{3+}), ureia, glicose, lactato e proteínas totais foram utilizados kits comerciais da Labtest®, seguindo as instruções do fabricante em aparelho bioquímico automático Labmax 240 (Labtest®).

1.2.1 Análises estatísticas

Devido à maioria dos parâmetros não terem apresentado uma distribuição normal, mesmo após tentativas de normalização, optou-se pela utilização da estatística convencional não paramétrica de Mann-Whitney-Whicoxon para analisar prováveis diferenças entre os animais capturados e o grupo controle e entre machos e fêmeas capturados, com um nível de significância de $\alpha < 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software R, utilizando o pacote Stats.

1.3 Resultados

1.3.1 Concentração de íons

Os resultados mostraram diferenças significativas entre os animais capturados e o grupo controle apenas para os íons magnésio e cálcio (Tabela 1.1). Os valores de sódio, cloro, fósforo e potássio dos animais capturados não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle (Tabela 1.1).

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração dos íons analisados entre as fêmeas e os machos capturados. Apesar do potássio não ter apresentado diferenças significativas (Tabela 1.3), as fêmeas capturadas apresentaram valores superiores aos dos machos.

O animal que veio a óbito apresentou alterações substanciais em todos os íons analisados em relação aos demais animais do estudo (Tabela 1.4).

1.3.2 Ureia, glicose, lactato

Diferenças significativas não foram encontradas nos valores de ureia, glicose e lactato entre os animais capturados e o grupo controle. A glicose, porém, apresentou grande variação nos animais capturados (Tabela 1.2).

Apenas o lactato apresentou diferenças significativas entre os machos e fêmeas capturados (Tabela 1.3).

Em relação ao animal que foi capturado morto, os níveis de ureia e glicose foram muito inferiores aos demais animais. Já o metabólito lactato apresentou nível muito superior, sendo cerca de quatro vezes maior do que o valor médio dos animais capturados.

Tabela 1.1 Concentração sérica de íons em exemplares de *G. cirratum* capturados com espinhel e o grupo controle

Parâmetros (mmol/L)	Capturados	Controle	W	Significância ($p < 0.05$)
Na ⁺	251.1 ± 7.1	253.1 ± 5.8	23	0.6451
Cl ⁻	228.4 ± 6.8	217.4 ± 5.4	46	0.062
Mg ²⁺	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.06	55	0.0013
K ⁺	5.8 ± 0.9	5.4 ± 0.4	37	0.3817
Ca ²⁺	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.07	52	0.0078
P ³⁻	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.2	10	0.0614

Na⁺ (Sódio), Cl⁻ (Cloro), Mg²⁺ (Magnésio), K⁺ (Potássio), Ca²⁺ (Cálcio), P³⁻ (Fósforo). W = valor do teste estatístico.

Tabela 1.2 Concentração sérica dos parâmetros glicose, lactato, ureia em exemplares de *G. cirratum* capturados com espinhel e o grupo controle

Parâmetros	Capturados	Controle	W	Significância ($p < 0.05$)
Glicose (mmol/L)	1.4 ± 0.5	0.9 ± 0.2	28	1
Lactato (mmol/L)	3.01 ± 1.4	2.8 ± 1.4	25	0.65
Ureia (mmol/L)	125.7 ± 5.7	121.1 ± 2.2	44	0.1

W = valor do teste estatístico.

Tabela 1.3 Concentração sérica dos parâmetros analisados em machos e fêmeas de tubarões-lixia (*G. cirratum*) capturados com espinhel

Parâmetros	Machos	Fêmeas	Significância ($p < 0.05$)
Na⁺ (mmol/L)	251.0 ± 7.3	251.4 ± 7.8	0.8392
Cl⁻ (mmol/L)	225.6 ± 5.5	225.9 ± 10.6	0.7273
Mg²⁺ (mmol/L)	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.3	0.3736
K⁺ (mmol/L)	5.6 ± 0.8	6.4 ± 0.9	0.1059
Ca²⁺ (mmol/L)	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.5	0.8392
P³⁻ (mmol/L)	1.1 ± 0.3	1.6 ± 0.5	0.1419
Glicose (mmol/L)	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.5395
Lactato (mmol/L)	2.4 ± 0.9	4.6 ± 1.3	0.0190
Ureia (mmol/L)	126.4 ± 5.2	124.0 ± 7.4	0.1059

Na⁺ (Sódio), Cl⁻ (Cloro), Mg²⁺ (Magnésio), K⁺ (Potássio), Ca²⁺ (Cálcio), P³⁻ (Fósforo).

Tabela 1.4 Concentração dos parâmetros analisados nos animais capturados, grupo controle e indivíduo que veio à óbito de tubarões-lixia (*G. cirratum*) capturados com espinhel

Parâmetros (mmol/L)	Capturados	Controle	Letal
Na⁺	251.1 (239.5 - 261.8)	253.1 (244.6 - 256.9)	253.9
Cl⁻	228.4 (211.5 - 237)	217.4 (212.2 - 223.2)	241
Mg²⁺	1.3 (0.914 - 2.434)	0.8 (0.793 - 0.924)	1.2
K⁺	5.8 (4.5 - 7.1)	5.3 (4.9 - 5.7)	11.1
Ca²⁺	3.4 (2.7 - 3.9)	3.0 (3.0 - 3.1)	4.5
P³⁻	1.2 (0.8 - 2.0)	1.6 (1.3 - 1.7)	2.2
Glicose	1.4 (0.2 - 1.9)	0.9 (0.6 - 1.1)	0.01
Lactato	3.0 (0.9 - 5.7)	2.8 (1.5 - 4.4)	11.6
Ureia	125.7 (113.0 - 129.6)	121.1 (119.6 - 124.4)	90.4
Na ⁺ (Sódio), Cl ⁻ (Cloro), Mg ²⁺ (Magnésio), K ⁺ (Potássio), Ca ²⁺ (Cálcio), P ³⁻ (Fósforo).			

1.5 Discussão

Alterações nas concentrações de íons e metabólitos tem sido relatadas na literatura como decorrentes do estresse de captura, transporte, manipulação e exposição ao ar em diversas espécies de elasmobrânquios (CLIFF; THURMAN, 1984; WELLS et al., 1986, MANIRE et al., 2001; MOYES et al., 2006; SKOMAL, 2007; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007; FRICK et al., 2010; BROOKS et al., 2011; MARSHALL et al., 2012) No presente estudo, a partir de comparações realizadas entre tubarões-lixia capturados com espinhel e um grupo controle foi possível observar alterações nas concentrações de íons e metabólitos decorrentes do estresse de captura.

Em relação aos íons analisados, apenas os íons divalentes magnésio e cálcio apresentaram diferenças significativas entre os animais capturados e o grupo controle. CLIFF & THURMAN (1984) relataram aumentos progressivos nas concentrações destes íons em decorrência do estresse de captura em *Cacharhinus obscurus*, que podem causar prejuízos na contração muscular e, juntamente com o íon potássio, acarretar tetania e dificuldades de natação. Não foram observadas custos na natação nos tubarões-lixia liberados no presente estudo, com os animais se distanciando rapidamente do barco após sua liberação. Níveis de cálcio elevados também podem estar relacionados com um mecanismo para compensar a acidose sanguínea que ocorre em situações de estresse (WELLS et al., 1986; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007).

A hipercalemia tem sido utilizada como um importante indicativo de estresse agudo em elasmobrânquios, com valores acima de 7mmol/L estando relacionados com as consequências letais do estresse de captura, afetando a função muscular, locomotora e cardíaca (CLIFF; THURMAN, 1984; MANIRE et al., 2001; MOYES et al., 2006; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007; FRICK et al., 2010, MARSHALL et al., 2012).

No presente estudo, embora dois indivíduos tenham apresentado valores um pouco acima de 7mmol/L, não foram identificadas alterações na natação dos animais após a sua liberação, podendo indicar uma capacidade provavelmente maior desta espécie em suportar valores mais elevados de potássio sem que sua função locomotora e/ou cardíaca seja prejudicada. Resultado semelhante também foi encontrado para *C. perezi*, no qual não foi observado comprometimento muscular nos animais com concentrações do íon potássio superiores a 7mmol/L (BROOKS et al., 2012).

O aumento na concentração de íons monovalentes, como sódio e cloro, tem sido relatado na literatura para várias espécies de tubarões em resposta ao estresse causado

pela pesca (WELLS et al., 1986; MANDELMAN; FARRINGTON, 2007). Embora a concentração dos íons sódio e cloro tenha sido levemente superior nos tubarões-lixia capturados, as diferenças não foram significativas em relação ao grupo controle, indicando um nível de estresse osmótico nesses animais provavelmente menor do que em outras espécies de tubarões.

Os valores de glicose obtidos no presente trabalho não apresentaram diferenças significantes entre os indivíduos capturados e o grupo controle, porém observou-se certa variação entre os indivíduos capturados, sem nenhuma tendência clara, como também relatado por outros autores (MARSHALL et al., 2012; WOSNICK et al., 2016, no prelo). Diversos fatores biológicos e ambientais, como alterações na dieta (HOFFMAYER & PARSONS 2001) e ciclos circadianos (GUTIERREZ et al. 1984) por exemplo, podem estar relacionados com variações nos níveis deste metabólito, por isso estudos mais detalhados devem ser realizados quando utiliza-se a glicose como um indicador de estresse para melhor compreender o papel da glicose durante situações de captura.

A análise de parâmetros como os corpos cetônicos deve ser considerada em estudos futuros sobre o estresse de captura em elasmobrânquios, por serem os lipídeos, o combustível metabólico mais importante nestes animais (BALLANTAYNE, 1997; OTWAY, 2015).

Apesar deste estudo não ter igualmente verificado diferenças significativas nos níveis de lactato entre os animais capturados e o grupo controle, os valores dos animais capturados foram novamente mais elevados. Aumentos nos valores de lactato são esperados já que o aumento da demanda energética, requerida nos eventos de captura e permanência no espinhel, é parcialmente suportada através da respiração anaeróbica no músculo branco (BONE, 1988; SMITH, 1992; PICKERING; POTINGER, 1995; HOFFMAYER; PARSONS, 2001). Uma consequência imediata do metabolismo anaeróbico é a liberação de ácido láctico devido ao processo de quebra da glicose a partir do glicogênio, liberando prótons H^+ e ânions La^- (lactato) e causando uma acentuada diminuição no pH sanguíneo (ALBERS, 1970), o que pode levar a sérias consequências no funcionamento metabólico do organismo (SMITH, 1992).

WOOD (1983) analisando as consequências do exercício severo em teleósteos, concluiu que a causa da mortalidade após o exercício é devido ao desequilíbrio ácido-base do sangue, resultante da diminuição do pH sanguíneo, e não a acumulação de ânions de lactato por si só. AWURUCH et al. (2011) encontrou uma forte correlação entre os níveis de lactato e o pH sanguíneo, sugerindo que alterações nos níveis de lactato podem

ser um bom indicador de alterações no equilíbrio ácido-base do sangue e, portanto, das condições do animal diante de um evento de estresse, além do lactato ser um parâmetro de fácil medição em campo (WOOD et al., 1983).

Em relação a possíveis diferenças sexuais, os resultados mostraram que apenas o metabólito lactato apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas capturados, com as fêmeas apresentando valores significativamente maiores, o que indica que as fêmeas metabolizam mais lactato do que os machos durante o evento de captura. Além disto, apesar dos níveis de glicose não terem sido significativamente diferentes entre fêmeas e machos capturados, as fêmeas apresentaram menores valores de glicose, e os machos mostraram uma tendência inversa, com menores valores de lactato e maiores valores de glicose. E, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas nos níveis do íon potássio, as fêmeas novamente apresentaram valores mais elevados. Estes resultados indicam um maior comprometimento homeostático nas fêmeas, com maiores perturbações no equilíbrio ácido-base e iônico do sangue.

Apesar dos valores observados em apenas um indivíduo que veio a óbito não permitir maiores inferências, a forte alteração de alguns parâmetros pode ser um indicador importante para a avaliação do estresse de captura na espécie, particularmente em razão da dificuldade de se estabelecer os valores basais de referência para elasmobrânquios (SKOMAL, 2007).

A ureia é uma das moléculas encontradas em maiores concentrações em elasmobrânquios, em razão do seu uso para a manutenção da sua homeostasia e equilíbrio osmótico, respondendo geralmente por mais de 30% da osmolaridade total do plasma sanguíneo dos tubarões (BALLANTYNE, 1997). Alterações substanciais em suas concentrações, portanto, podem comprometer gravemente o equilíbrio osmótico do animal e conseqüentemente a sua sobrevivência.

MANDELMAN & FARINGTON (2007), analisando o estresse de captura, transporte e cativeiro em *Squalus acanthias*, indicaram que os baixos níveis de ureia comprometeram fortemente o equilíbrio osmótico da espécie. EVANS & KORMANIC (1985), por sua vez, relataram perdas significativas de ureia também em *Squalus acanthias* submetidos a estresse de manipulação e atribuíram tais perdas ao aumento da permeabilidade das superfícies epiteliais das brânquias. Já que em um estado fisiológico equilibrado as brânquias são altamente impermeáveis à ureia (BOYLAN, 1967 *apud* BALLANTAYNE, 1997), o aumento da sua permeabilidade em situações de estresse pode levar a uma perda considerável, causando grave desequilíbrio homeostático

(BALLANTAYNE, 1997). Corroborando esses resultados, a concentração de ureia no único animal que veio a óbito apresentou o valor mais baixo entre os animais estudados. Apesar da sua importância, poucos estudos analisaram as alterações desta molécula orgânica em relação ao estresse de captura e manipulação em tubarões (MOYES et al. 2006; MANDELMAN & FARINGTON, 2007; FRICK et al. 2010; BROOKS et al. 2012).

No referido animal, a glicose também apresentou valores baixíssimos em relação aos demais animais do presente estudo, enquanto os valores de sódio e cloro foram superiores neste animal. Uma vez que o principal combustível metabólico da glândula retal é a glicose (DECK et al., 2016), a diminuição na capacidade de mobilizar este metabólito pode induzir o comprometimento do seu funcionamento e consequentemente na capacidade do animal secretar sal, causando desequilíbrio iônico e o aumento nas concentrações de sódio e cloro no soro sanguíneo. CLIFF & THURMAN (1984) também encontraram baixos níveis de glicose em tubarões que vieram a óbito e sugeriram que esse decréscimo poderia ser resultado de uma potencial incapacidade de mobilizar as reservas de glicogênio necessárias como fonte de energia pelo tecido muscular, podendo resultar em fracasso metabólico e morte do animal.

O nível de lactato encontrado no animal que veio a óbito, por sua vez, foi cerca de cinco vezes maior do que o encontrado nos animais capturados e o grupo controle. MOYES et al. (2006) verificaram que os níveis de lactato em tubarões-azul (*Prionace glauca*) e tubarões-anequim (*Isurus oxyrinchus*) moribundos eram 4,8 e 2 vezes maiores, respectivamente, do que nos animais liberados em boas condições. Esta evidência sugere que níveis excepcionalmente elevados de lactato podem ser um forte indicativo de perturbações fisiológicas graves e irreversíveis, embora em algumas espécies, como em *Mustelus antarticus*, os valores de lactato em espécimes moribundos tenham sido inferiores em relação aos animais que se encontravam em boas condições no momento do embarque, o que sugere que a associação de altos níveis de lactato e um estado fisiológico prejudicado parece ser espécie-específica (FRICK et al., 2010).

O valor letal do íon potássio foi superior a 11mmol/L, sendo maior do que o valor considerado letal para mamíferos e outras espécies de tubarões (CLIFF; THURMAN, 1984; MANIRE et al., 2001; MOYES et al, 2006; MANDELMAN & FARRINGTON, 2007; FRICK et al., 2010, MARSHALL et al., 2012).

A mortalidade associada à captura, tanto imediata quanto tardia, pode estar relacionada com diversos fatores como a natureza, gravidade e duração do estresse, bem como com o metabolismo das espécies e sua capacidade para se recuperar de alterações em sua homeostase (WOOD; TURNER; GRAHAM, 1983; SKOMAL, 2007, BROOKS et al., 2012), além de fatores abióticos, como a temperatura da superfície da água do mar, porém o modo respiratório parece ser o fator mais influente na mortalidade imediata em um evento de captura (DAPP et al., 2016).

Espécies relativamente sedentárias, como o tubarão-lixo, são capazes de ventilar ativamente enquanto estão paradas, mantendo a respiração quase normal por períodos prolongados de tempo (SMITH, 1992). Tal característica permite que estas espécies sejam capazes de se recuperar fisiologicamente enquanto presas ao aparelho de pesca, sendo consequentemente, mais propensas a sobreviver a um evento de captura (MANIRE et al 2001; MORGAN; BURGESS, 2007; DAPP et al., 2016).

Os resultados aqui analisados indicam que, apesar das alterações verificadas nos parâmetros analisados dos animais capturados evidenciarem a ocorrência do estresse causado pela captura, a espécie exibe uma alta resiliência ao mesmo, não sendo afetada de forma mais grave e não comprometendo, assim, a sua sobrevivência após a liberação. Logo, medidas de gestão que visem a devolução das espécies de tubarões capturadas acidentalmente, além de uma fiscalização eficiente são estratégias eficazes para espécies com baixa mortalidade imediata (DAPP et al., 2016), como é o caso do tubarão-lixo.

CAPÍTULO 2: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS COMO INDICADORES DO ESTRESSE DE CAPTURA COM ESPINHEL EM TUBARÕES-LIXA (*Ginglymostoma cirratum*)

2.1 Introdução

Diversas populações de tubarões ao redor do mundo têm sido impactadas de forma negativa pelas ações antrópicas, principalmente pela pesca. Além da alta mortalidade diretamente resultante da atividade pesqueira, os tubarões, mesmo quando são liberados ainda vivos de volta ao mar, sofrem o estresse resultante da captura, permanência no aparelho de pesca, manipulação e exposição ao ar, causando alterações fisiológicas que podem comprometer seriamente sua sobrevivência (SKOMAL, 2007).

Estudos que quantifiquem o nível de perturbações fisiológicas sofridas por esses animais, portanto, vêm se tornando cada vez mais necessários para a conservação deste grupo, particularmente no caso de espécies ameaçadas cuja liberação de volta ao mar seja obrigatória. Normalmente, estudos que avaliam o estresse fisiológico ao qual tubarões são submetidos durante a sua captura, utilizam metodologias como a análise de hormônios e, principalmente, a análise dos principais íons e metabólitos presentes na corrente sanguínea (CLIFF; THURMAN, 1984; WELLS, 1986; HOFFMAYER & PARSONS, 2001; MANIRE *et al.*, 2001; MANDELMAN & FARRINGTON, 2007; SKOMAL; MANDELMAN, 2012; GALLEGHER, 2014; OTWAY, 2015).

Parâmetros hematológicos, como a contagem diferencial de leucócitos e a relação entre granulócitos e linfócitos (G/L), têm sido também amplamente utilizados de maneira confiável como indicadores de estresse em diversos grupos de vertebrados, principalmente nas aves (OBERNIER; BALDWIN 2006; GROSS & SIEGEL, 1983; GROOMBRIDGE *et al.*, 2004; DAVIS; MAERZ, 2008; DAVIS, 2005; RUIZ, 2002, VLECK, 2000; JACKUBAS *et al.*, 2015). Os valores do hematócrito também são analisados em alguns trabalhos como indicadores de estresse (MANIRE, 2001; BRILL, 2008; FRICK *et al.*, 2010), devido a uma maior demanda na capacidade do transporte de oxigênio no sangue em uma situação de estresse.

Há uma grande confusão no que diz respeito a identificação e a nomenclatura das células sanguíneas dos tubarões devido à grande variação interespecífica, principalmente em relação aos leucócitos (WALSH; LUER, 2004), porém, morfológicamente, estas células são semelhantes às encontradas em outros grupos de vertebrados superiores, embora, diferentemente de outros táxons, os tubarões possuam

ambos os granulócitos neutrófilos e heterófilos ocorrendo juntos em sua circulação e desempenhando funções imunológicas semelhantes, sendo, desta forma, comum combinar seus números e classificá-los juntos como granulócitos no processo de contagem diferencial de leucócitos (CAMPBELL; ELLIS, 2007; DAVIS et al., 2008).

A contagem diferencial de leucócitos no sangue pode ser um indicador de alterações na resposta imunológica frente a diversos fatores estressantes, revelando se estas células estão presentes em número normal ou se a proporção de algum tipo de célula está aumentada ou diminuída (SEMEMIUK, 2009). O tráfego dessas células é importante para o controle e funções específicas do sistema imunológico e, uma vez que as mesmas trafegam entre os diferentes tecidos através da circulação sanguínea, as proporções dos leucócitos em circulação proporcionam uma importante representação do estado de distribuição de leucócitos no corpo. Além disso, alterações na distribuição dessas células podem ter consequências importantes na capacidade do sistema imune do animal em responder a uma situação de estresse (DHABHAR, 1995).

A relação entre granulócitos e linfócitos (G/L) é conhecida por aumentar em resposta a uma diversidade de fatores de estresse, como captura, inanição, cativeiro, lesão, etc. (VAN RIJN; REINA, 2010; VLECK 2000; DAVIS; MAERZ, 2008; SPARKMAN, 2014; GROSS; SIEGEL 1986; RUIZ et al. 2002). Essa elevação se dá normalmente devido ao aumento no número de heterófilos e neutrófilos e à diminuição de linfócitos circulantes, indicando que o animal está vivenciando uma situação de estresse fisiológico e alterando, conseqüentemente, sua estratégia imunológica de defesa (DAVIS et al., 2008).

Hormônios, eletrólitos e metabólitos relacionados ao estresse são rapidamente percebidos na corrente sanguínea, enquanto alterações na distribuição de leucócitos demoram mais tempo para serem observadas (DHABHAR et al., 1996), o que facilita a obtenção de valores basais de um animal não-estressado, além de ser uma metodologia relativamente barata e de fácil execução.

Até o momento, entretanto, poucos são os estudos que analisam perfis leucocitários e relações entre estas células para avaliar a resposta a algum tipo de estressor em elasmobrânquios. SEMEMIUK (2009) utilizou a contagem diferencial de leucócitos para investigar o nível de estresse sofrido por raias *Dasyatis americana* em resposta ao intenso turismo. VAN RIJN & REINA (2010) analisou a distribuição de leucócitos utilizando a relação entre granulócitos e linfócitos como um indicativo do estresse em tubarões capturados por rede de emalhar e espinhel. A falta de informações e

conhecimento acerca da resposta imunológica a situações de estresse em elasmobrânquios torna evidente a necessidade de maiores pesquisas sobre esse tema.

O tubarão-lixo é uma espécie de hábito demersal que habita regiões costeiras e insulares, em regiões tropicais e subtropicais. De ocorrência comum nas praias do Recife e Região Metropolitana, é frequentemente capturada nas pescarias artesanais, apesar de ser protegida por lei e ter sua pesca proibida no Brasil (IBAMA, 2004). Diante disto, o presente estudo tem como objetivo identificar as células sanguíneas presentes na circulação periférica e utilizar parâmetros hematológicos, como a distribuição de leucócitos, a relação G/L e valores do hematócrito, como indicadores de estresse em tubarões-lixo capturados com espinhel no litoral do Recife.

2.2 Material e Métodos

Doze tubarões-lixo capturados com espinhel (ver Metodologia Geral), sendo três fêmeas com comprimento total variando de 156 a 248 cm e nove machos com comprimento total entre 134 e 260 cm, foram utilizados neste estudo. Todos os animais estavam em boas condições no momento do embarque e ao serem liberados.

O grupo controle foi composto de quatro tubarões-lixo de cativeiro (Aquário Natal), dos quais três eram fêmeas, com comprimento total variando entre 250 e 256 cm, e um macho, com comprimento total de 223 cm. Todos os animais apresentavam boas condições no momento da amostragem sanguínea.

Após a coleta sanguínea (ver Metodologia Geral), as amostras de sangue foram colocadas em tubos com o anticoagulante EDTA, acondicionados em isopor com gelo e encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.2.1 Preparação e coloração das lâminas

Para cada animal, foram confeccionadas 3 extensões sanguíneas, preparadas em lâminas para microscopia. Para o processo de coloração, as lâminas foram colocadas em um suporte e recobertas com 20 gotas do corante May-Grünwald (MERCK), por 3 minutos. Posteriormente, acrescentou-se 20 gotas de água destilada e essa solução foi homogeneizada nos diversos pontos da lâmina, evitando o extravasamento do corante, por um período de mais dois minutos. Esta solução foi então desprezada e a lâmina foi recoberta com 20 gotas de solução diluída em água destilada e filtrada do corante Giemsa (MERCK) por um período de 15 minutos. Após este tempo, o corante foi desprezado e a

lâmina foi lavada em água corrente e colocada para secar em posição vertical. Após secas, as lâminas foram armazenadas para posterior leitura.

2.2.2 Leitura das lâminas

As lâminas coradas foram examinadas sob microscopia de luz com objetiva de imersão. As células foram contadas ao longo de uma faixa longitudinal percorrendo todo o corpo do esfregaço, em um movimento de “zig-zag”, até um total de 300 leucócitos contados, entre os quais granulócitos (eosinófilos, neutrófilos e heterófilos), monócitos, basófilos e linfócitos. Todos os esfregaços foram examinados por um único leitor, para evitar possíveis vieses por diferentes interpretações. Todos os leucócitos e eritrócitos foram identificados e classificados utilizando-se uma metodologia adaptada de WALSH & LUER (2004) e ARNOLD (2005).

2.2.3 Relação G/L

A relação entre granulócitos e linfócitos (G/L) foi calculada para cada indivíduo a partir da combinação de neutrófilos e heterófilos (G), e dividida pelo número total de linfócitos (L).

2.2.4 Hematócrito

Para análise do volume globular, foi utilizado o método padrão do microhematócrito, no qual o sangue foi colocado em capilares sem heparina e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos para a separação dos elementos do sangue, eritrócitos, leucócitos e plasma. O resultado foi expresso em porcentagem de células vermelhas em relação ao sangue total mensurados por escala padrão de hematócrito.

2.2.5 Análises estatísticas

Em razão dos dados não apresentarem normalidade, optou-se pela utilização do teste não-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon para verificar possíveis diferenças entre as relações G/L, proporção dos leucócitos e valores de hematócrito dos animais capturados e grupo controle. As análises estatísticas foram realizadas no software R utilizando o pacote STATS, com significância de $p \leq 0.05$.

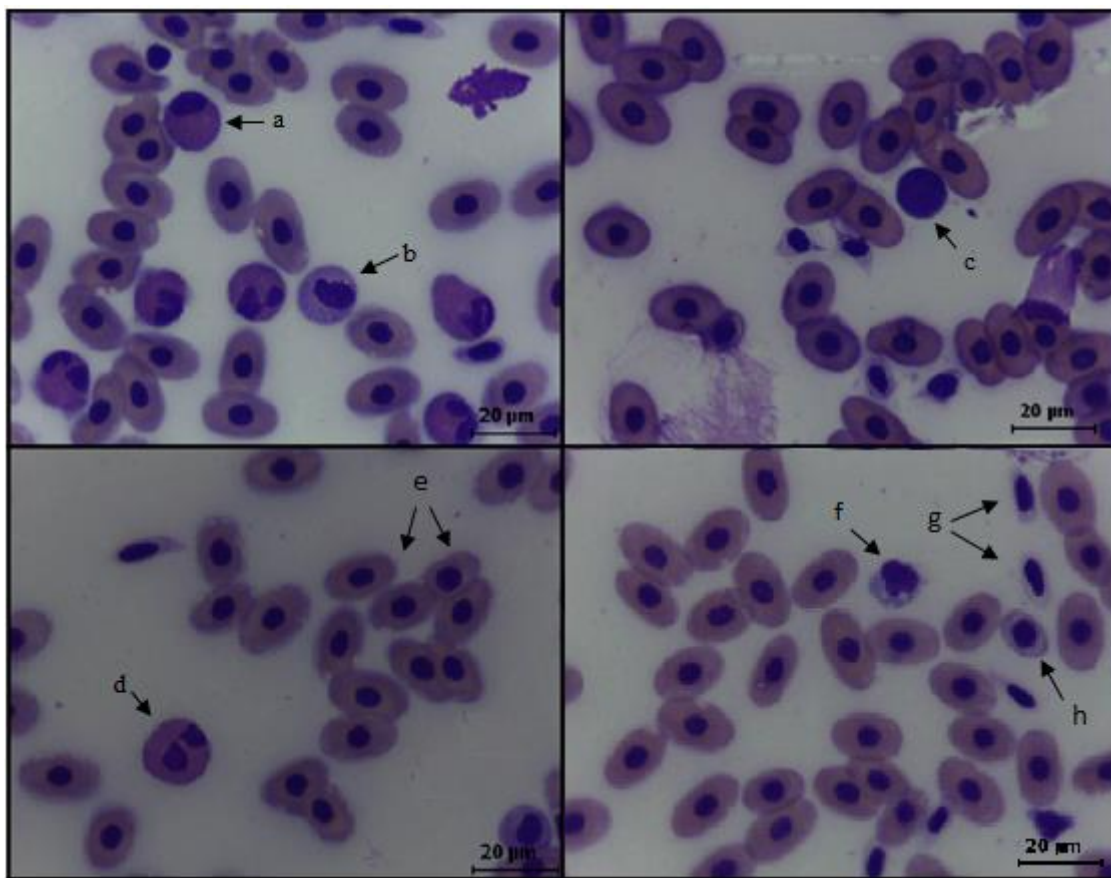
2.3 Resultados

Foram encontradas as seguintes células sanguíneas no sangue periférico de tubarões-lixo: eritrócitos, eritroblastos, linfócitos, trombócitos e os granulócitos eosinófilos, neutrófilos, heterófilos e basófilos. Não foram visualizados trombócitos especiais ou granulados.

Eritrócitos maduros foram identificados como células de forma oval com um núcleo central e oval, enquanto eritrócitos imaturos foram mais arredondados, com um núcleo esférico e intensamente basofílico. Os linfócitos eram células pequenas de formato redondo, podendo apresentar margens irregulares (pleomórficos), com o núcleo ocupando a maior parte da célula e pouco citoplasma. Dependendo do estágio de maturação dos linfócitos, o citoplasma já não era mais visível. Heterófilos foram identificados como células redondas, com núcleo normalmente não-lobulado, podendo aparecer lobulado em alguns casos de acordo com a maturação, de forma irregular e excêntrico, com citoplasma claro com a presença de grânulos eosinofílicos, em formato de bastonetes a oval. Eosinófilos eram células redondas, com núcleo normalmente lobulado e citoplasma claro com grânulos eosinofílicos de forma redonda a oval (Figura 2.1). Os neutrófilos eram redondos e tinham citoplasma azul claro sem grânulos distintos ao microscópio de luz e núcleo excêntrico ou central, podendo aparecer lobulado.

Apesar dos trombócitos não terem entrado na contagem diferencial de leucócitos, eles foram bastante observados nos esfregaços como células de formato normalmente fusiforme com o núcleo seguindo a forma da célula.

Figura 2.1 Morfologia das células sanguíneas do tubarão-lixia (*G. cirratum*). Heterófilo (a), neutrófilo (b), linfócito (c), eosinófilo (d), eritrócitos (e), monócito (f), trombócitos (g) e eritroblasto (h)



2.3.1 Contagem diferencial de leucócitos

Entre os animais capturados e o grupo controle, não foram encontradas diferenças significativas entre as porcentagens de heterófilos, neutrófilos e monócitos, embora os animais capturados tenham apresentado uma maior porcentagem de heterófilos, sendo este o tipo celular mais abundante dentro neste grupo. Já as porcentagens de eosinófilos e linfócitos foram significativamente diferentes entre o grupo dos animais capturados e o grupo controle, sendo a porcentagem de linfócitos significativamente maior no grupo controle, e o tipo celular mais abundante neste grupo (Tabela 1). As fêmeas capturadas apresentaram uma maior porcentagem de heterófilos e uma menor porcentagem de linfócitos do que os machos capturados (Figura 2). Não foram encontradas diferenças nas proporções de monócitos entre os animais capturados e o grupo controle. Apenas um basófilo foi encontrado, no grupo dos animais capturados, em um indivíduo do sexo masculino.

2.3.2 Relação Granulócitos/ Linfócitos

Diferenças significativas foram encontradas entre as relações G/L dos animais capturados e o grupo controle, com os animais capturados apresentando valores da relação bem mais elevados (Tabela 2.1). Devido ao baixo número de fêmeas capturadas (n=3), não foi possível aplicar testes estatísticos para verificar possíveis diferenças entre as fêmeas e machos capturados, porém as fêmeas capturadas apresentaram maior valor da relação G/L (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 Diferencial de leucócitos e relação G/L de tubarões-lixia (*G. cirratum*) dos animais capturados e grupo controle

Parâmetros	Capturados	Controle	W	p
n	12	4		
G:L	2.614	0.607	47	0.002
Eosinófilos (%)	29.1	11.7	43	0.01
Heterófilos (%)	42.4	28	38	0.1
Neutrófilos (%)	4.9	5	21	0.76
Monócitos (%)	0.4	0.1	26	0.84
Linfócitos (%)	22.9	55	0	0.004

W = valor do teste estatístico.

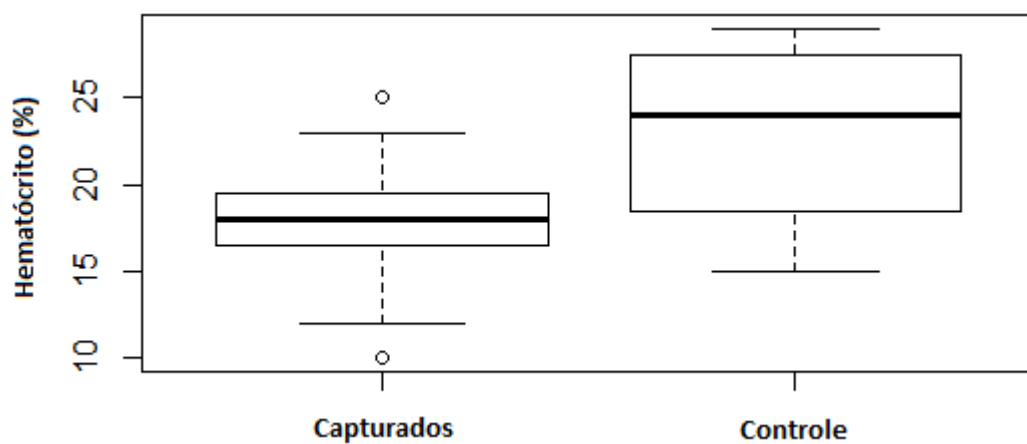
Tabela 2.2 Valores da contagem diferencial de leucócitos e da relação G/L das fêmeas e machos de tubarões-lixia capturados

Parâmetros	Fêmeas	Machos
n	3	9
G:L	3.791	2.221
Eosinófilos (%)	27.22	29.81
Heterofilos (%)	50.56	39.78
Neutrófilos (%)	4.22	5.19
Monócitos (%)	0.1	0.5
Linfócitos (%)	17.89	24.63

2.3.3 Hematócrito

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores do hematócrito entre os animais capturados e os animais controle, apesar dos animais capturados terem apresentado menores valores (Figura 2.2).

Figura 2.2 Valores do hematócrito para animais capturados e grupo controle de tubarões-lixia.



2.5 Discussão

Nos tubarões-lixia do presente estudo foram identificados na circulação periférica, eritrócitos, eritroblastos, os três tipos de granulócitos (eosinófilos, heterofilos e neutrófilos), monócitos, basófilos, linfócitos e trombócitos. Também foram encontradas células em divisão mitótica presentes na circulação. HYDER et al. (1983), analisando a estrutura e função dos tipos celulares no sangue de tubarões-lixia, identificou eritrócitos, trombócitos e quatro tipos distintos de leucócitos, entre os quais eosinófilos, um segundo tipo de granulócito, monócitos e linfócitos. Estes autores também encontraram células blásticas e células em divisão mitótica na circulação. A presença de eritroblastos é relatada na literatura como sendo comum, já que a maturação dos eritrócitos ocorre na circulação destes animais (WALSH; LUER, 2004). NAPOLEÃO (2007) realizou análises hematológicas em tubarões-lixia de cativeiro e encontrou as mesmas células encontradas no presente trabalho, exceto pela ausência de basófilos em seu trabalho.

Uma das principais confusões na nomenclatura dos leucócitos em elasmobrânquios, é em relação aos heterofilos e neutrófilos, onde alguns autores relatam a presença dessas duas células ocorrendo juntas (ARNOLD, 2005; NAPOLEÃO, 2007; PÁDUA et al., 2010; PERSKY et al., 2012), porém outros autores relatam a presença apenas de heterofilos (VALENZUELA et al., 2003; SEMEMIUK et al., 2009) ou apenas de neutrófilos (OLD; HUVENEERS, 2006) na circulação de elasmobrânquios. Embora essas células apresentem características morfológicas diferentes, suas funções de defesa são equivalentes (WALSH; LUER, 2004).

Em seu trabalho sobre a padronização de técnicas hematológicas para elasmobrânquios, ARNOLD (2005) identificou dois tipos de eosinófilos, um dos quais ele chamou de fino granulócito eosinofílico, devido à presença de finos grânulos em seu citoplasma, o qual é similar aos heterofilos no nosso estudo e de outros trabalhos com elasmobrânquios (VALENZUELA et al., 2003; PÁDUA et al., 2010). OLD & HUVENEERS (2006) também identificaram um tipo de granulócito com as características de heterofilos, porém o nomeou como granuloblastos, sugerindo que estas células podem representar uma linhagem específica de eosinófilos e não outro tipo de leucócito granulócito.

Eosinófilos foram encontrados em todos os indivíduos analisados, o que difere do trabalho realizado por NAPOLEÃO (2007), também com tubarões-lixia, onde os eosinófilos foram raros ocorrendo apenas em alguns peixes e com pouca frequência.

Segundo TAVARES-DIAS & MORAES (2003), este tipo de leucócito pode apresentar grande variação em seu percentual na circulação sanguínea em espécies de teleósteos.

Linfócitos são células frequentemente encontradas em abundância na circulação periférica de elasmobrânquios (WALSH; LUER, 2004; ARNOLD, 2005; PERSKY et al., 2012). No presente estudo foram encontrados linfócitos de tamanhos variados, corroborando com WALSH & LUER (2004), que descreveram pequenos, médios e grandes linfócitos de acordo com o grau de maturação desta célula em elasmobrânquios.

Os trombócitos não foram incluídos na contagem diferencial de leucócitos, mas foram observados em abundância nos esfregaços sanguíneos, assim como em outros estudos com tubarões (ARNOLD, 2005; PERSKY et al., 2012), apresentando formas variadas, que podem estar relacionadas também ao estágio de maturação celular. Essas células possuem papel fundamental no processo de coagulação sanguínea (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003), ocorrendo juntas em grandes quantidades nos esfregaços sanguíneos. Alguns autores registram a ocorrência de um tipo especial de célula, chamada de trombócitos GT ou trombócitos granulados, por apresentar grânulos em forma de bastonetes em seu citoplasma (ARNOLD, 2005; PERSKY et al., 2012). Esse tipo de célula, porém, não foi encontrada no presente estudo. No estudo sobre as células sanguíneas encontradas no tubarão-baleia (*Rhincodon typus*), estes trombócitos granulados também não foram verificados (DOVE; ARNOLD; CLAUSS, 2010).

Assim como no presente trabalho, monócitos são normalmente encontrados em baixa frequência nos esfregaços sanguíneos de elasmobrânquios (VALENZUELA et al., 2003; WALSH; LUER, 2004; ARNOLD, 2005; NAPOLEÃO, 2007; PÁDUA et al., 2010). Poucos autores relatam a presença de basófilos na circulação periférica de elasmobrânquios e, quando presentes, são em pequeno número (WALSH; LUER, 2004; PÁDUA et al., 2010). Essa baixa frequência de basófilos também é relatada para teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003) e mamíferos (JAIN, 1993). A função dessa célula ainda não é bem esclarecida, mas parece estar relacionada a processos inflamatórios e atividades fagocíticas em mamíferos (JAIN, 1993).

SEMEMIUK *et al.* (2009) analisou alterações na distribuição de leucócitos em raias da espécie *Dasyatis americana* para investigar o grau de estresse experimentado por esses animais em resposta ao intenso turismo marinho na região e encontrou que as raias maiores e com mais lesões tiveram significativamente mais heterofilos do que indivíduos menores não lesionados, e que as raias que tinham maiores interações com os turistas apresentavam menor proporção de linfócitos do que aquelas que não interagiam com

turistas. Tais alterações na proporção de heterófilos são verificadas em outros grupos de vertebrados, SPARKMAN (2014), por exemplo, analisando os níveis de estresse em cobras selvagens e cativas também observaram que cobras com algum tipo de injúria tinham maior quantidade de heterófilos.

No presente trabalho o grupo dos animais capturados apresentou maior proporção de heterófilos e cerca de metade da proporção de linfócitos em relação ao grupo controle. Os diferentes leucócitos apresentam respostas específicas a diferentes estressores. Um tecido com lesões, por exemplo, causa heterofilia (TIZZARD, 2004), o que pode, em parte, justificar o aumento de heterófilos nos animais capturados devido à lesão causada pelo anzol no momento da captura. As diferentes proporções de leucócitos entre os animais capturados e o grupo controle encontradas no presente trabalho podem ser, assim, indicadores importantes da resposta fisiológica dos animais capturados ao estresse de captura.

As fêmeas capturadas neste estudo tiveram uma maior porcentagem de heterófilos e uma menor porcentagem de linfócitos em comparação com os machos capturados. PERSKY et al. (2012), de forma semelhante, também encontraram valores significativamente maiores de heterófilos nas fêmeas capturadas de *Mustelus canis*, enquanto os machos apresentaram maiores porcentagens de eosinófilos. Já em relação aos linfócitos, os autores não encontraram diferenças significativas apesar de as fêmeas terem apresentado porcentagens menores destas células. Esses resultados podem indicar uma resposta hematológica ao estresse de captura mais acentuada nas fêmeas que nos machos.

A diminuição de linfócitos e aumento de neutrófilos/heterófilos induzida pelo estresse não parece se dever a uma destruição dessas células, mas a uma redistribuição destas células do sangue para outros compartimentos do corpo, provocando, assim, alterações em seus números circulantes para garantir que os diferentes tipos de células sejam dirigidas para onde são necessárias durante a resposta ao estresse (DHABHAR et al., 1996; DHABAHAR, 2002; DAVIS et al., 2008).

Diferentemente de outros táxons, os tubarões possuem ambos os granulócitos neutrófilos e os heterófilos em sua circulação desempenhando funções imunológicas semelhantes (CAMPBELL; ELLIS, 2007), logo, relações utilizando ambos leucócitos podem ser empregadas de forma intercambiável (DAVIS et al., 2008). Alguns autores têm utilizado com sucesso a relação G/L, invés de relações envolvendo neutrófilos ou heterófilos isolados, estratégia que se torna particularmente importante quando são

encontradas limitações, como a qualidade dos esfregaços sanguíneos ou dificuldades em se distinguir os diferentes tipos de granulócitos (JOHNSTONE et al., 2012).

Normalmente, estudos realizados sobre as células sanguíneas de elasmobrânquios (SEMEMIUK et al., 2009; ARNOLD, 2005; WALSH; LUER, 2004), inclusive em tubarões-lixia (HYDER, 1983; NAPOLEÃO, 2007), têm se restringido à sua identificação, proporção e morfologia. Poucos trabalhos utilizam leucócitos para inferir sobre as respostas fisiológicas a algum tipo de estressor em tubarões.

Apenas o estudo de VAN RIJN & REINA (2010) com *Cephaloscyllium laticeps* utilizou relações entre granulócitos e linfócitos para inferir sobre o estresse de captura em tubarões, validando esta metodologia para o grupo. No estudo citado, os animais capturados experimentalmente com rede emalhar e espinhel apresentaram valores substancialmente superiores aos níveis de pré-estresse. Em nosso estudo, o valor da relação G/L dos animais capturados foi mais de 4 vezes superior ao grupo controle, com relações significativamente maiores no grupo dos animais capturados corroborando com o referido trabalho.

Estudos em outros grupos de vertebrados utilizando tais relações também têm mostrado proporções elevadas para os animais que foram submetidos a algum nível de estresse, como no estudo de DAVIS & MAERZ (2008), em salamandras, que mantidas sob estresse, apresentaram significativamente mais neutrófilos, menos linfócitos e consequentemente altas taxas de N/L. GROOMBRIDGE et al. (2004) mostrou que pássaros da espécie *Paroreomyza montana*, transportados por distâncias mais longas mostraram maiores valores da relação entre heterófilos e linfócitos do que aqueles transportados por distâncias mais curtas. VLECK et al (2000) analisando populações de pinguins verificou que animais que apresentavam algum tipo de injúria recente apresentavam maiores contagens de heterófilos e maiores relações de G/L, sugerindo que a relação G/L é um melhor preditor da resposta ao estresse causada por injúrias do que a mensuração do hormônio corticosterona.

Para peixes teleósteos, alguns autores estudaram alterações hematológicas causada por diferentes estressores e verificaram em todos os casos a redução no número de linfócitos e o aumento de neutrófilos circulantes (MAZEAUD et al., 1977; PICKERING et al., 1982, ELLSAESSER; CLEM, 1986, BARTON; IWOA, 1991).

Alguns autores reportam aumentos nos valores do hematócrito para animais submetidos ao estresse de captura (WELLS, 1986). No presente caso, porém, os animais capturados apresentaram um menor valor do hematócrito do que os animais controle,

apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa. Baixos valores no hematócrito podem estar relacionados com diversos fatores como anemia reprodutiva (WILLIAMS et al., 2004) ou escassez de determinados nutrientes na dieta, como ferro, cobre e vitamina B12 (CHO, 1983). Como os animais mantidos em cativeiro provavelmente possuem uma dieta mais equilibrada e constante do que os animais selvagens, é provável que fatores diretamente relacionados à nutrição expliquem a diferença nos resultados.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que os tubarões-lixo submetidos ao estresse agudo de captura e permanência no espinhel exibem uma resposta negativa mensurável, baseada nas significativas alterações na contagem diferencial de leucócitos e relações entre granulócitos e linfócitos. Apesar disto, todos os indivíduos capturados foram liberados em boas condições, apresentando vigorosa natação após a sua liberação, o que denota uma capacidade provavelmente elevada de resiliência desta espécie frente a situações de estresse impostas pela captura e permanência no aparelho de pesca.

Este estudo reforça a importância do uso de leucócitos como indicadores de estresse em tubarões, uma vez que podem fornecer informações importantes sobre a função do sistema imune em resposta a situações de captura. Estudos complementares são, no entanto, necessários para avaliar a influência dessas alterações fisiológicas no crescimento, reprodução e sobrevivência desses animais, no médio e longo prazo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados em ambos os capítulos desta dissertação indicam que o tubarão-lixo é afetado pelo estresse de captura e permanência no espinhel, embora a espécie apresente, também, uma alta resiliência a tal situação, pois apesar das alterações mensuradas em sua bioquímica sanguínea e hematologia, os indivíduos capturados apresentavam boas condições, tanto no momento do embarque como ao ser liberado.

Estes resultados também mostraram que as fêmeas são mais afetadas pelo evento de captura do que os machos, o que torna a espécie ainda mais vulnerável à pesca.

Esta espécie encontra-se atualmente protegida no Brasil e tem a sua pesca proibida, embora pouca ou nenhuma fiscalização seja exercida pelos órgãos de controle responsáveis. Em consequência, o tubarão-lixo ainda é frequentemente capturado, desembarcado, comercializado e consumido por pescarias artesanais na região nordeste.

Esta espécie tem alta capacidade para se recuperar e sobreviver ao estresse imposto pela captura e permanência no aparelho de pesca, o que reforça a necessidade de ações de fiscalização mais eficientes que garantam a liberação imediata dos animais capturados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, C. Acid-base balance. In: Fish Physiology. HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds), Vol. IV. New York: Academic Press Inc. 1970.
- ARNOLD, J.E. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. Vet Clin Pathol. 34:115-23, 2005.
- AWRUCH, C. A.; SIMPFENDORFER, C.; PANKHURST, N. W. Evaluation and use of a portable field kit for measuring whole-blood lactate in sharks. Marine and Freshwater Research 62: 694-699, 2011.
- BARTON, B.A.; IWANA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu Rev Fish Dis 1:3-26, 1991.
- BALLANTYNE, J. S. Jaws: The Inside Story. The Metabolism of Elasmobranch Fishes. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 118B, No. 4, pp. 703–742, 1997.
- BALLANTYNE, J.S.; ROBINSON, J.W. Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry. J Comp Phys B 180(4):475-493, 2010.
- BONE, Q. Muscles and locomotion. Pages 99–141 in T. J. Shuttleworth, editor. Physiology of elasmobranch fishes. Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- BOYLAN, J.W. Gill permeability in *Squalus acanthias*. In: GILBERT, P.W.; MATHEWSON, R.F.; RALL, D.P. (eds). Sharks, Skates and Rays. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 197–206, 1967.
- BROOKS, E.J.; MANDELMAN, J.M.; SLOMAN, K.A. LISS, S.; DANYLCHUCK, A.J.; COOKE, S.J.; SKOMAL, G.B.; PHILIPP, D.P.; SIMS, D.W.; SUSKI, C.D. The physiological response of the Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezi*) to longline capture. Comp. Biochem. Physiol. A 162, 94–100, 2012.
- CAMHI, M. et al. Sharks and their Relatives Ecology and Conservation. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, v. 20, p. 1-63. 1998.
- CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. Avian and exotic animal hematology and cytology. 3rd ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007.
- CARRIER, J. C.; LUER, C. A. Growth rates in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Copeia, 3: 686-692, 1990.
- CARRIER, J. C.; PRATT, H. L.; MARTIN, L. K. Group reproductive behavior in free-living nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Copeia, 3: 646-656, 1994.

CASTRO J.I. The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off the Florida East Coast and the Bahama Islands. *Environmental Biology of Fishes* 58:1–22, 2000.

CASTRO, A. L. F.; ROSA, R. S. Use of natural marks on population estimates of nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, at Atol das Rocas Biological Reserve, Brazil. *Environ. Biol. Fish.*, 72: 213-221, 2005.

CLARK, S. Shark Product Trade in Hong Kong and Mainland China and Implementation of the CITES Shark Listings. *TRAFFIC East Asia*, Hong Kong, China, 2004.

CLIFF, G.; THURMAN, G.D. Pathological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 78, 167–173, 1984.

COMPAGNO, L.J.V. FAO Species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of sharks species known to date. Part 2, Carcharhiniformes. FAO Fish Synop. 125, v. 4, 655p, 1984.

COMPAGNO, L.J.V. Shark exploitation and conservation. In: Elasmobranch as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries, (ed) PRATT, H.L.; GRUBER S.H.; TANIUCHI T. NOAA Technical Report, 1990.

COMPAGNO, L. J. V. 2001. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. N°1 Vol. 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. Rome, 269p, 2001.

COOKE, S.J.; SCHREER, J.F.; DUNMALL, K.M.; PHILIPP, D.P. Strategies for quantifying sublethal effects of marine catch-and-release angling: insights from novel freshwater applications. In: Lucy, J.A., Studholme, A.L. (Eds.), *Catch and Release in Marine Recreational Fisheries: American Fisheries Society Symposium*, 30, pp. 121–134, 2002.

COOKE S. J.; SACK, L.; FARRELL, A.P.; BEARDALL, J.; WIKELSKI, M.; CHOWN, S. L. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv Physiol* 1: cot001. doi: 10.1093/conphys/ cot001, 2013.

COUTINHO, R.Q.; FILHO, M.F.L.; NETO, J.B.S.; SILVA, E.P. Características climáticas e geomorfológicas e geotécnicas da reserva ecológica de Dois Irmãos. 1998.

CREIO, E. Padrões de movimentação e uso do habitat de tubarões-lixia (*Ginglymostoma cirratum*, Bonnaterre 1778) monitorados por marcas acústicas no litoral do Recife, Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco. p 54, 2015.

DAPP, D. R.; WALKER, T. I.; HUVENTEERS, C.; REINA, R. D. Respiratory mode and gear type are important determinants of elasmobranch immediate and post-release mortality. *Fish and Fisheries*. 17: 507–524, 2016.

DEL MORAL-FLORES, L. F.; RAMÍREZ-ANTONIO, E.; ÂNGULO, A.; PEREZ-PONCE DE LEON, G. *Ginglymostoma unami* sp. nov. (Chondrichthyes: Orectolobiformes: Ginglymostomatidae): una especie nueva de tiburón gata del Pacífico oriental tropical. *Rev. Mex. Biodiv.* 86: 48-58, 2015.

DEROOS, R.; DEROOS, C.C. Elevation of plasma glucose levels by catecholamines in elasmobranch fish. *Gen Comp Endocrinol* 34:447–452, 1978.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Effects of stress on immune cell distribution – dynamics and hormonal mechanisms. *Journal of Immunology*, 154, 5511–5527, 1995.

DHABHAR, F.S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Stress induced changes in blood leukocyte distribution – role of adrenal steroid hormones. *Journal of Immunology*, 157, 1638–1644, 1996.

DHABHAR, F.S. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 556–564, 2002.

DAVIS, A. K. Effects of handling time and repeated sampling on Avian white blood cell counts. *J Field Ornithol*; 76: 334-8, 2005.

DAVIS, A.K.; MAERZ, J.C. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, 613–617, 2008.

DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22:760-72, 2008.

DECK, C.A.; LEMOINE, C.M.R.; WALSH, P.J. Phylogenetic analysis and tissue distribution of elasmobranch glucose transporters and their response to feeding. *Biol Open* 0:1-6, 2016.

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*, Vol. 9: 177–183, 2010.

DULVY, N.K et al. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife* 3:e00590. doi: 10.7554/eLife.00590, 2014.

ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J Fish Biol* 28:511-521, 1986.

- EVANS, D., KORMANIK G. Urea efflux from the *Squalus acanthias* pup: the effects of stress. *J Exp Biol* 119:375-397, 1985.
- FERREIRA, L. C. Distribuição, sazonalidade das capturas, utilização do habitat e movimentação do tubarão-lixo *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre 1778) na costa do Recife, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
- FERREIRA, L. C.; AFONSO, A.S.; CASTILHO, P.C.; HAZIN, F.H.V. Habitat use of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, off Recife, Northeast Brazil: a combined survey with longline and acoustic telemetry. *Envir Biol Fishes*, pp.11, 2012.
- FRICK, L.H.; REINA, R.D.; WALKER, T.I. Stress related physiological changes and postrelease survival of Port Jackson sharks (*Heterodontus portusjacksoni*) and gummy sharks (*Mustelus antarcticus*) following gill-net and longline capture in captivity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 29–37, 2010.
- GALLAGHER, A. J.; SERAFY, J. E.; COOKE, S. J.; HAMMERSCHALAG, N. Physiological stress response, reflex impairment, and survival of five sympatric shark species following experimental capture and release. *Mar Ecol Prog Ser.* Vol. 496: 207–218, 2014.
- GARLA, R. C. Ecologia e conservação dos tubarões do Arquipélago de Fernando de Noronha, com ênfase no tubarão-cabeça-de-cesto *Carcharrhinus perezi* (Poey, 1876) (Carcharhiniformes, Carcharhinidae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2004.
- GARLA, R.; GUARANI, T.; RAMOS, O.P.; DIAS-BARUFFI, M.; LOPES, N.P. Análise de parâmetros soro lógicos de três espécies de tubarão do arquipélago de Fernando de Noronha. *Arq. Ciên. Mar., Fortaleza*, 39: 89-92, 2006.
- GELSLEICHTER, J. Hormonal regulation of elasmobranch physiology. In Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (eds) *Biology of sharks and their relatives*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp287–323, 2004.
- GOMES, U.L.; SIGNORI, C.; GADIG, O.B.F.; SANTOS, H.R.S. Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Technical Books. 2010.
- GROOBRIDGE, J.J.; MASSEY, J.G.; BRUNCH, J.C.; MALCOLM, T.R.; BROSIUS, C.N.; OKADA, M.M.; SPARKLIN, B. Evaluating stress in a Hawaiian honeycreeper, *Paroreomyza montana*, following translocation. *Journal of Field Ornithology*, 75, 183–187, 2004.
- GROSS, W.B. & SIEGEL, H.S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 27, 972–979, 1983.

- GUTIERREZ J.; CARRILLO, M.; ZANUY, S.; PLANAS, J. Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* 55(3):393-7, 1984.
- HAZIN, F. H. V., BURGESS, G. H.; CARVALHO, F. C. A shark attack outbreak off Recife, Pernambuco, Brazil: 1992-2006. *Bull. Mar. Sci.*, 82(2): 199-212, 2008.
- HAZIN, F.H.V.; AFONSO, A.S. A green strategy for shark attack mitigation off Recife, Brazil. *Anim Conserv* 17(4): 287–296, 2013.
- HAZON, N.; BALMENT, R.J. Endocrinology, In: Evans, D.E. (Ed.), *The Physiology of Fishes*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 441–464, 1998.
- HOENIG, J.M.; GRUBER, S.H. Life-history patterns in the elasmobranchs: implications for fisheries management, p. 1-16. In: *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries*. PRATT, H.L.; GRUBER, H. L.; TANIUCHI, S.H.T. (eds.). U.S. Dept. of Commerce, NOAA Technical Report, NMFS. p.90, 1990.
- HOFFMAYER, E.R.; PARSONS, G.R. The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 277–285, 2001.
- HYDER, S.L.; CAYER, M.L.; PETTEY, C.L. Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tissue & Cell*, 15 (3): 437-455, 1983.
- IBAMA. Instrução Normativa Nº 05, de 21 de maio de 2004.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA, 1993.
- JAKUBAS, D.; WOJCZULANIS-JAKUBAS, K.; KÓSMICKA, A. Factors affecting leucocyte profiles in the little auk, a small Arctic seabird *J Ornithol* 156:101–111, 2015.
- JOHNSTONE, C. P.; REINA, R. D.; LILL, A. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J Comp Physiol B* 182:861–879, 2012.
- KEMPF, M. A plataforma continental de Pernambuco (Brasil): nota preliminar sobre a natureza do fundo. *Trab.Oceanog. UFPE*, 9(11): 111-124, 1970.
- KLIMLEY, A.P.; BEAVERS, S.C., TOBEY, H.C.; JORGENSEN, S.J. Movements and swimming behavior of three species of sharks in La Jolla Canyon, California. *Env. Biol. Fishes*, v. 63, p. 117-135, 2002.

- LESSA, R.; SANTANA, F. & PAGLERANI, R. 1999. Age, growth and stock structure of the oceanic whitetip shark, *Carcharhinus longimanus*, from the Southwestern Equatorial Atlantic. *Fish. Res.* 42: 21 – 30.
- MANIRE, C.; HEUTER, R.; HULL, E.; SPIELER, R. Serological changes associated with gillnet capture and restraint in three species of sharks. *Trans. Am. Fish. Soc.* 130:1038–1048. 2001.
- MANDELMAN, J.M.; FARRINGTON, M.A. The physiological status and mortality associated with otter trawl capture, transport, and captivity of an exploited elasmobranch *Squalus acanthias*. *ICES J. Mar. Sci.* 64, 2007.
- MANDELMAN, J.M.; SKOMAL, G.B. Differential sensitivity to capture stress assessed by blood acid–base status in five carcharhinid sharks. *J. Comp. Physiol. B* 179, 267–277, 2009.
- MARSHALL, H.; FIELD, L.; AFIADATA, A.; SEPULVEDA, C.; SKOMAL, G.; BERNAL, D. Hematological indicators of stress in longline-captured sharks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 162 121–129. 2012.
- MATOTT, M. P.; MOTTA, P. J.; HUETER, R. E. Modulation in feeding kinematics and motor pattern of nurse shark *Ginglymostoma cirratum*. *Environ. Biol. Fish.*, 74: 163-174, 2005.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 106, 201–212, 1977.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. *Fish Physiol.* 12B, 56–135, 1992.
- MOHAN, P.J.; AIKEN, A. Water quality and life support systems for large elasmobranch exhibits. In: SMITH, M. F. L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, 69-88, 2004.
- MORGAN, A.; BURGESS, G. At vessel fishing mortality for six species of sharks caught in the Northwest Atlantic and Gulf of Mexico. *Gulf and Caribbean Research.* 19 (2): 1-7, 2007.
- MOTTA, P. J.; WILGA, C. D. Anatomy of the feeding apparatus of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *J. Morphol.*, 241: 33-60, 1999.

MOTTA, P. J.; HUETER, R. E.; TRICAS, T. C.; SUMMERS, A. P. Kinematic analysis of suction feeding in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum* (Orectobeliformes, Ginglymostomatidae). *Copeia*, 1: 24-38, 2002.

MOYES, C.D.; FRAGOSO, N.; MUSYL, M.K.; BRILL, R.W. Predicting postrelease survival in large pelagic fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 135, 1389–1397, 2006.

NAPOLÊÃO, S. R. Análises hematológicas, bioquímicas e hormonais do tubarão-lixo, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre 1788), em cativeiro, no Brasil. 47f. Dissertação. Instituto de Pesca, 2007.

NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE (NMFS). Final amendment 2 to consolidated Atlantic highly migratory species fishery management plan. US Department of Congress. 2008.

OBERNIER, J.A.; BALDWIN, R.L. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR Journal*, 47, 364–369, 2006.

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.

OTWAY, N. M. Serum biochemical reference intervals for free-living Sand Tiger sharks (*Carcharias taurus*) from east Australian waters. *Vet Clin Pathol* 44/2: 262–274, 2015.

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. *Ensaios de Ciência*, v. 14, n.1, p. 147-158, 2010.

PERSKY, M. E.; WILLIAMS, J. J.; RENAE, E. B.; BOWMAN, M. R.; RAMER, J. C.; PROUDFOOT, J. S. Hematological, plasma biochemistry, and select nutrients values in captive smooth dogfish (*Mustelus canis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43(4): 842–851, 2012.

PICKERING, A.D; POTTINGER, T.G. Biochemical effects of stress. In: Hochachka PW, Mommsen TP. *Environmental and ecological biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, p.349-379, 1995.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.* 20: 229-244, 1982.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. 2014.

RANDALL, D.J.; PERRY, S.F. Catecholamines. *Fish Physiol.* 12B, 255–300, 1992.

RÊGO, M.; FITZPATRICK, J.; HAZIN, F.; ARAUJO, M.; SILVEIRA, L.; OLIVEIRA, P.; EVENCIO-NETO, J. Characterization of testicular morphology and spermatogenesis in the nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788). *Zoomorphology*, 13 4/1: 117-123, 2015.

ROMERO, L.M. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in freeliving vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 1–24, 2002.

ROSA, R.S.; GADIG, O.B.F. '*Ginglymostoma cirratum*' In MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA A.P. (eds) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Volume 2. Brasília Ministério do Meio Ambiente, pp. 28–29, 2008.

ROSA, R.S.; GADIG, O.F.B. Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. Conhecimento da diversidade dos Chondrichthyes marinhos no Brasil: a contribuição de José Lima de Figueiredo. *Arquivos de Zoologia*, 45: 89-104, 2014.

RUIZ, G.; ROSENMAN, M.; NOVOA, F.F.; SABAT, P. Hematological parameters and stress index in Rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *The Condor* 104(1): 162-166, 2002.

SANTANDER-NETO, J.; SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SILVEIRA, L. M.; JUCÁ-QUEIROZ, B.; FURTADO-NETO, M.A.A.; FARIA, V. V. Population structure of nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum* (Orectolobiformes), caught off Ceara State, Brazil, south-western Equatorial Atlantic. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(6), 1193–1196, 2011.

SAVILLE, K. J.; LINDLEY, A. M.; MAREES, E. G.; CARRIER, J. C.; H. L., PRATT. Multiple paternity in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environ. Biol. Fish.*, 63: 347-351, 2002.

SEMEMIUK, C.A.D.; BOURGEON, S.; SMITH, S.L.; ROTHLEY, K.D. Hematological differences between stingrays at tourist and non-visited sites suggest physiological costs of wildlife tourism. *Biol Conserv* 142: 1818–1829, 2009.

SKOMAL, G.B., Evaluating the physiological and physical consequences of capture and post-release survivorship in large pelagic fishes. *Fish. Manag. Ecol.* 14, 81–89, 2007.

- SKOMAL, G.; BERNAL, D. Physiological responses to stress in sharks. In: Carrier, J., Musick, J., Heithaus, M. (Eds.), *Sharks and Their Relatives II: Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation*. CRC Press, Boca Raton, pp. 459–490, 2010.
- SKOMAL G. B.; MANDELMAN J. W. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: A review with a focus on the secondary response. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 162: 146–155, 2012.
- SMITH, M. F. L. Capture and transportation of elasmobranchs, with emphasis on the grey nurse shark, *Carcharias taurus*. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43:325–343, 1992.
- SPARGO, A. The physiological effects of catch and release angling on the postrelease survivorship of juvenile sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*). MSc thesis, University of Rhode Island, 2001.
- SPARKMAN, A.M.; BRONIKOWSKI, A.N.; WILLIAMS, S.; PARSAI, S.; MANHART, W.; PALACIOS, A.G. Physiological indices of stress in wild and captive garter snakes: Correlations, repeatability, and ecological variation. *Comp Biochem Physiol A* 174: 11–17, 2014.
- STOKOSPF, M.K; SMITH, B.; KLAY, G. Clinical note: Blood sampling of captive sharks. *Journal of Zoo Animal Medicine*, 15: 116-117, 1984.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, v. 19, n. 01, p. 107-114, 2003.
- TIZARD, I.R. *Veterinary immunology: an introduction*. Saunders, Philadelphia, 2004.
- VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Celulas sanguineas de *Schoederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, *Schyliorhinidae*): la serie blanca. *Gayana*, 67 (1): 130-136, 2003.
- VAN RIJN, J.A.; REINA, R.D. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 534–538. 2010.
- VLECK, C.M.; VERTALINO, N.; VLECK, D.; BUCHER, T.L. Stress, corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free-living adelic penguins. *The Condor* 102:392–400, 2000.
- WALSH, C.J.; LUER, C.A. Elasmobranch hematology: Identification of cell types and practical applications. In: SMITH, M. F. L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their*

Relatives. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, p.307-323, 2004.

WALSH, P.J.; KAJIMURA, M.; MOMMSEN, T.P.; WOOD, C.M. Metabolic organization and effects of feeding on enzyme activities of the dogfish shark (*Squalus acanthias*) rectal gland. J Exp Biol 209:2929–2938, 2006.

WELLS, R.M.G.; MCINTYRE, R.H.; MORGAN, A.K.; DAVIE, P.S. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. Comp. Biochem. Physiol. A 84, 565–571, 1986.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591–625, 1997.

WOOD, C.M.; TURNER, J.D.; GRAHAM, M.S. Why do fish die after severe exercise? J. Fish Biol. 22, 189–201, 1983.