

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Luísa Machado Palhares Souza

**Caracterização proteica de Ampolas de Lorenzini de raias ameaçadas
capturadas pela frota pesqueira artesanal da região metropolitana do Rio
de Janeiro**

Rio de Janeiro

2023

Luisa Machado Palhares Souza

Caracterização proteica de Ampolas de Lorenzini de raias ameaçadas da região metropolitana do Rio de Janeiro

Projeto de Monografia apresentado à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial para aprovação no Curso Técnico em Análises Clínicas.

Orientadora: Simone Goulart Ribeiro

Coorientadora: Heloise Martins de Souza

Rio de Janeiro

2023

Luisa Machado Palhares Souza

Caracterização proteica de Ampolas de Lorenzini de raias ameaçadas capturadas pela frota pesqueira artesanal da região metropolitana do Rio de Janeiro

Monografia apresentado à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial para aprovação no Curso Técnico em Análises Clínicas.

Aprovado em __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Simone Ribeiro
EPSJV/FIOCRUZ

Heloise Martins
LAPSA/IOC/FIOCRUZ

Tainah Galdino
EPSJV/FIOCRUZ

Erick Campanelli
LAPSA/IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2023

Dedico esse trabalho à
Dona Marlene

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todo seu amor incontestável pela minha vida.

Agradeço minha mãe pelo amor, apoio emocional e carinho.

Agradeço ao meu pai por todo amor, por sempre me ouvir e me ajudar a chegar em todos os lugares que eu preciso .

Agradeço aos meus amigos Ana Carla, João Victor e Lara que me apoiaram e estiveram comigo durante todo o processo.

Gostaria de agradecer à Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) pelo apoio institucional e base acadêmica para a realização desse trabalho.

Agradeço também o Hauser-Davis Research Group pelo apoio, fornecimento de amostras, espaço e material para a realização do experimento.

Agradeço por último toda a orientação que eu recebi durante todos os meses de processo para a realização desse trabalho.

*O coração do ser
humano pode
fazer planos, mas
a resposta certa
vem dos lábios do
Senhor
Proverbios 16.1*

RESUMO

A poluição aquática é uma preocupação global, o que tem gerado um crescente interesse em estudos que investiguem as respostas biológicas e bioquímicas a poluentes ambientais, utilizando peixes como bioindicadores. Essa abordagem está em constante expansão devido à capacidade dos peixes de fornecerem *insights* valiosos sobre a presença de contaminantes no ecossistema, contribuindo para a avaliação dos riscos associados à contaminação. A escolha de peixes como bioindicadores é motivada por diversos fatores, tais como a adaptabilidade notável a mudanças ambientais, a sensibilidade a substâncias poluentes, a diversidade biológica que representam e a relação significativa que possuem com a população humana. Apesar do aumento da contaminação nos ecossistemas aquáticos brasileiros, são escassos os estudos sobre a bioquímica da intoxicação em organismos aquáticos. As raias, pertencentes à subclasse *Elasmobranchii*, constituem um grupo de peixes cartilaginosos. As Ampolas de Lorenzini, presentes nesses elasmobrânquios, constituem órgãos altamente sensíveis, responsáveis por detectar estímulos eletromagnéticos e variações na salinidade do ambiente. Essas estruturas desempenham um papel fundamental na captura de presas e na navegação dos animais. Surpreendentemente, até o momento, não foram realizados estudos que empreguem a proteômica para analisar as Ampolas de Lorenzini. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização pioneira do perfil proteico das Ampolas de Lorenzini em elasmobrânquios capturados acidentalmente por pescadores artesanais nas colônias de pesca do Recreio dos Bandeirantes e Barra da Tijuca, regiões metropolitanas do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos permitirão uma análise minuciosa de alterações proteômicas, proporcionando um entendimento mais abrangente sobre potenciais danos iniciais em organismos suscetíveis, bem como o impacto da contaminação no ambiente em que esses animais estão inseridos.

Palavras-chave: Poluição; Elasmobrânquios; Bioquímica; Ecotoxicologia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4. REFERENCIAL TEÓRICO	17
a. Peixes como bioindicadores	17
4.2 Elasmobrânquios	18
4.3 Raias	19
4.3.1 <i>Rioraja agazissi e Gymnura altavela</i>	20
4.4 Ampola de Lorenzini como bioindicador de contaminação ambiental	22
4.5 Proteômica e monitoramento ambiental	23
4.6 Eletroforese de proteínas	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
a. Revisão da literatura	26
b. Área de estudo	26
5.3 Coleta e processamento inicial de amostras	27
5.4 Preparo das amostras de Ampolas para análises proteômicas	28
5.5 Caracterização de proteínas termoestáveis	28
5.6 Quantificação de proteínas totais	29

5.7 Eletroforese unidimensional de amostras de Ampola de peixe	29
5.8 Porcentagem	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO 1.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais estruturas das arraias. Fonte; Peixes Marinhos do Brasil	20
Figura 2. Imagem representativa da espécie <i>Rioraja agassizii</i> (adaptado de Brasil, por Martins, IA (Riaga_u0.jpg)).....	21
Figura 3. Imagem representativa da espécie <i>Gymnura altavela</i> (adaptado de USA, 1997, de Flescher, D.)	21
Figura 4. Esquema representativo da Ampola de Lorenzini (adaptado de crônicas de um desbravador)	23
Figura 5. Imagem ilustrativa da localização da Ampola de Lorenzini em raias (adaptado de: Rede de monitoramento participativo de tubarões e raias).....	23
Figura 6. Esquema de separação de proteínas através da técnica de eletroforese e a modificação da proteína através do SDS-PAGE (adaptado de: In Vivo Animal Modeling)	24
Figura 7. Mapa representativo das cidades do Estado do Rio de Janeiro destacando as áreas de coleta (adaptado de: portal Loft)	27
Figura 8. Imagens representativas dos géis de eletroforese SDS-PAGE. A) Comparação entre a espécie <i>Rioraja agassizii</i> macho e fêmea para fração termoestável. B) a mesma comparação para fração não termoestável. C) Comparação para espécie <i>Gymnura altavela</i> entre grávida e não grávida na fração não termoestável.....	32
Figura 9. Gráfico com comparação para espécie <i>Rioraja agassizii</i> (R.A) entre macho e fêmea (75 kDa) para fração termoestável e não termoestável.....	34
Figura 10. Gráfico contendo comparação entre macho e fêmea para espécie <i>Rioraja agassizii</i> entre amostras termoestáveis e não termoestáveis	35
Figura 11. Gráfico comparando indivíduos grávida da espécie <i>Gymnura altavela</i> e <i>Rioraja agassizii</i> e não grávida, também, da espécie <i>Gymnura altavela</i> para 75 kDa.	36

Figura 12. Figura 11. Gráfico comparando indivíduos grávida da espécie *Gymnura altavela* e *Rioraja agassizii* e não grávida, também, da espécie *Gymnura altavela* para 15 kDa. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: elasmobranchii e proteomics)	44
Tabela 2. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: proteomics e stingrays).....	45
Tabela 3. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: ampullae AND of AND lorenzini e elasmobranchii).....	45

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental, consiste na presença de substâncias que podem prejudicar o meio ambiente e a saúde humana. Esses poluentes variam muito, não se limitando apenas a produtos químicos, mas também incluindo organismos, materiais biológicos e formas diversas de energia, como ruídos, radiação e calor. É surpreendente a vasta gama de produtos químicos em uso atualmente, cerca de 30.000, dos quais menos de 1% foi completamente avaliado quanto à sua toxicidade e riscos para a saúde (Leal e Rodrigues, 2020).

Mesmo com esforços significativos para reduzir a poluição, especialmente nos países em desenvolvimento, esse problema é persistente, emissões industriais, saneamento inadequado e gestão deficiente de resíduos afetam muitas pessoas. Em países desenvolvidos, a poluição também persiste, principalmente entre as camadas mais desfavorecidas, além disso, a introdução de novos poluentes modernos, associados ao tráfego e ao uso de produtos químicos, é uma preocupação crescente. Geralmente esses poluentes não estão em concentrações alarmantes, o que torna seus efeitos na saúde menos imediatos ou óbvios (Habermann e Gouveia, 2008; Arruda *et al.*, 2018). Com isso, sabe-se que efeitos adversos, causados pela poluição, a níveis populacionais são de difícil detecção precoce, já que muitos se tornam evidentes apenas ao final de um longo tempo, podendo até ultrapassar o momento em que seja possível revertê-los e/ou mitigá-los quando são detectados (Bayne *et al.*, 1985).

Estas informações corroboram com a ideia da necessidade e importância de estudos que avaliem a expressão de biomarcadores indicativos de alterações em respostas fisiológicas a fatores estressantes, gerando sinais de alerta precoces, facilitando a detecção desses contaminantes (Bucheli & Fent, 1995).

Com o crescimento da população mundial, a demanda por recursos naturais e a geração de resíduos também aumentam, afetando os ecossistemas aquáticos (Haseena et al. 2017). A introdução de substâncias poluentes nos ecossistemas aquáticos, como fertilizantes e pesticidas, tem ampliado a presença de compostos estranhos, podendo causar contaminação e acúmulo de substâncias nos tecidos ao longo da cadeia alimentar (Jesus e Carvalho, 2008; Lemos e Terra, 2003; Dallinger e Raimbow, 1993).

A poluição marinha tem múltiplas origens, desde a introdução de materiais poluentes sem tratamento adequado, até o aumento da temperatura das águas naturais, devido à influência de indústrias (Toledo *et al.*, 2008). Esses contaminantes podem se acumular nos tecidos de peixes

e mariscos, e estes animais podem acabar sendo consumidos por humanos, e isso se agrava para organismos que ocupam posições mais altas na cadeia alimentar, como os elasmobrânquios, grupo composto por tubarões e raias, devido a biomagnificação, que é o processo onde ocorre um acúmulo progressivo de substâncias, podendo ser xenobióticas, de um nível trófico para outro, através da teia alimentar (EFSA, 2005).

Embora a preocupação com a poluição da água seja global, muitos países em desenvolvimento continuam a gerar quantidades consideráveis de poluentes de forma crescente, como microplásticos, resíduos de medicamentos e pesticidas (Gilbert, 1987). Os efeitos negativos podem demorar a ser percebidos, o que torna complicado identificá-los precocemente e tomar medidas para reverter ou diminuir esses impactos (Bayne *et al.*, 1985).

Diante disso, a busca por bioindicadores que sinalizem mudanças nas respostas fisiológicas e nos fatores de estresse se torna crucial para alertar sobre danos iminentes (Bucheli e Fent, 1995).

A degradação ambiental, as mudanças climáticas e a perda de biodiversidade afetam diretamente a saúde humana e animal, enfatizando a necessidade de uma abordagem integrada entre ecossistemas saudáveis e bem-estar humano (Myers *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização proteica das Ampolas de Lorenzini em animais das espécies de raias *Rioraja agassizii* e *Gymnura altavela*, capturadas por pescadores artesanais nas colônias de pesca localizadas em Recreio dos Bandeirantes e Barra da Tijuca, ambas regiões metropolitanas do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a **expressão** proteica não termoestável de Ampola de Lorenzini de raias da espécie *Rioraja agassizii*, macho e fêmea;
- Caracterizar a **expressão** de proteínas termoestáveis e Ampola de Lorenzini de raias da espécie *Rioraja agassizii*, macho e fêmea;
- Caracterizar a **expressão** proteica não termoestável de Ampola de Lorenzini de raias das espécies *Rioraja agassizii* e *Gymnura altavela*, grávida e não grávidas.

3. JUSTIFICATIVA

Baseando-se na questão de como seria o perfil proteico das Ampolas de Lorenzini das raias da região metropolitana do Rio de Janeiro e suas mudanças após a exposição a efeitos tóxicos de poluentes químicos, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização deste perfil das Ampolas de Lorenzini, ressaltando que elas conduzem impulsos elétricos para o sistema nervoso de tubarões e raias, sendo utilizadas como um tipo de bússola para esses animais (Murray, 1960).

Também se torna válido destacar que a manutenção dos ecossistemas é economicamente mais lucrativa que os valores obtidos da aquisição e do uso de recursos naturais que geralmente levam a graves impactos ambientais e isso fica evidente quando observado que, embora as regiões costeiras representem apenas 8% da superfície continental mundial, seus serviços e benefícios são responsáveis por aproximadamente de 43% do valor total estimado dos serviços ecossistêmicos globais. (Costanza *et al.* 1997; Moura *et al.* 2011).

De acordo com o Ministério do meio ambiente, os serviços ecossistêmicos consistem em um conjunto de interações entre os elementos de um ecossistema configuram funções/serviços ecossistêmicos.

Este estudo visa identificar, de maneira inovadora, os efeitos iniciais da exposição a poluentes nos indivíduos analisados, por meio de alterações nas células dessas estruturas. Levando em consideração que proteínas podem servir como indicadores potentes de exposição ambiental em peixes.

Além disso, a proposta contida neste trabalho está profundamente ligada à Agenda 2030, um compromisso global composto por 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Especificamente, a ODS 14 - "Vida na Água" - se destaca, tratando da conservação e uso sustentável dos oceanos e recursos marinhos. Os elasmobrânquios podem contribuir diretamente com metas como a proteção e restauração de ecossistemas marinhos, conservação de áreas costeiras e marinhas, acrescentando ao conhecimento científico e tecnológico relacionado à saúde dos oceanos, bem como a proteção da biodiversidade e habitats naturais.

4.REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Peixes como bioindicadores

Dentro do monitoramento ambiental, os bioindicadores são seres vivos que oferecem informações sobre a qualidade geral do ambiente em que vivem (Market *et al.*, 2003). Esses seres reagem às mudanças e contaminações ambientais e suas funções essenciais são modificadas como efeito da contaminação e acumulação das substâncias tóxicas. Eles desempenham um papel crucial ao mostrar de forma concreta os efeitos das condições do ambiente nos organismos que ali habitam (Arias *et al.*, 2007).

Os peixes são fundamentais como bioindicadores na avaliação da qualidade dos ecossistemas marinhos. Ao monitorar diferentes espécies, é possível obter informações abrangentes sobre o ambiente aquático (Adams, 2002). Eles têm a capacidade de acumular poluentes, como metais e compostos químicos, em seus tecidos. Avaliar os níveis dessas substâncias nos peixes é uma forma de indicar a presença de poluentes na água (Rosenberg e Resh, 1993).

Estudos que, **assim como esse**, utilizam peixes para avaliar respostas bioquímicas a diferentes substâncias contaminantes têm despertado interesse, já que esses animais são excelentes bioindicadores e isso ocorre porque são sensíveis às substâncias presentes no ambiente, manifestando mudanças em diversos níveis biológicos (Authman, Mohammad *et al.*, 2015; Benincá, 2006; Freitas e Siqueira-Souza, 2009).

A importância dos peixes na cadeia alimentar aquática é crucial. Suas dietas e posições tróficas têm impacto direto na disponibilidade de recursos e na qualidade da água (Karr & Chu, 1997).

Por décadas, os peixes têm sido indicadores biológicos de poluição no ambiente marinho, reconhecidos por sua sensibilidade às alterações ambientais (Gusso-Choueri *et al.*, 2015; Sinaei *et al.*, 2012; Van der Oost *et al.*, 2003; Espino, 2000).

Sua mobilidade, posição na cadeia alimentar e estilo de vida permitem que demonstrem alterações em várias escalas, mantendo uma biodiversidade rica e representativa nos ecossistemas aquáticos (Freitas *et al.*, 2007).

Ou seja, o interesse no uso de peixes para avaliar respostas bioquímicas a diferentes contaminantes ambientais ocorre devido a fatores como, a sua diversidade biológica, sua

posição na escala evolutiva dos vertebrados e a sua resiliência frente a mudanças ambientais (Powers, 1989).

Além disso, estes indivíduos vêm sendo considerados organismos-modelo quando se trata de avaliar poluentes aquáticos, porque possibilitam o esclarecimento dos riscos e efeitos da presença desses contaminantes no ambiente, (Powers, 1989; Silva-Junior *et al.*, 2012).

No entanto, sua relevância vai além, visto que também são elos entre o meio ambiente e as populações humanas, já que são significante fonte de comercialização e consumo, sendo considerados em sua maioria, fontes de proteína acessível a diversas famílias (FAO, 1983).

4.2 Elasmobrânquios

Os elasmobrânquios, grupo que é composto pelas raias e tubarões, fazem parte da classe dos condrictes, um grupo antigo de peixes cartilagosos e mandibulados. Esses animais podem habitar uma variedade de ambientes aquáticos, desde as profundezas oceânicas até as regiões costeiras (Compagno, 1990; Bleckmann & Hofmann, 1999; Dulvy *et al.*, 2014; Guuske *et al.*, 2020).

A maioria das espécies de elasmobrânquios possui hábito bentônico, ou seja, estão associadas ao substrato marinho, alimentando-se de crustáceos, moluscos, poliquetas e peixes e esses hábitos tornam essa classe mais suscetíveis à bioacumulação de poluentes (Kalay e Canli, 2000; Frisk, 2010).

Vale ressaltar que a maioria destas espécies desempenham importantes funções para a manutenção do ecossistema oceânico, através de sua atuação na estabilidade das teias tróficas e ciclagem de nutrientes e, também, na atuação da troca de energia entre níveis tróficos. Não somente, os tubarões e as raias realizam significativo controle populacional de suas presas (Aguiar e Valentin, 2010; Barley *et al.*, 2017; Motivarash *et al.*, 2020).

Com isso, modificações, como o declínio, populacional dessas espécies, afeta de forma significativa a estrutura ecológica dos oceanos podendo causar impactos diretos na sua abundância, diversidade, dieta, comportamento, condição corporal e morfologia de suas presas (Dulvy *et al.*, 2017).

Infelizmente, muitos desses animais enfrentam ameaças significativas sendo frequentemente vítimas de pesca excessiva compondo um importante recurso pesqueiro mundial, visto que são considerados uma fonte barata de proteína para milhões de pessoas de comunidades costeiras (FAO, 2015).

Com isso, fica evidente a importância da avaliação de aspectos ecotoxicológicos deste grupo através de abordagens multidisciplinares, que seja possível pontuar a importância de monitorar os oceanos já que a sobre-exploração de recursos marinhos, poluição, espécies exóticas invasoras, destruição de habitat e mudanças climáticas estão tornando mais difíceis a capacidade dos oceanos de fornecer benefícios econômicos, sociais e ambientais, ou seja, de fornecer serviços ecossistêmicos (UNDESA, 2014) e (Furtado-Neto e Barros-Júnior, 2006; Consales; Virto, 2018; Marsili, 2021).

Até o presente momento, ainda há uma lacuna de compreensão substancial sobre esses animais, atribuída à complexidade das investigações necessárias, incluindo desafios relacionados à coleta, preservação e manutenção de exemplares em coleções científicas, assim como a realização de observações diretas em ambientes naturais ou cativeiro (Nelson, 1977; Gruber e Myrberg, 1977).

Em pesquisas relacionadas à área de conservação, existe a ausência de dados detalhados a respeito da ecologia e comportamento dos elasmobrânquios gerando uma dificuldade para o desenvolvimento de estratégias eficazes para proteção. A gestão sustentável dessas espécies demanda uma compreensão abrangente de suas características biológicas e dos padrões de movimentação, visando garantir a preservação de suas populações (Last et al., 2016).

4.3 Raias

As raias, de maneira geral, possuem corpo achatado dorso-ventralmente e nadadeiras peitorais fundidas à cabeça, podendo ser encontradas tanto em ambientes marinhos quanto em águas continentais, ou seja, são encontradas desde águas salgadas até águas doces, sendo predominantemente marinhos (Holt *et al.*, 2013; Smith *et al.* 2018).

A infraclasse Batoidea apresenta uma variedade impressionante de adaptações morfológicas e comportamentais, a cauda das raias é geralmente longa e fina e muitas vezes ela possui espinhos venenosos, sendo uma defesa eficaz contra os predadores. Além disso, as raias possuem uma notável capacidade de camuflagem, auxiliando para que se misturem ao ambiente evitando predadores (Last e Stevens 2020).

As raias são animais que possuem reprodução ovovivípara, que consiste no desenvolvimento dos embriões dentro de ovos que permanecem dentro do corpo da fêmea até o momento do nascimento (Compagno, 2001).

Esse grupo desempenha um papel crucial no controle populacional de suas presas, influenciando fatores como abundância, diversidade e comportamento delas (Aguiar e

Valentin, 2010), sendo animais muito interessantes na qual a conservação precisa se tornar uma preocupação global.

Principais medidas e estruturas das raias

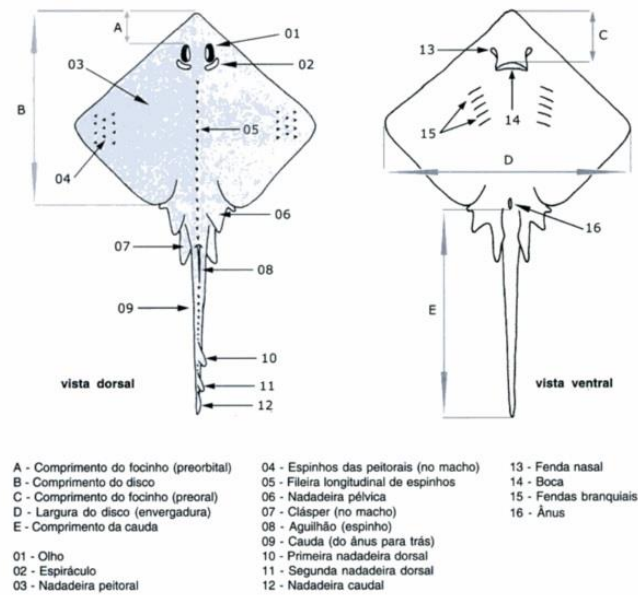


Figura 1. Principais estruturas das arraias. Fonte; Peixes Marinhos do Brasil

4.3.1 *Rioraja agassizii* e *Gymnura altavela*

A raia *Rioraja agassizii*, (Müller & Henle, 1841) (R.A) (figura 2), uma das espécies escolhidas para essa pesquisa, conhecida popularmente como “raia santa”, é uma espécie costeira que habita fundos de areia, lama ou cascalho. Sua dieta abrange crustáceos, moluscos e peixes. Além disso, é ovípara, com ovos que apresentam projeções na casca. Ela possui uma distribuição que ocorre no Atlântico Sudoeste, entre o Sudeste do Brasil e Argentina e seu estado de conservação é considerado como ameaçado, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (2023).



Figura 2. Imagem representativa da espécie *Rioraja agassizii* (adaptado de Brasil, por Martins, IA (Riaga_u0.jpg))

A raia *Gymnura altavela*, (G.A), figura 3, também conhecida popularmente como raia-borboleta é uma espécie pertencente à família Gymnurida. É uma espécie presente na lista de ameaçadas do IUCN (2020). Essa espécie costuma ser encontrada em águas tropicais e subtropicais do Atlântico Ocidental, entre a costa leste dos Estados Unidos e o sul do Brasil. (Smith *et al.*, 2019).



Figura 3. Imagem representativa da espécie *Gymnura altavela* (adaptado de USA, 1997, de Flescher, D.)

Esta espécie possui um comportamento alimentar caracterizado pela preferência por peixes ósseos e invertebrados bentônicos. Sua forma achatada permite que ela se esconda no fundo do oceano, surpreendendo suas presas durante a caça (Compagno, 1999). No entanto, mesmo sendo encontrada em várias regiões, a *Gymnura altavela* enfrenta desafios significativos devido à pesca excessiva e à deterioração do habitat. Para garantir a sobrevivência dessa espécie e preservar o equilíbrio ecossistêmico em suas áreas de habitação, é crucial implementar medidas adequadas de conservação e manejo.

4.4 Ampola de Lorenzini como bioindicador de contaminação ambiental

A Ampola de Lorenzini é formada por uma rede de poros na epiderme, conectados a canais preenchidos com um gel de mucopolissacarídeo, e esses canais terminam em um bulbo, composto por várias câmaras sensoriais com células receptoras e células de suporte. Essa estrutura eletrossensível é responsável por conduzir sinais elétricos e é interpretada por células sensoriais (Josberger *et al.*, 2016; Da Cruz, 2017).

As Ampolas de Lorenzini proporcionam, aos elasmobrânquios, uma capacidade de perceber estímulos eletromagnéticos e de identificar a localização e a posição de presas a grandes distâncias (Silva *et al.*, 2021).

Este órgão funciona de maneira semelhante a uma "bússola" para esses animais, desempenhando um papel vital em sua ecologia e comportamento.

Usar a Ampola de Lorenzini como bioindicador pode viabilizar o monitoramento das respostas dos elasmobrânquios às mudanças ambientais. Distúrbios em sua função podem indicar vários impactos ambientais, como poluição, mudanças climáticas ou alterações na salinidade da água. Assim, esses animais podem servir como indicadores do estado de saúde dos ecossistemas marinhos (Tricas *et al.*, 1997).

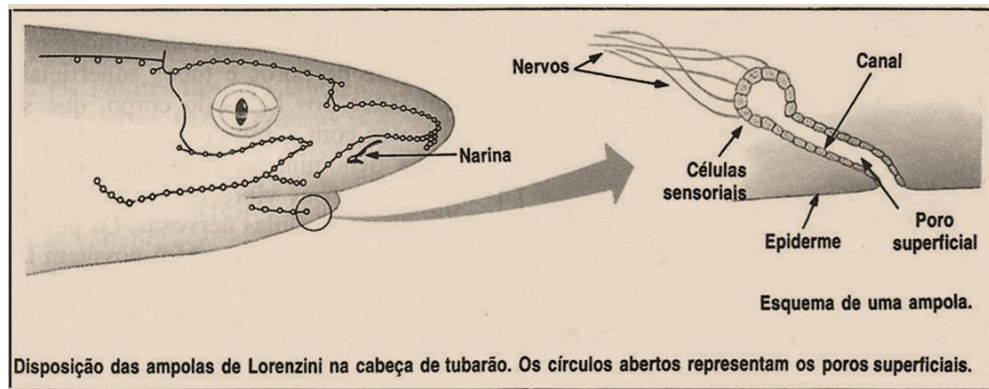


Figura 4. Esquema representativo da Ampola de Lorenzini (adaptado de crônicas de um desbravador)

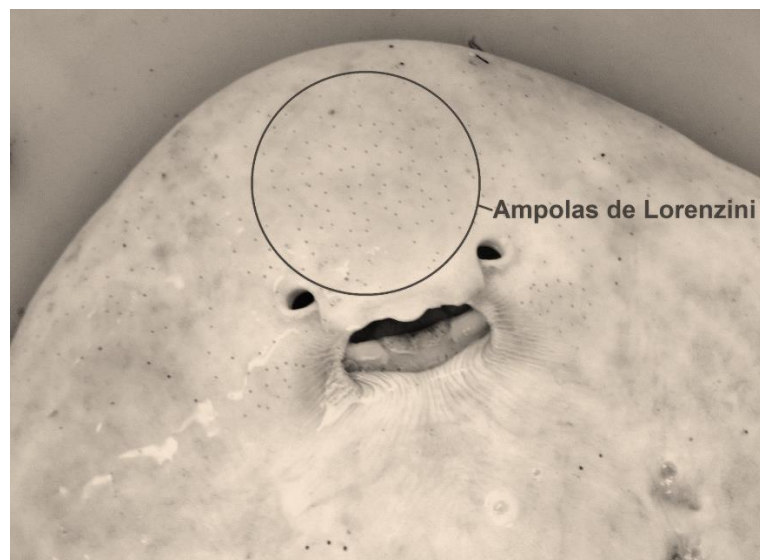


Figura 5. Imagem ilustrativa da localização da Ampola de Lorenzini em raias (adaptado de: Rede de monitoramento participativo de tubarões e raias)

4.5 Proteômica e monitoramento ambiental

Estudos utilizando técnicas proteômicas são responsáveis por investigar proteínas presentes em tecidos e fluidos biológicos podendo fornecer informações a respeito da presença de contaminantes no ambiente e, também, sobre suas consequências, já que estas técnicas permitem, como dito acima, a identificação da expressão proteica de tecidos ou fluidos biológico e possíveis alterações após a exposição a poluentes. Além disso, a proteômica possui alto potencial de descoberta de novos biomarcadores (López-Barea e Gómez-Ariza, 2006; Hauser-Davis, 2012).

Tem sido visto, alguns poucos, estudos que utilizaram técnicas ômicas para observar a exposições de peixes teleósteos a contaminantes em laboratório buscando identificar possíveis

modos de ação e sugerir novos biomarcadores (Hauser-Davis *et al.* 2012; Silva-Junior *et al.*, 2013).

A conexão entre proteômica e monitoramento ambiental pode ser crucial para examinar proteínas específicas presentes nos tecidos e fluidos biológicos dos animais, oferecendo clareza sobre a contaminação ambiental (Hauser-Davis, 2012; López-Barea e Gómez-Ariza, 2006).

A proteômica ambiental também pode ser aplicada para monitorar a qualidade da água e identificar biomarcadores de exposição a poluentes. Estudos, como o de Silva *et al.* (2020), utilizaram abordagens proteômicas para avaliar a resposta de organismos aquáticos à presença de contaminantes em ambientes aquáticos, oferecendo possíveis informações para a gestão ambiental.

4.6 Eletroforese de proteínas

A técnica de eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) é uma abordagem metodológica amplamente utilizada para a separação de moléculas com base em critérios de tamanho e carga, o que permite a distinção de proteínas (figura 6). O SDS atua como um agente desnaturante das proteínas, regularizando a relação entre massa e carga, o que viabiliza a estimativa aproximada do peso molecular das proteínas identificadas.

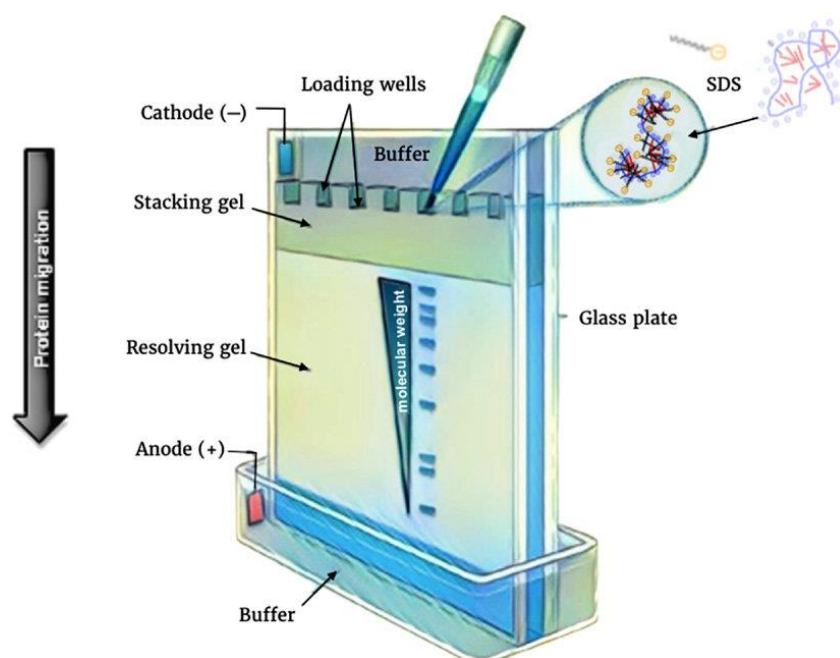


Figura 6. Esquema de separação de proteínas através da técnica de eletroforese e a modificação da proteína através do SDS-PAGE (adaptado de: *In Vivo Animal Modeling*)

A eletroforese de proteínas é utilizada também em estudos de biodegradação para investigar microorganismos que degradam compostos poluentes. A análise das proteínas produzidas por esses microorganismos durante o processo de degradação pode fornecer informações valiosas para otimizar estratégias de remediação ambiental (Jones *et al.*, 2020).

A eletroforese de proteínas é uma técnica essencial em estudos que abordam a saúde de organismos aquáticos e terrestres. Isso ocorre porque as variações nas proteínas presentes nos diferentes tecidos desses organismos podem fornecer informações relevantes sobre o estado fisiológico deles em resposta a mudanças ambientais (Gagné *et al.*, 2019).

No âmbito deste estudo foram analisados o perfil proteico, através da técnica de SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio), de Ampolas de Lorenzini de duas espécies de raias coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo elas a *Rioraja agassizii* e a *Gymnura altavela*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Revisão da literatura

Para a revisão da literatura foi realizada uma busca sistematizada na base de dados Scopus utilizando como descritores para a busca, os termos “Elasmobranchii”, “ampullae of Lorenzini”, “proteomics” e “stingrays”. A opção pelos termos em inglês foi uma tentativa de ampliar o material de análises visto que a maioria da literatura específica sobre tubarões e raias se encontram neste idioma.

A primeira busca foi realizada combinando os seguintes termos e conectores: ampullae AND of AND lorenzini e elasmobranchii). Foram encontrados um total de 23 artigos, todos em língua inglesa e publicados entre os anos de 1997 e 2022. Destes, apenas 6 abordavam raias diretamente, embora nenhum dos artigos se referisse às nossas espécies de trabalho. E apenas 1 artigo se tratava de um estudo ecotoxicológico, especificamente sobre contaminação por metais tóxicos. Este estudo é o mais recente (2022) e foi desenvolvido na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Na segunda busca, os termos utilizados foram: elasmobranchii AND proteomics. Foram encontrados 6 artigos publicados entre os 2008 e 2016, sendo apenas 1 sobre raias, publicado em 2013.

A terceira busca utilizou os termos Stingrays AND proteomics e encontrou apenas 3 artigos, publicados entre 2013 e 2019, todos em inglês. No entanto, um dos artigos pode ser excluído por já ter aparecido na busca anterior.

Por fim, ao combinar todos os descritores (elasmobranchii AND ampullae of Lorenzini AND proteomics) não obtivemos nenhum resultado, denotando a carência de conhecimento científico nessa área de atuação. Percebe-se, também, ao realizar essa busca que os autores se repetem em diversos artigos.

Até o momento, não foram publicados estudos que explorem o uso dessas técnicas em elasmobrânquios. No entanto, foram observadas aplicações em peixes ósseos, não havendo trabalhos relacionados às análises proteômicas nas Ampolas de Lorenzini.

Em anexo (ANEXO 1), as tabelas com todos os artigos encontrados.

5.2 Área de estudo

O Rio de Janeiro está situado na Região Sudeste do Brasil, com uma costa de 630 quilômetros banhada pelo Oceano Atlântico. Sua paisagem é diversificada, incluindo desde

penhascos e ilhas costeiras até áreas de restinga, rochas à beira-mar, lagunas, deltas, estuários, manguezais e praias. Com 25 municípios e 156 pontos de desembarque, até 2020 era o segundo estado com o maior Produto Interno Bruto (PIB) e a terceira maior população do país, com mais de 17 milhões de habitantes, apesar de seu tamanho relativamente pequeno, conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020).

A Região Metropolitana do Rio de Janeiro (figura 7) compreende 11% do território fluminense, onde residem 11.634.674 pessoas, representando 72,67% da população do estado, sendo reconhecida como um dos principais pontos de desembarque pesqueiro, responsável por 42.373 toneladas de pescado em 2012, cerca de 47% da produção total (Barroso e Wiefels, 2010; FIPERJ, 2013).



Figura 7. Mapa representativo das cidades do Estado do Rio de Janeiro destacando as áreas de coleta (adaptado de: portal Loft)

5.3 Coleta e processamento inicial de amostras

A coleta das amostras obtidas foi realizada por pesca artesanal, através de pescadores associados a colônia de pesca, do Recreio dos Bandeirantes e da Colônia de pescadores da Barra da Tijuca, autorizados por licença SISBIO (licença no. 77310-1) e a amostragem realizada foi a de conveniência, ou seja, quaisquer espécies de elasmobrânquios capturados seriam analisados. As espécies que foram estudadas são a *Rioraja agassizii* e *Gymnura altavela*, devido ao número total de indivíduos conseguidos. Os animais coletados foram devidamente transportados para o laboratório, as espécies foram identificadas através do Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro (Gomes *et al*, 2019), além disso, foi

realizada a sexagem, pesagem, medição e dissecação dos animais. Para as fêmeas grávidas foi feita uma dissecação da região ventral abdominal, utilizando um bisturi e tesoura, onde o útero foi retirado e aberto e o embrião foi coletado. A Ampola de Lorenzini foi retirada no momento da dissecação, com o auxílio de uma espátula, através da compressão dos canais que contém o gel de mucopolissacarídeo.

5.4 Preparo das amostras de Ampolas para análises proteômicas

Para caracterização geral, as amostras de Ampola de Lorenzini, foram preparadas de acordo com Hauser-Davis *et al.*,2012, onde foram purificadas pela membrana de corte Vivaspin de 3 kDa (Sartorius) com o objetivo de realizar a dessalinização e remoção de possíveis interferentes.

5.5 Caracterização de proteínas termoestáveis

A fração termoestável, de uma alíquota das amostras, foi extraída pela técnica de extração térmica, de acordo com ERK *et al.* (2002). Para isso, foi pesado aproximadamente 100 mg de cada uma das amostras de Ampolas de Lorenzini coletadas previamente. Tais amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno estéreis, onde, em seguida, foram homogeneizadas na proporção de 1:20 com uma solução tampão. A solução tampão é composta por Tris-HCl $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ pH 8,6, fenil-metil- sulfonil-fluoreto como inibidor de proteases $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e β -mercaptoetanol 0,01%.

Após a homogeneização, essas amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 20.000 rcf por 60 min a 4 °C. Após a centrifugação, ocorreu a separação entre o material precipitado no fundo e os sobrenadantes. Com cuidado, os sobrenadantes foram transferidos, com auxílio de uma seringa, para outros microtubos, previamente identificados. Estes microtubos foram dispostos em um termobloco, onde foram submetidos a um aquecimento a 70 °C por 10 minutos. Para finalizar, após o aquecimento, as amostras passaram por uma nova centrifugação a 20.000 rcf por 30 minutos a 4°C.

Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram novamente retirados e acondicionados em microtubos identificados que permaneceram congelados a -20°C até a análise. Estes sobrenadantes contém a fração termoestável.

5.6 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais, nas amostras, foi realizada através do método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977), sendo uma técnica que consiste em uma reação colorimétrica, baseada na interação das proteínas com o reagente fenol e cobre em condições alcalinas.

Essa reação envolve uma oxidação que é catalisada pelo cobre e por aminoácidos aromáticos, por um reagente **hetero polifosfato** (fosfotúngstico-fosfomolibdico) desenvolvendo, ao final do processo, uma cor azul, sendo o esperado a presença de maior intensidade dessa cor quando há uma maior concentração de proteínas.

Em seguida, as absorvâncias das amostras foram determinadas em um espectrofotômetro UV-Vis e comparado com uma curva padrão que foi plotada com albumina bovina sérica.

5.7 Eletroforese unidimensional de amostras de Ampola de peixe

As amostras de Ampola de Lorenzini foram preparadas para a caracterização geral e para a caracterização de proteínas termoestáveis, sendo homogeneizadas com tampão de amostra, na proporção de 1:1, composto de 10 % SDS (p/v), β - mercaptoetanol 10 mMol L⁻¹, 10 % glicerol (v/v), 0,2 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 6,8) e 0,05 % azul de bromofenol (p/v).

As amostras foram fervidas por 5 minutos e então aplicadas em géis SDS- PAGE de 15 %.

As corridas foram realizadas, integralmente, por aproximadamente 30 minutos, a 220V/gel. A coloração e revelação dos géis foi feita com Nitrato de prata.

Para revelação com nitrato de prata será seguido o protocolo de Heukeshoven e Dernick, 1985, onde os géis, são primeiro fixados com ácido acético/etanol, sensibilizados em uma solução de tiosulfato de sódio e etanol, lavados em água ultra-pura, reagidos com nitrato de prata, lavados novamente e então revelados em uma solução de carbonato de sódio/formaldeído. Ao fim, essa reação de revelação foi interrompida com uma solução de EDTA.

Após a separação eletroforética, as bandas obtidas, foram quantificadas por densitometria óptica, onde foi comparado, os pixels de cada uma dessas bandas, com uma curva

padrão de albumina bovina sérica, previamente preparada, por meio de software de imagem (Adobe Photoshop®).

5.8 Porcentagem

Para melhor elucidar as comparações das intensidades obtidas através da densitometria foi realizado o cálculo de porcentagem desses resultados.

Inicialmente foi separado esses dados de acordo com as comparações realizadas, e obtidos a intensidade absoluta para cada um deles, essa intensidade foi calculada multiplicando o valor dos pixels pela média também dos pixels, gerado pelo programa Adobe photoshop.

Em seguida a porcentagem foi calculada multiplicando o valor absoluto da amostra desejada por 100 e dividindo pelo maior valor entre as intensidades absolutas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas diferentes comparações das duas espécies analisadas considerando, para espécie *Rioraja agassizii*, (R.A), os sexos, sendo separados em macho e fêmea, e para a espécie *Gymnura altavela* (G.A) a diferença entre grávida e não grávida.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é conhecida por ser simples de baixo custo, sendo uma técnica acessível, além disso, ela permite a visualização de concentrações proteicas muito baixas através de pequenas quantidades de amostra (Gordon, 1995).

Essa técnica se baseia na separação de proteínas por tamanho molecular e para isso é utilizado um gel de poliacrilamida e detergente aniônico SDS para conferir carga negativa proporcional à massa das proteínas. Essa técnica se tornou de extrema importância em diferentes áreas da biologia. (Laemmli, 1970). Esse método é comumente utilizado para analisar o proteinograma em várias espécies (Fagliari *et al.*, 1998, 2008; Saquetti *et al.*, 2008).

A análise através da eletroforese de proteínas é valiosa para compreender macromoléculas de maneira sistemática, com isso, pesquisas têm explorado esta técnica como uma ferramenta para identificar variações intra e interespecíficas, proporcionando pareceres sobre o metabolismo, adaptações a mudanças ambientais, além de diferentes estados nutricionais e hábitos alimentares de peixes (Corzo; Riol-Cimas e Meléndez-Hevia, 1984; D. G.M. Donald e C. Louise Milligan, 1992; Navarro e Joaquín Gutiérrez, 1995; George *et al.*, 2013).

Nesta etapa deste trabalho foram realizados 3 géis que permitiram de maneira geral analisar as expressões de bandas, sobretudo aquelas de peso molecular entre 75 e 14 kDa (kilodalton), sugerindo uma possível presença de metalotioneína, uma proteína frequentemente associada a respostas sobre exposição a metais tóxicos.

Foram realizadas as seguintes comparações: macho e fêmea da espécie *Rioraja agassizii*, para a amostras não termoestável e termoestável (figura 5 A e B) e, também, para indivíduos grávidas e não grávidas ainda da espécie *Rioraja agassizii*, da espécie *Gymnura altavela* (figura 5C), tendo sido visto de maneira geral expressão de bandas principalmente entre os pesos moleculares de aproximadamente 75 kDa e 15 kDa.

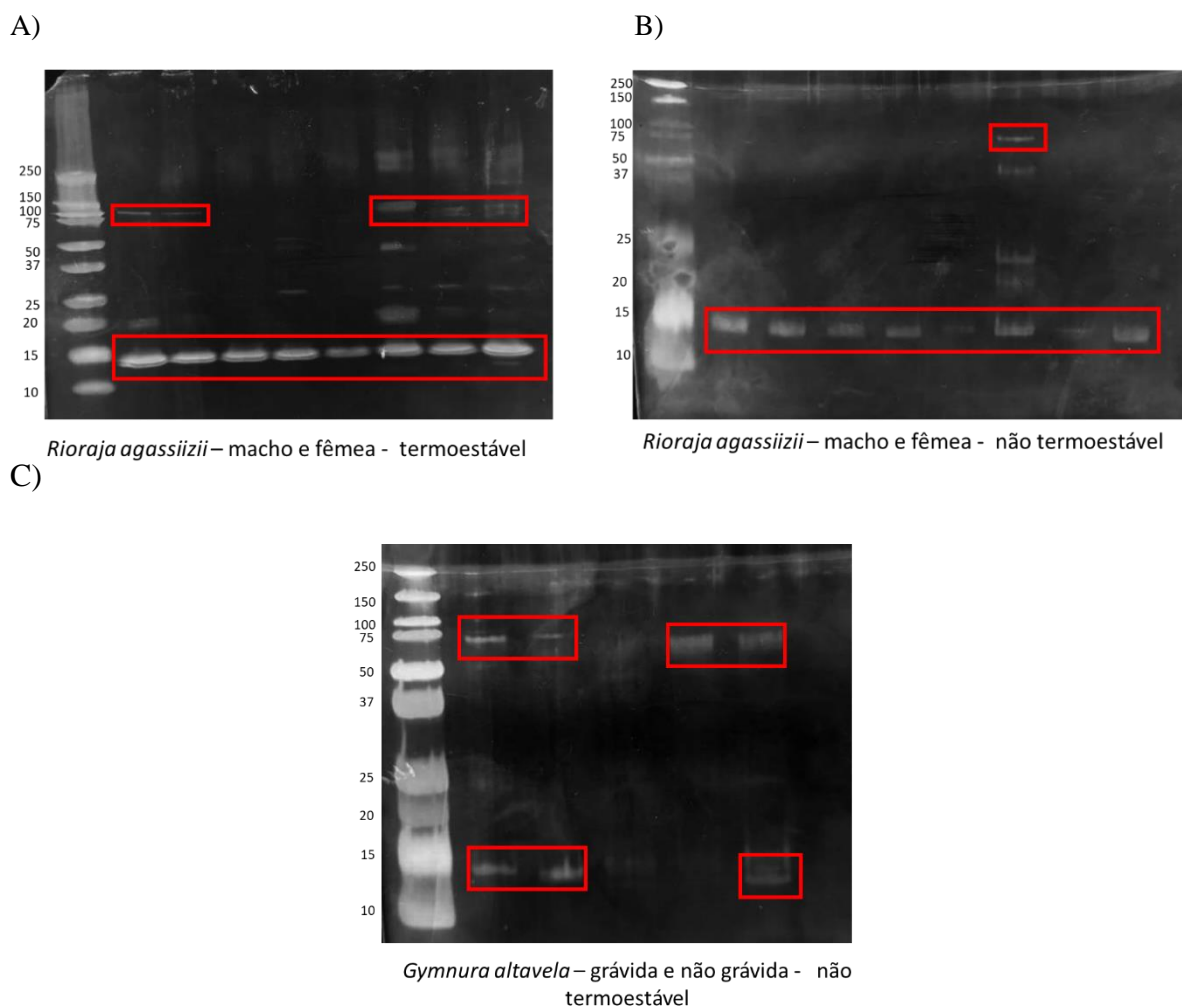


Figura 8. Imagens representativas dos géis de eletroforese SDS-PAGE. A) Comparação entre a espécie *Rioraja agassizii* macho e fêmea para fração termoestável. B) a mesma comparação para fração não termoestável. C) Comparação para espécie *Gymnura altavela* entre grávida e não grávida na fração não termoestável.

A presença destas bandas nestes pesos moleculares, podem indicar a presença de bandas de metalotioneína (MT), que possuem o peso molecular aproximado de 14 kDa e sugere a presença de metaloproteinases de matriz 2 (MMPs-2) que possuem o peso molecular de aproximadamente 72 kDa.

As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que têm a capacidade de degradar a matriz extracelular, elas estão associadas à progressão, invasão e metástase do câncer e MMP-2 é uma integrante dessa família de enzimas, ativa em tumores avançados (Quaranta *et al.*, 2007).

Já a metalotioneína é considerada um biomarcador proteico específico para metais porque suas funções biológicas consistem na regulação da homeostase de metais essenciais e a

detoxificação de elementos não essenciais, com isso, a presença de metais e metaloides geralmente leva a um aumento na expressão dessas metalotioneínas (Melendez *et al.*, 2012; Motta, 2012).

A quantificação de bandas de proteínas foi feita através do método de densitometria óptica, onde o gel é digitalizado e analisado usando um software de imagem (como o Adobe Photoshop®). A densitometria óptica é uma técnica muito utilizada para identificar a intensidade da expressão de uma determinada banda através da leitura de pixels. Amplamente utilizada em pesquisas biomoleculares principalmente em experimentos que envolvem a análise de géis eletroforéticos, assim como em estudos como de Louzada (1994) e Rahal (2002)

Vale ressaltar, que até o presente momento, não foram realizadas análises estatísticas para nenhum dos resultados que serão mencionados.

Nas análises deste estudo, inicialmente foi visto a comparação do perfil proteico entre macho (n = 4) e fêmea (n = 4) da espécie *Rioraja agassizii*, em peso molecular de 75 kDa tanto para as amostras termoestáveis como não termoestáveis, e como demonstrado na figura 9, não houve expressão proteica para fêmea desta espécie nas amostras não termoestável e, de maneira, inversamente proporcional, não houve expressão proteica para macho nas amostras termoestável.

Com isso, quando comparado as expressões possíveis para estas variáveis, é notável a maior intensidade para as R.A fêmeas para as amostras termoestável, tendo apresentado um aumento de 7,8%.

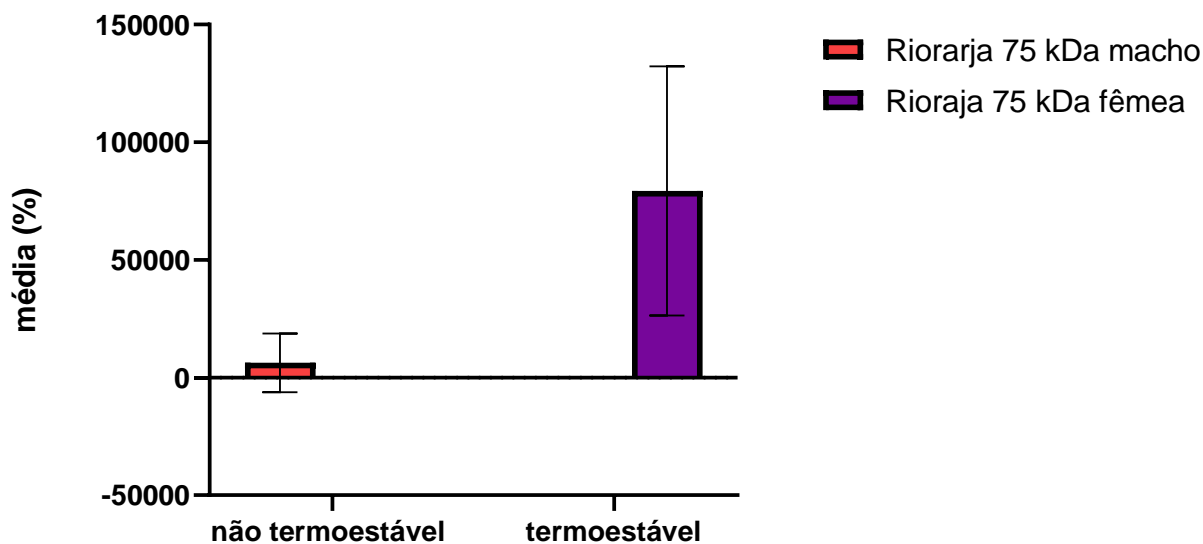


Figura 9. Gráfico com comparação para espécie *Riorarja agassizi* (R.A) entre macho e fêmea (75 kDa) para fração termoestável e não termoestável.

Quando comparado a mesma variável anterior, alterando apenas o peso molecular, é possível perceber uma mudança nos resultados obtidos, tendo sido apresentada expressão para todas as frações de amostras, termoestáveis ou não (figura 10).

Ainda na figura 10, é notável a uma maior intensidade na expressão de machos quando comparados com fêmeas tanto para a fração termoestável como para a fração não termoestável. Analisando as porcentagens, foi apresentado uma intensidade de 53% para a R.A macho não termoestável, 32.6% para R.A fêmea também não termoestável e 93.3% para a R.A fêmea termoestável, a R.A macho na fração termoestável foi considerada como 100% por apresentar uma maior intensidade absoluta na expressão proteica.

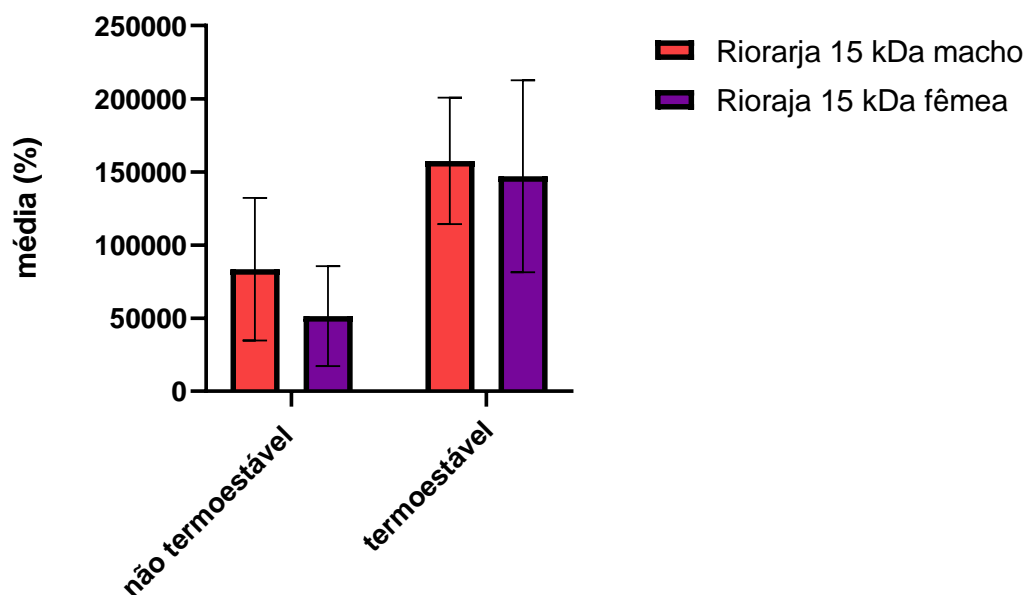


Figura 10. Gráfico contendo comparação entre macho e fêmea para espécie *Rioraja agassizii* entre amostras termoestáveis e não termoestáveis

Observando as diferenças entre os indivíduos grávidas da espécie *Rioraja agassizii* e *Gymnura altavela* e também espécimes não grávidos da espécie *Gymnura altavela* no peso molecular de 75 kDa é possível identificar expressão proteica para estas três variáveis, onde foi obtido, de maneira geral, uma menor intensidade para R.A grávida quando comparado com a G.A tanto grávida como não grávida.

Quando calculado a porcentagem, esses dados revelam que a G.A não grávida teve uma maior intensidade na expressão proteica, sendo considerada como 100%, já a G.A grávida apresentou uma intensidade de 96,8% em sua expressão e como elucidado na figura 11, a R.A demonstrou uma expressão de 61,7%.

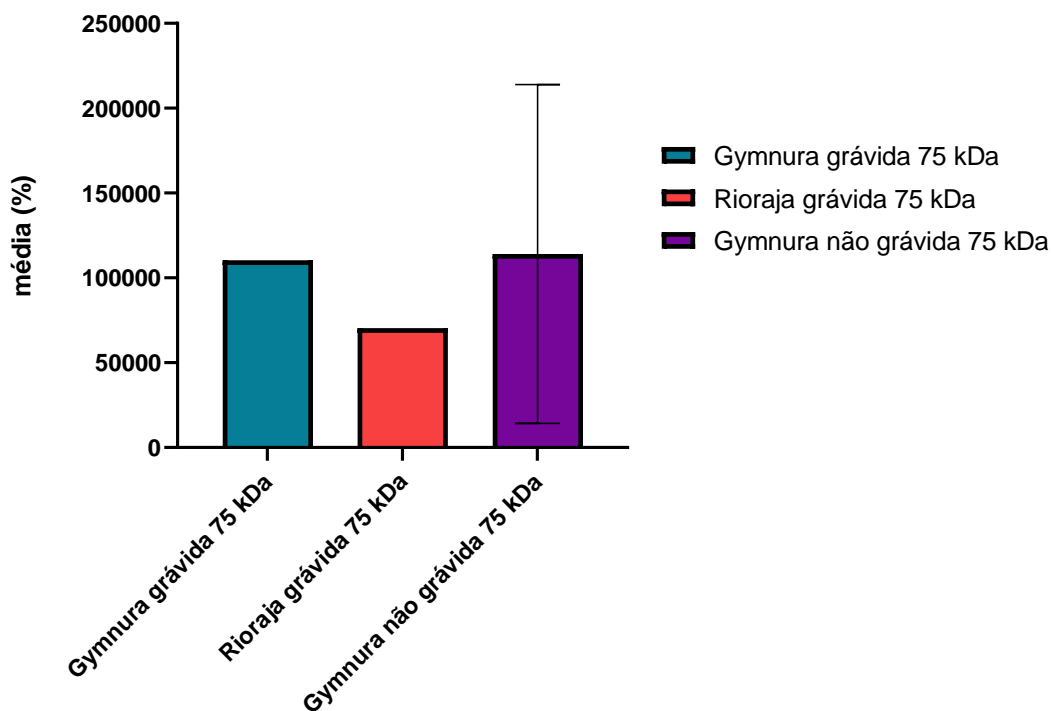


Figura 11. Gráfico comparando indivíduos grávida da espécie *Gymnura altavela* e *Rioraja agassizii* e não grávida, também, da espécie *Gymnura altavela* para 75 kDa.

Foi visto a comparação similar a anterior, no entanto, para o peso molecular de 15 kDa.

Com isso, foi observado que, contrariando os dados anteriores, a R.A grávida demonstrou a maior intensidade na expressão proteica, tendo sido considerada nos cálculos de porcentagem, como 100%, e a G.A não grávida apresentou a menor expressão, apresentando uma intensidade de 23,5%, também, sendo inversamente proporcional ao dado anterior. Já a G.A grávida demonstrou um valor na sua intensidade de 97,7%, como é possível observar na figura 12.

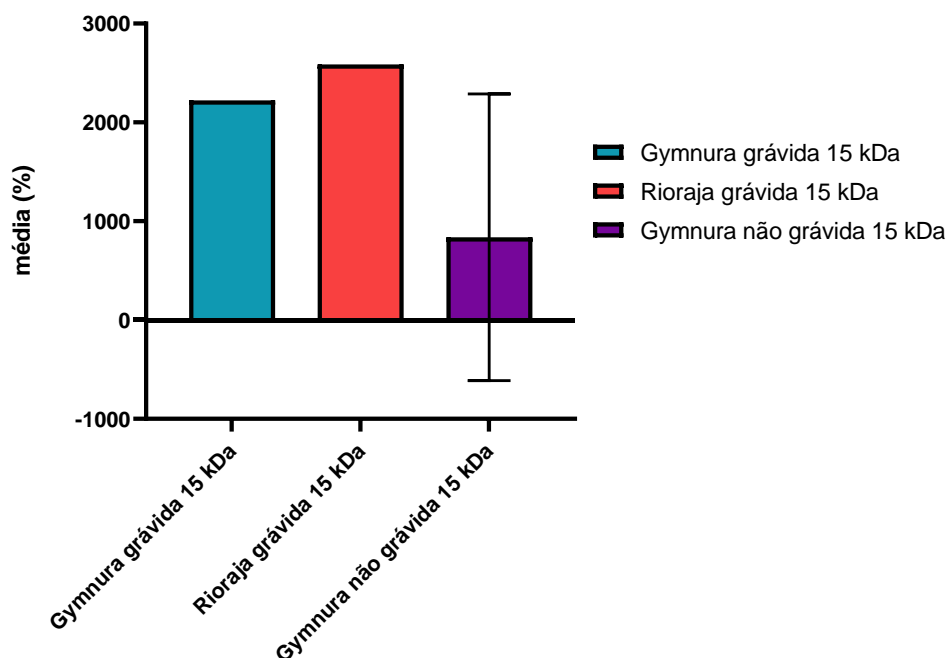


Figura 12. Gráfico comparando indivíduos grávida da espécie *Gymnura altavela* e *Rioraja agassizii* e não grávida, também, da espécie *Gymnura altavela* para 15 kDa.

A escolha dos dados discutidos nesse trabalho foi baseada na incidência da expressão, ou seja, os pesos moleculares que se repetiram para todas as variáveis analisadas, no entanto houve expressão proteica em outros pesos moleculares que só se apresentaram para uma das comparações, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Tabela contendo dados das expressões proteicas em pesos moleculares que só se apresentaram para uma das variáveis analisadas

Pesos moleculares que não se repetiram para todas as variáveis

	Rioraja (não termoestável)		Rioraja (termoestável)	
	média	SD	média	SD
250 kDa	-	-	39639,7	54734
100 kDa	-	-	19608,15	19074
50 kDa	4331	12250	-	-
25 kDa	4666,5	13199	-	-
20 kDa	4056,25	11473	-	-

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho revelam diferenças na expressão das proteínas, quando observado diferentes pesos moleculares, para as diferentes variáveis, como sexo, gestação, sendo elas termoestáveis ou não.

Foi visto diferenças entre machos e fêmeas em suas expressões, sendo que os machos apresentaram uma expressão mais intensa quando comparado as fêmeas.

Também foi visto diferenças na intensidade entre os indivíduos grávidas e não grávidas das duas espécies analisadas.

Houve uma menor tendência de intensidade para indivíduos grávidos da espécie *Rioraja agassizii* quando comparados a espécie *Gymnura altavela*, no entanto para o peso molecular de 15 kDa, ocorreu de forma contrária, a R.A grávida mostrou a maior intensidade na expressão e a G.A não grávida apresentou a menor expressão.

Vale destacar que foi obtido um n baixo, sendo n =1 para cada grávida de cada espécie e n = 3 para a G.A não grávidas. **(Vale jogar pra discussão??)**

Esses dados preliminares poderão ser fundamentais para compreendermos melhor como a expressão proteica pode variar entre espécies, condições fisiológicas, como durante a gestação, no caso deste trabalho, entre diferentes espécies, também em diferentes pesos moleculares, e sexos.

Contudo, devido à complexidade da expressão proteica nessas diferentes condições, se faz necessário mais investigações sobre esses fenômenos biológicos.

REFERÊNCIAS

Aarias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007

Adams, S. M. Ecological Indicators and Significance of Fishes in North American Large Rivers. *Ecological Indicators*, 2(3), 231-239.

Authman, Mohammad MN *et al.* Uso de peixes como bioindicador dos efeitos da poluição por metais pesados. *Journal of Aquaculture Research & Development*, v. 6, n. 4, pág. 1-13, 2015

Benincá, C. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho - Jaguaruna (SC) e Santa Marta - Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). 2006, 112 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

Bleckmanh, H. & Hofmann, M.H. 1999. Special Senses. Pp. 300-328. In: W.C. Hamlett (ed.). *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 515p.

Brunelle, Julie L.; VERDE, Raquel. Eletroforese unidimensional em gel de SDS-poliacrilamida (1D SDS-PAGE). In: *Métodos em enzimologia*. Imprensa Acadêmica, 2014. p. 151-159

Camhi, M.; Fowler, S.; Musick, J.; Bräntigam, A. & Fordham S. 1998. *Sharks and their Relatives Ecology and Conservation*. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 20: 1-63.

Carpenter, S. R., *et al.* (1987). "Regulation of lake primary productivity by food web structure." *Ecology*, 68(6), 1863-1876.

Chovanec, Andreas (2003). [Trace Metals and other Contaminants in the Environment] *Bioindicadores & Biomonitoring - Principles, Concepts and Applications Volume 6 || Chapter 18 Fish as bioindicadores*. , (), 639–676. doi:10.1016/s0927-5215(03)80148-0

Compagno, L.J.V. 1990. Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, 28: 33-75.

Compagno, L. J. V. (2001). *Sharks of the world: An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date (Vol. 2)*. FAO.

Consales, G.; Marsili, L. Assessment of the conservation status of Chondrichthyans: underestimation of the pollution threat. *The European Zoological Journal*, v. 88, n. 1, p. 165-180, 2021.

Cortés, E. & Parson, G.R. 1996. Comparative demography of two populations of the bonnethead shark. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 709-718.

Josberger, E. E. *et al.* Proton conductivity in ampullae of Lorenzini jelly. v. 2, n. 5, 6 maio 2016.

Da Cruz, Isis Danniele Cury. Caracterização iônica do gel das Ampolas de Lorenzini de elasmobrânquios marinhos. Universidade Federal do Paraná, 2017

Dallinger, R.; Rainbow, P. S. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

Fauna Digital do Rio Grande do Sul

Freitas, C. E. C.; Siqueira-Souza, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*, v. 1, n. 2, p. 39-45, 2009.

Freitas, C.E.C.; Soares, M.G.M.; Siqueira-Souza, F.K.; Costa, E.L. Indicadores Biológicos da Ictiofauna, p.77-85.

Frisk, M.G. Life history strategies of batoids. *Sharks and their Relatives. II. Biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 283-318, 2010.

Furtado-Neto M. A. A., Barros-Júnior F. V. P. Análise da produção pesqueira de elasmobrânquios no Estado do Ceará, Brasil, de 1991 a 2003. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 39, n. 1-2, p. 110-116, 2006

Gagné, F., Gagnon, P., Turcotte, P., & Blaise, C. (2019). Protein electrophoresis as a tool to assess the health of aquatic organisms in contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 328-335

Gilbert, Richard O. Métodos estatísticos para monitoramento da poluição ambiental. John Wiley & Filhos, 1987

Gov, Ministério do Meio Ambiente e Mudança de Clima, Serviços Ecossistêmicos. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas/biomas-e-ecossistemas/conservacao-1/servicos-ecossistemicos> Acesso em: 06/08/2024

Gruber, S.H. & Myrberg, A.A. 1977. Approaches to the study of the behavior of sharks. *American Zoology*, 17: 471-486.

Hoening, J. M. & Gruber, S. H. 1990. Life-history patterns in Elasmobranch Implication for Fisheries Management. NOAA Technical Report NMFS, 90: 1-15.

Holt, Rebecca E. *et al.* Distribution patterns and sexual segregation in chimaeras: implications for conservation and management. *ICES Journal of Marine Science*, v. 70, n. 6, p. 1198-1205, 2013

In: Cavalcante, K.V.; Rivas, A.A.F.; Freitas, C.E.C. [Org.] Indicadores Socioambientais e atributos de referência para o trecho Urucu-Coari-Manaus, rio Solimões, Amazônia Ocidental. Manaus, EDUA, 2007.

Jesus, T. B.; Carvalho, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia brasiliensis*, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

Jones, R., Patel, N., & Wang, X. (2020). Proteomic analysis of microbial communities during the degradation of environmental pollutants. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1023-1035.

Kalay, M.; Canli, M. Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*. Turkish Journal of Zoology, v. 24, n. 4, p. 429-436, 2000

Last, P.R., White, W.T., Carvalho, M.R. de, Séret, B., Stehmann, M.F.W. & Naylor, G.J.P. (Eds.). (2016). Rays of the World. CSIRO Publishing

Lemos, C. T.; Terra, N. R. Poluição: causas, efeitos e controle. Genética toxicológica, Porto Alegre: Alcance, 2003. 424 p.

List, IUCN Red *et al.* The IUCN red list of threatened species. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/> Acesso em: 09 de março de 2023.

Markert, B. Breure, A. M. Zechmeister, H. G. Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. p. 3–39, 1 jan. 2003.

Müller & Henle, 1841, *Rioraja agassizii*, Fishbase Santos & Carvalho, 2004, *Dasyatis hipostigma*, FishBase

Myers, S. S., *et al.* (2017). Planetary health: protecting human health on a rapidly changing planet. *The Lancet*, 390(10114), 2860–2868.

NELSON, D.R. 1977. On the Field Study of Sharks Behavior. American Zoology, 17: 501-507.

Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo. 2008.

Olson, K.R. Manual de toxicologia clínica. 6ª ed. AMGH Editora, 2014.

Pollom, R., Barreto, R., Charvet, P., Cuevas, JM, Faria, V., Herman, K., Marcante, F., Montealegre-Quijano, S., Motta, F., Paesch, L. & Rincon, G. 2020. *Rioraja agassizii* .

A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2020: e.T63109A3118640.

<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T63109A3118640>

Rosenberg, D. M., & Resh, V. H. (Eds.). (1993). "Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates." Springer Science & Business Media.

Silveira, F. F. Fauna Digital do Rio Grande do Sul, 2018. Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab - UFRGS. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/condrictes/>. Acesso em: 20 de maio de 2023

Smith, W. D., Lajeunesse, T. C., & Weigt, L. A. (2018). Status and phylogeography of the stingray *Plesiobatis daviesi* in the western Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 165(4), 76.

Srivastava, Varsha *et al.* Poluentes aquáticos citotóxicos e sua remoção por sorventes à base de nanocompósitos. *Chemosphere*, v. 258, pág. 127324, 2020.

Stevens, J.D.; Bonfil, R.; Dulvy, N.K.; Walker, P.A. 2000. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *Journal of Marine Science*, 57: 476–494.

Tiktak, Guuske P. *et al.* As concentrações de poluentes em tubarões, raias e raias (Elasmobranchii) são motivo de preocupação? Uma revisão sistemática. *Boletim de Poluição Marinha*, v. 160, p. 111701, 2020.

Toledo, André Correa; KWAI, Luana Ly; UNGER, Rafael. A Poluição dos Mares. *Holos Environment*, 2008.

UNICEF *et al.* em cada 3 pessoas no mundo não tem acesso a água potável, dizem o UNICEF e a OMS. 2021 <https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/1-em-cada-3-pessoas-no-mundo-nao-tem-acesso-agua-potavel-dizem-unicef-oms>

ANEXO 1

Tabela 2. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: elasmobranchii e proteomics)

TÍTULO	AUTORES	ANO DE PUBLICAÇÃO
Evidence of positive selection associated with placental loss in tiger sharks	Swift, D.G., <u>Dunning, L.T.</u> , <u>Igea, J.</u> , ... <u>Humble, E.</u> , Savolainen, V.	2016
Proteomic characterization of the acute-phase response of yellow stingrays <i>Urobatis jamaicensis</i> after injection with a <i>Vibrio anguillarum-ordalii</i> bacterin	Marancik, D.P., Fast, M.D., Camus, A.C.	2013
The physiological stress response in elasmobranch fishes: Selected papers from a symposium at the 26th annual meeting of the American Elasmobranch Society	<u>Mandelman, J.W.</u> , Skomal, G.B.	2012
Proteomic and physiological responses of leopard sharks (<i>Triakis semifasciata</i>) to salinity change	Dowd, WW,Harris, BN,Cech Jr., JJ,Kultz, D.	2010
Proteomic analysis of the spermatogonial stem cell compartment in dogfish <i>Scyliorhinus canicula</i> L	Loppion, G., Lavigne, R., Pineau, C., Auvray, P., Sourdaine, P.	2010
Natural feeding influences protein expression in the dogfish shark rectal gland: A proteomic analysis	Dowd, WW,Madeira, CM,Kajimura, M.,Walsh, PJ,Kultz, D.	2008

Tabela 3. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: proteomics e stingrays)

TÍTULO	AUTORES	ANO DE PUBLICAÇÃO
Biochemical and biological characterization of the <i>Hypanus americanus</i> mucus: A perspective on stingray immunity and toxins	Coelho, GR, Neto, PP, Barbosa, FC, Pimenta, DC, Sciani, JM	2019
A ray of venom: Combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (<i>Neotrygon kuhlii</i>)	Baumann, K., Casewell, N.R., Ali, S.A., Lavergne, V., Fry, B.G.	2014
Proteomic characterization of the acute-phase response of yellow stingrays <i>Urobatis jamaicensis</i> after injection with a <i>Vibrio anguillarum-ordalii</i> bacterin	Marancik, D.P., Fast, M.D., Camus, A.C.	2013

Tabela 4. Busca por palavras-chave específicas na base de dados Scopus (Palavras-chave: ampullae AND of AND lorenzini e elasmobranchii)

TÍTULO	AUTORES	ANO DE PUBLICAÇÃO
First report on metal and metalloids contamination of Ampullae of Lorenzini in sharks: A case study employing the Brazilian sharpnose shark <i>Rhizoprionodon lalandii</i> from Southeastern Brazil as an ecotoxicological model	Willmer, I.Q., Wosnick, N., Rocha, R.C.C., ...Vianna, M., Hauser-Davis, R.A.	2022

Electroreception in marine fishes: chondrichthyans	Newton, K.C., Gill, A.B., Kajiura, S.M.	2019
Morphological comparison of the ampullae of Lorenzini of three sympatric benthic rays	Gauthier, A.R.G., Whitehead, D.L., Tibbetts, I.R., Cribb, B.W., Bennett, M.B.	2018
Morphometry and microanatomy of the barbels of the common sawshark <i>Pristiophorus cirratus</i> (Pristiophoridae): implications for pristiophorid behaviour	Nevatte, R.J., Williamson, J.E., Vella, N.G.F., Raoult, V., Wueringer, B.E.	2017
Pulse trawling: Evaluating its impact on prey detection by small-spotted catshark (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	Desender, M., Kajiura, S., Ampe, B., ...Chiers, K., Decostere, A.	2017
Electrosensory-driven feeding behaviours of the Port Jackson shark (<i>Heterodontus portusjacksoni</i>) and western shovelnose ray (<i>Aptychotrema vincentiana</i>)	Kempster, R.M., Egeberg, C.A., Hart, N.S., Collin, S.P.	2016
Effects of an Electric Field on White Sharks: In Situ Testing of an Electric Deterrent	Huveneers, C., Rogers, P.J., Semmens, J.M., ...Page, B., Goldsworthy, S.D.	2013
Sexual dimorphism of the electrosensory system: A quantitative analysis of nerve axons in the dorsal anterior lateral line nerve of the blue-spotted fantail stingray (<i>Taeniura lymma</i>)	Kempster, R.M., Garza- Gisholt, E., Egeberg, C.A., ...O'Shea, O.R., Collin, S.P.	2013
Electroreception in Elasmobranchs: Sawfish as a Case Study	Wueringer, B.E.	2012

Morphological observations of ampullae of lorenzini in <i>Squatina guggenheim</i> and <i>S. occulta</i> (chondrichthyes, elasmobranchii, squatinidae)	Schäfer, B.T., Malavasi, C.E., Favaron, P.O., ...De Amorim, A.F., Rici, R.E.G.	2012
Electric field detection in sawfish and shovelnose rays	Wueringer, B.E., Jnr, L.S., Kajiura, S.M., ...Hart, N.S., Collin, S.P.	2012
Phylogenetic and ecological factors influencing the number and distribution of electroreceptors in elasmobranchs	Kempster, R.M., McCarthy, I.D., Collin, S.P.	2012
Analysis of permanent magnets as elasmobranch bycatch reduction devices in hook-and-line and longline trials	O'Connell, C.P., Abel, D.C., Stroud, E.M., Rice, P.H.	2011
Sensory systems in sawfishes. 1. the Ampullae of Lorenzini	Wueringer, B.E., Peverell, S.C., Seymour, J., ...Kajiura, S.M., Collin, S.P.	2011
A cephalic sensory system with a suggested mechanoreceptive function in two pentanchine Scyliorhinidae (Elasmobranchii)	Enderes, C., Bartsch, P.	2009
Do elasmobranch reactions to magnetic fields in water show promise for bycatch mitigation?	Rigg, D.P., Peverell, S.C., Hearndon, M., Seymour, J.E.	2009
<i>Dipturus wuhanlingi</i> , a new species of skates (Elasmobranchii: Rajidae) from China	Jeong, C.-H., Nakabo, T.	2008

The paddlefish rostrum as an electrosensory organ: A novel adaptation for plankton feeding	Wilkins, L.A., Hofmann, M.H.	2007
Ampullary organs and electroreception in freshwater <i>Carcharhinus leucas</i>	Whitehead, D.L.	2002
Neuroethology and life history adaptations of the elasmobranch electric sense	Sisneros, J.A., Tricas, T.C.	2002
Androgen-induced changes in the response dynamics of ampullary electrosensory primary afferent neurons	Sisneros, J.A., Tricas, T.C.	2000
Detection and processing of electromagnetic and near-field acoustic signals in elasmobranch fishes	Kalmijn, Ad.J.	2000
<i>Raja koreana</i> , a new species of skate (Elasmobranchii, Rajoidei) from Korea	Jeong, C.-H., Nakabo, T.	1997