

ANDRESSA CAROLINA MENDES DE MELO

**Morfologia Funcional dos órgãos envolvidos na osmorregulação de três
espécies de raias Myliobatiformes em Pernambuco - Brasil**

Recife

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ANDRESSA CAROLINA MENDES DE MELO

**Morfologia Funcional dos órgãos envolvidos na osmorregulação de três
espécies de raias Myliobatiformes em Pernambuco - Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biociência Animal.

Orientação: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientação: Dra. Maria Lúcia Góes de Araújo

Co-orientação: Dra. Mariana Gomes do Rêgo

**Recife
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M528m Melo, Andressa Carolina Mendes de
 Morfologia Funcional dos órgãos envolvidos na osmorregulação de três espécies de raias
 Myliobatiformes em Pernambuco - Brasil / Andressa Carolina Mendes de Melo. - 2020.
 100 f.

 Orientador: Joaquim Evencio Neto.
 Inclui referências.

 Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
 Biociência Animal, Recife, 2020.

 1. Osmorregulação. 2. Diferentes ambientes. 3. Morfologia. 4. Comparação. 5. Raias Myliobatiformes. I.
 Neto, Joaquim Evencio, orient. II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Morfologia Funcional dos órgãos envolvidos na osmorregulação de três
espécies de raias Myliobatiformes em Pernambuco**

Tese de Doutorado

Andressa Carolina Mendes de Melo

Defendida em 21 de fevereiro de 2020

Baca Examinadora

**Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE**

**Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá - Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE**

**Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio – Titular
Departamento de Histologia e Embriologia/UFPE**

**Prof. Valdir Luna da Silva – Titular
Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFPE**

**Prof. Dr. Adriando Teixeira de Oliveira – Titular
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas
(IFAM)**

Dedico tudo
Ao meu ouro de mina
Começo de tudo
Mainha e Painho

Agradecimentos

Aos meus pais Nelson Camilo de Melo e Antônia Mendes de Melo, e meus irmãos por todo suporte, companheirismo e participação ativa em todos os momentos da minha vida;

Ao meu orientador Prof. Joaquim Evêncio Neto pelo apoio, por acreditado nesse trabalho e confiado em mim. O sentimento de acolhimento e parceria no seu laboratório foi crucial para finalização dessa etapa. Além de tudo, nosso pai científico, um exemplo de profissional, ético, justo e sempre preocupado com o outro. Não tenho palavras para agradecer por tudo!

À inspiração de todo amor que desenvolvi pelos elasmobrânquios Profa. Maria Lúcia Góes de Araújo. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência e “puxões de orelha”. Você é minha mãe científica, fonte de imensa admiração e respeito;

À Dra. Mariana Gomes Rêgo pelo companheirismo, ensinamentos e boas risadas. Os momentos de angústia e incertezas sempre foram esquecidos nos dias de coleta, uma das melhores parcerias que fiz nessa jornada acadêmica. Obrigada pelo seu ouvido amigo e por todo o incentivo, me reencontrar nessa área foi “culpa” sua também;

Ao Prof. Fabrício Bezerra de Sá, pela paciência e todo ensinamento. Obrigada por sempre estar disposto a ajudar mesmo na correria da dupla jornada administrativa e acadêmica;

Aos Prof. Francisco Leite e Dra. Lígia Estevão, pelas trocas de conhecimento e auxílio sempre que precisei;

Ao Prof. Chris Wood pela recepção, paciência e ensinamentos. A oportunidade de trabalhar com fisiologia foi crucial no aprimoramento desse trabalho. Sua equipe sempre disposta a ajudar, June Eom, Alex Clifford, Anne Cremazy e Ellen Jung. Em especial, a Marina Giacomini por todo o suporte inicial e acomodação, além da ótima

companhia; também, minha querida companheira de labuta e diversão Beverly Po, obrigada!

Aos meus companheiros de laboratório de histologia por tornarem o trabalho mais fácil e ajudarem a enfrentar as dificuldades, em nome da nossa amiga querida e excelente profissional Maria Edna Gomes de Barros, muito obrigada!

Aos nossos colaboradores alunos de iniciação científica pela dedicação e ajuda, em especial o Cláudio Andrade que teve imensa contribuição nesse trabalho. Aos meninos queridos Ewerton e Diego por todo apoio emocional e boas risadas;

Aos meus companheiros de luta lá no Canadá, os brasileiros do Programa de Doutorado Sanduíche da CAPES que me acolheram e tornaram meus dias menos frios. Foi essencial ter pessoas boas ao lado quando a saudade de casa batia. Estender essa relação de volta ao Brasil, agora, com outros problemas: a falta de perspectiva, estímulo e reconhecimento desse governo que desacredita nos pesquisadores.

Aos funcionários do DMFA por toda ajuda e atenção em todos os momentos que precisei;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pelo suporte e incentivo;

Ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE em nome do funcionário Marcelo Andrade, pela disponibilidade e auxílio no uso das instalações e equipamentos;

Aos meus amigos Érica Bruna de Andrade Soares e Antônio Pedro Soares e família, pela ajuda e companheirismo durante esse tempo, muito obrigada! Estendo também um agradecimento especial ao meu amigo Edson Moura que dividiu comigo a vida de pós-graduando, altos e baixos essenciais para nosso crescimento.

Aos amigos ex-DIMAR Railma Vilanova, Jonas Eloi, Ana Melo, Aislan Santos e atuais Jonas Rodrigues, Philippe Queiroz pela troca de conhecimento e diversão em todos os momentos. Estendo ainda meu agradecimento coordenadora do DIMAR a Profa. Rosangela Lessa;

Aos meus companheiros de vida, saídas e noitadas Taiana Franco, Mônica Mendes e Cleydson Nunes. Sou muito grata pela amizade de vocês!

Ao Rik Nuijiten, meu companheiro e parceiro mais recente nessa trajetória. Desafiamos o tempo e a distância ao acreditar nessa aventura e até agora tudo está valendo a pena;

Aos pescadores Daniel Galvão e seus ajudantes, Sr. Mano e Cléia, Sr. Roberto e família. Obrigada pela ajuda e ensinamentos!

Aos órgãos de Fomento: pela bolsa de doutorado, a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE); bolsa de doutorado Sanduíche, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Os elasmobrânquios apresentam estratégias osmorregulatórias distintas dos demais grupos, dos órgãos relacionados à regulação osmótica nesse grupo, a glândula retal é essencial no ambiente marinho e responsável pela secreção de cloreto de sódio em grandes quantidades. Sua importância diminui em ambientes diluídos, tendo em vista a necessidade de manter e não secretar íons. É nesses ambientes (diluídos) que o influxo de água e efluxo de íons e de uréia em excesso também são observados, sendo necessária a reabsorção de íons de forma ativa pelas brânquias e rins. Esses animais enfrentam variações abióticas muitas vezes extremas ao mudar de ambientes hipertônicos (água do mar) a hipotônicos (água doce). Neste sentido, o presente estudo analisou as variações morfológicas dos órgãos associados a osmorregulação de três espécies de raias Myliobatiformes: *Aetobatus narinari*, *Hypanus guttatus* e *Hypanus marianae* capturadas no litoral norte de Pernambuco, Brasil, oriundos da pesca artesanal. De cada animal, a glândula retal, os rins e brânquias (apenas do gênero *Hypanus*) foram coletados, processados e preparados para análise em microscopia de luz e eletrônica de varredura. A glândula retal é um órgão encapsulado, com uma fina camada de tecido musacular liso, um parênquima secretório e delimitada por um epitélio estratificado conectado ao ducto coletor/lúmen. *A. narinari* tem a glândula retal maior que as raias *Hypanus*, apesar da glândula representar apenas 2,5% da largura de disco enquanto para *H. marianae* e *H. guttatus* foi 3,9% e 4,1%, respectivamente. A raia *H. marianae* apresentou redução de estruturas como espessura da cápsula e lóbulos pouco divididos em relação à *H. guttatus* e *A. narinari*. A raia *H. guttatus* transita entre a água do mar e região estuarina e também apresentou variação nesses componentes, em ambiente diluído o parênquima secretório ocupou cerca de 49% da glândula retal, enquanto no ambiente marinho 36%. Nos rins, foram observadas variações no corpúsculo renal (CR) e em segmentos do néfron. A raia *A. narinari* apresentou maiores diâmetros dos CR ($164,04 \pm 20,67 \mu\text{m}$) em comparação a *H. guttatus* ($106,06 \pm 180,5 \mu\text{m}$) e *H. marianae* ($81,37 \pm 17,55 \mu\text{m}$). As células da porção do túbulo distal que compõem o aparelho justaglomerular variaram de cúbicas altas em *A. narinari* a cúbicas baixas no gênero *Hypanus*; o segmento intermediário do nefrón de *H. marianae* apresentou células prismáticas menores resultando em maior lúmen e numa distribuição mais esparsa no lóbulo renal. Nas brânquias, as lamelas da raia *H. guttatus* forma mais longas do que as de *H. marianae*, a presença de um sacos vasculares, células mucosas e proliferação de células epiteliais na porção mais externa da lamea observada nas as duas espécies. As células mucosas presentes na região interlamelar foram mais comumente observadas em *H. guttata* do que *H. marianae*. As variações observadas demonstram o nível de adaptação desses animais aos diversos ambientes sua significância na resposta fisiológica de cada espécie.

Palavras-chave: osmorregulação, diferentes ambientes, salinidade, comparação, morfologia, raias Myliobatiformes

Abstract

Elasmobranchs present osmoregulatory strategies that are distinct from other groups, the organs related to osmotic regulation in this group, the rectal gland is essential in marine environment and responsible for the secretion of sodium chloride in large quantities. Its importance decreases in diluted environments in view of the need to maintain and not secrete ions. In these (diluted) environments the influx of water and the ions and excess urea efflux are also observed, requiring the active resorption of ions by the gills and kidneys. These animals face abiotic variations that sometimes are too extreme when they face changing of hypertonic (seawater) to hypotonic (freshwater) environments. In this sense, the present study analyzed the morphological variations of the organs associated with the osmoregulation in three species of Myliobatiformes stingrays: spotted ray *Aetobatus narinari*, longnose stingray *Hypanus guttatus* and large-eye stingray *Hypanus marianae* captured on the north coast of Pernambuco, Brazil, from artisanal fisheries. From each animal, the rectal gland, kidneys and gills (only the genus *Hypanus*) were collected, processed and prepared for analysis in light and scanning electron microscopy. The rectal gland is an encapsulated organ, with a thin layer of smooth muscle tissue, a secretory parenchyma and bounded by a stratified epithelium connected to the collecting duct / lumen. *A. narinari* has a large rectal gland in comparison with *Hypanus* stingrays, although the gland represents only 2.5% of the disk width, whereas for *H. marianae* and *H. guttatus* was 3.9% and 4.1%, respectively. The large-eye stingray *H. marianae* showed a reduction in some structures, such as capsule thickness and less lobes division in relation to *H. guttatus* and *A. narinari*. The longnose stingray *H. guttatus* transits between seawater and estuarine regions and also showed variation in these components, in the estuarine environment the secretory parenchyma occupied about 49% of the rectal gland, while in the marine only 36%. In the kidneys, variations were observed in the renal corpuscle (RC) and in the nephron segments. The spotted ray *A. narinari* showed larger diameters of the RC ($164.04 \pm 20.67 \mu\text{m}$) compared to *H. guttatus* ($106.04 \pm 180.5 \mu\text{m}$) and *H. marianae* ($81.37 \pm 17.55 \mu\text{m}$). The cells in the portion of the distal tubule that make up the justaglomerular apparatus ranged from high in *A. narinari* to low cubic cells in the genus *Hypanus*; the intermediate segment of the *H. marianae* nephron showed smaller prismatic cells resulting in a larger lumen and a more sparse distribution of this segment in the renal lobe. In the gills, the lamellae of the *H. guttatus* are longer than those of *H. marianae*, and the presence of vascular sacs, mucous cells, and proliferation epithelial cells in the outermost portion of the lamella were observed in both species. Mucous cells present in the interlamellar region were more commonly seen in *H. guttatus* than *H. marianae*. The observed variations demonstrate the level of adaptation of these animals to the different environments and their significance in the physiological response of each species.

Keywords: osmoregulation, different environment, comparison, morphology,

Myliobatiformes stingrays

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
1. VISÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Osmorregulação	20
2.2. Elasmobrânquios	22
2.3. Glândula Retal	25
2.4. Brânquias.....	27
2.5. Rins.....	30
2.6. Caracterização das espécies.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Geral.....	35
3.2. Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Área de coleta.....	35
4.2. Processamento das amostras	36
4.3. Microscopia de luz e microscopia de varredura.....	36
4.4. Morfometria.....	37
4.5. Análise estatística	37
5. REFERENCIAS.....	38
CAPITULO II: Artigo I.....	48
CAPÍTULO III: Artigo II	67
CAPÍTULO IV: Artigo III.....	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

Figura 1: Esquema de osmorregulação em peixes marinhos. a) regulação hipopsmótica dos peixes a perda de água por osmose através das brânquias e outros tecidos permeáveis são compensados bebendo água do mar. b) o excesso de íons é secretado pela glândula retal, com papel secundário das brânquias e parte da uréia é secretada via branquial. Modificado de MCCORMICK, Stephen D.; FARRELL, Anthony Peter; BRAUNER, Colin J. (Ed.). Fish physiology: euryhaline fishes. Academic Press, 2013. 22

Figura 2: a) Localização da glândula retal na porção terminal do intestino dos elasmobrânquios, desenho esquemático de um tubarão. b) Corte transversal de uma glândula retal mostrando o parênquima secretor, o lúmen e a cápsula. Corado com PAS. C) Diagrama simplificado (Ballantyne e Fraser, 2013) das células ricas em mitocôndrias e os transportadores envolvidos no transporte de NaCl. A bomba Na^+/K^+ -ATPase (NKA) transporta 2K^+ para dentro da célula e 3Na^+ para lúmen. O Na^+ no lúmen ativa o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC), que transporta um Na^+ , um K^+ e dois Cl^- para o interior celular. Canais de cloreto na membrana apical na célula epitelial transportam o Cl^- para o lúmen, e o K^+ transportado (NKCC) para dentro da célula é transportado novamente para lúmen via canais de K^+ . O lado basolateral fica mais positivo pela saída do K^+ e junto com a negatividade do lado apical pela saída do Cl^- geram gradiente elétrico que favorece o transporte de Na^+ viaparacelular, formando assim o NaCl que será excretado pela glândula retal. 27

Figura 3: Esquema geral da morfologia das brânquias de elasmobrânquios. A) Visão ventral de corte frontal da região branquial, mostrando as cavidades branquiais e brânquias. B) Aumento de um corte de uma holobrânquia da região pontilhada amarela (A) mostrando a p posição do arco brânquial, filamentos e lamelas. C) Ampliação da caixa pontilhada preta (B) de corte através três filamentos mostrando a configuração lamelar: epitélio lamelar, células pilares, canais sanguíneos e epitélio interlamelar do filamento visto em corte tranversal (D) em detalhe. D) Composição do epitélio do filamento brânquial: célula ricas em mitocôndria (MRC) na região interlamelar; célula pilar (CP), canal sanguíneo (CS) e epitélio lamelar (EL). Desenhos esquemáticos adaptados de Wegner (2015). Fotomicrografia corada com hematoxilina e eosina (autoral). 29

Figura 4: Confirguração de rim de eslasmobânquio separado pelas zona empacotada e sinusal e composição celular dos segmentos tubulares. A) Desenho baseado na sequência simplificada do néfron indicando o corpúsculo renal (RC), bainha peritubular e ducto coletor. B) Corte transversal de rim de raia mostrando a zona empacotada mais estreita (mais escura) e a zona sinusal (mais clara) ocupando maior parte do parênquima renal. Os corpúsculos renais são observados na região mais dorsal do rim delimitando o zoneamento dos túbulos renais. C) Composição do epitélio renal em cada segmento do nefrón a partir do corpúsculo renal até o ducto

coletor. Desenhos (A, C) adaptados de Lacy e Reale (1985). Fotomicrografia corada com hematoxilina e eosina (autoral).....	32
Figura 5: Exemplar de <i>Huypanus guttatus</i> vista dorsal (a) e ventral (b).....	34
Figura 6: Exemplar de <i>Huypanus marianae</i> vista dorsal (a) e ventral (b).....	34
Figura 7. Exemplar de <i>Aetobatus narinari</i> vista dorsal (a) e ventral (b).....	35

CAPÍTULO II: ARTIGO 1

Figura 1: Rectal gland lobulated aspect of <i>Hypanus marianae</i> (A) <i>Hypanus guttatus</i> (B) and <i>Aetobatus narinari</i> , (C). In transverse section, the lobular organization, the central duct (arrowhead) and blood vessel (*) are visible in the inner part of the gland from <i>Hypanus marianae</i> (D) <i>Hypanus guttatus</i> (E) and <i>Aetobatus narinari</i> (F). Scale bar (A) 0.5 cm, (B-C) 1cm, (D-F) 0.1cm	53
--	----

Figura 2: A - Cross-section of anterior portion of male <i>Hypanus guttatus</i> rectal gland. The superficial epithelium (EP) surrounds externally the capsule and just below it the concentric connective tissue layer (CT) with several blood vessels (BV) from capsule. The secretory parenchyma (SP) is partially divided by interlobular septum (IS) and in the innermost part of the gland occur the central duct (CD). Venous drainage is performed by the intestinal dorsal vein (IDV) and a main artery (ART). B - Cross-section of anterior portion of female <i>Hypanus guttatus</i> rectal gland, where are observed the secretory parenchyma (SP), interlobular septa (IS), large venous sinus (VS) near the central duct with central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*) and the lymphoid tissue external of the gland . H&E Staining	54
--	----

Figura 3: General secretory tubules of Myliobatiformes stingrays. A - The scheme of the different tubules and secretory cells with prominent basal nuclei. B: Near the capsule tubules high cubic cells and small lumen are abundant (1). C: As approach to the central duct in the middle portion of parenchyma, the secretory cubic cells became lower and tubules with medium and large lumens are visible. Arrowhead indicates one secretory cell with vacuolized cytoplasm; * extra tubular space with capillaries and nucleated red blood cells visible. H&E Stain	55
--	----

Figura 4: A - Cross-section of posterior portion of male <i>Hypanus guttatus</i> rectal gland, where central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), lobular duct (LD), connective tissue (CT), secretory parenchyma (SP), B - Cross-section of medium	
---	--

portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland, where central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), venous sinuses (VS), connective tissue (CT), arrowhead indicates epithelium basal membrane. C-F, detail of stratified epithelium, showing reduction of the number of mucous cell (**) from anterior part (C), through middle part (D-E) to posterior region (F) of the gland. H&E Stain 56

Figura 5: Transverse section of the anterior part of the rectal gland, with detail of capsule component of A – *Hypanus marianae*. B- *Hypanus guttatus*. C- *Aetobatus narinari*. The superficial epithelium (arrowhead), the concentric connective tissue (CT), and (**) smooth muscle layers, and the secretory parenchyma (SP). Epithelium cell with acidophilic granules (arrow). H&E Stain 56

Figura 6 A -Cross-section of anterior portion of female *Hypanus marianae* rectal gland. B- Cross-section of anterior portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland. C- Cross-section of anterior portion of rectal gland male *Aetobatus narinari* Where : Capsule (C), secretory parenchyma (SP) is partially divided by interlobular septum (IS) in Lobules (L), large venous sinus (VS) near the central duct with central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), lobular duct (arrowhead) and the lymphoid tissue (LYN) external of the gland. H&E Stain 57

Figura 7: Rectal gland cross-section of: A – *Hypanus marianae*, showing the secrete tubule (ST) open direct into central lumen (CL) (arrowhead), intraepithelial acidophilic cells (arrow) at stratified epithelium (*). B- *A. narinari* showing the thickness of stratified epithelium (*) lining the central lumen (CL), and the lobules around the central duct. Stained with H&E..... 57

CAPÍTULO III – Artigo 2

Figure 1. The rectal gland outlayer tissue of *Aetobatus narinari* (a-b), *Hypanus guttatus* (c-d) and *Hypanus marianae* (e-f). The thicker connective tissue of the capsule (asterisks) vary in between species and could be visualised in different stains. The presence of acidophilic cells in the peritoneum layer is observed only in *H. guttatus* (c-d), detailed in “c” shows the granules in these cells. Note the thin smooth muscle layer (stars) under the connective tissue with elongate cells. And abundant blood vessels (BV) in the capsule of the organ. (a,c,d) stained with H&E, detailed in “c” is Giemsa stain; (b) Masson’s trichrome; (d) Gomory’s trichrome; (f) PAS. 72

Figure 2. Composition of the stratified epithelium of the central lumen of stingrays. (a) cross-section of the epithelium showing cell specialization and distribution along with the layer. (b) On the surface near the lumen, granular cells (GC) and their granules are shown, also mucous cells (MC) are present in this area. Right below, the intermediated cells (IC) and lining in the basement membrane (BM) the basal cells (BC). (a) 40x, (b) 100x, stained with PAS..... 73

Figure 3. The stratified epithelium of *Aetobatus narinari* (a-c), *Hypanus guttatus* (d-f) and *Hypanus marianae* (g-i). High affinity with AB stain is observed in “a” and “d” when compared with “g”, also for the *A. narinari* the layer thickness is prominent (b) and shows some filaments in surface (arrowhead). (b,f,h). (c,f,i) Electron micrographs of the central lumen. H&E stained. SL stratified layer, SP secretory parenchyma, BM basal membrane, L lumen. Scale bars 50µm. 74

Figure 4. The kidney configuration of three Myliobatiformes stingray. The lobule is zoned by the bundle and sinus zone. In the cortical area of the parenchyma, the bundle zone of *Aetobatus narinari* (a) is large in comparison with species of *Hypanus guttatus* (c) and *Hypanus marianae* (e). The sinus zone occupying major part of the parenchyma and the area of each nephron segment, in special the intermediate one, shows differences between species. In “a” the circle represents the germinal zone in the lateral periphery of the lobule. The size of the renal corpuscle and its distribution delimiting the zones is shown. The variation in cuboid cells of the distal tubule that compound the juxtaglomerular apparatus is shown (b,d,f), notice the abundant euchromatin in the nuclei in “f”. SZ sinus zone, BZ bundle zone, CR corpuscle renal, Px proximal segment, D distal segment, G glomerule..... 75

Figure 5. Photomicrography of the gill filament of Myliobatiformes stingrays. (a) longitudinal cross section of *Hypanus guttatus* and *Hypanus marianae* (c) showing differences in lamellar sizes. (b) magnified image of the box in (a) with lamellar vascular sacs (VS) filled with red blood cells and cellular proliferation (CP) in the apical surface of the lamellae. (d) Gill cellular composition, in the inner most layer the filament body with epithelial cells and blood vessels are visualized, between the lamellae the interlamellar (IS) space is compound by mitochondria rich cell and mucous cells (not shown). The lamellae have three types of cells the pavement cells (PVC), undifferentiated cells and pillar cells (PC). (e) Scanning electron micrography of a cross section through the lamella, showing the blood channel (BC) composed by pillar cells (PC) and the pavement cells (PVCs) overlaying the lamellar surface. RBC red blood cell. Stained with H&E. 77

CAPÍTULO IV: Nota científica

Figura 1 Pontos de coleta na zona estuarina e costeira marinha do litoral norte de Pernambuco, Brasil. 88

Fig. 2 Composição da glândula retal de *Hypanus guttatus* marinho (a) e *Hypanus guttatus* estuário (b). (a,b) O parênquima secretório (PS) é dividido por septos interlobulares (SI) compostos de tecido conjuntivo delimitado pelo epitélio estratificado (▼) no ducto central conecado ao lúmen (L). Coloração Hematoxilina e Eosina. CA: cápsula..... 91

Figura 3 Fotomicrografia da glândula retal de *Hypanus guttatus* estuarina (a) e marinha (b). (a,b) Cápsula (CAP) composta externamente pelo peritônio (P), tecido conjuntivo denso não modelado (TC), camada muscular (**), vasos sanguíneos (VS); internamente, no parênquima secretor, os túbulos secretores (TS) e vários capilares (▼) são observados. Coloração de Tricrômico de Gomori.....91

Figura 4 Túbulos secretores do parênquima da glândula retal de *Hypanus guttatus*. (a) ambiente estuarino e (b) ambiente marinho, células secretoras eosinofílicas do túbulo secretor (círculo), lúmen, capilares (seta) e vácuolo no citoplasma das células secretoras (cabeça de seta) mais desenvolvido em ambiente marinho do que estuarino. Coloração H&E.....92

Figura 5 Epitélio estratificado do ducto central de diferentes regiões da glândula retal de *Hypanus guttatus*. (a) Região posterior da glândula de um animal marinho (b) e estuarino (b), (c) região anterior da glândula de um animal estuarino. Observa-se maior presença de grânulos (seta) na superfície do epitélio de *H. guttatus* marinho (a), enquanto nos animais estuarinos (b-c) observa-se maior presença de células mucosas (*). Células com característica acidófila são frequentemente observadas no epitélio estratificado da glândula retal (◀). Coloração H&E.....93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: ARTIGO 1

Table 1 Disc width and Rectal gland length (mean $\pm$ SD), linear equation, coefficient of determination (r^2) and Pearson Coefficient test of three Myliobatiformes stingray ... 54

Table 2 Morphometric parameters of the rectal gland of the three stingrays analyzed in this study 58

CAPÍTULO III: Nota Científica

Tabela 1 Morfometria da glândula retal da raia *Hypanus guttatus* capturada em ambientes estuarino e marinho.....90

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. VISÃO GERAL

A osmorregulação constitui uma das únicas formas dos peixes manterem a integridade orgânica dos seus sistemas e estabilizar internamente os componentes dos fluidos corporais. De uma forma geral, os elasmobrânquios utilizam diferentes estratégias osmorregulatórias para lidar com os estímulos ambientais aos quais estão condicionados. O acúmulo de uréia e N-óxido de trimetilamina nos fluídos corporais é utilizado para minimizar a perda de água no ambiente marinho, enquanto elasmobrânquios que vivem em ambientes diluídos tendem a diminuir a concentração desses compostos gradualmente.

Dos órgãos relacionados à regulação osmótica nesse grupo, a glândula retal é essencial no ambiente marinho e responsável pela secreção de cloreto de sódio em grandes quantidades. Sua importância diminui em ambientes diluídos, tendo em vista a necessidade de manter e não secretar íons. As raias de água doce são exemplo vivo da diferente funcionalidade do órgão em relação ao ambiente, nesses animais a glândula retal é reduzida e nos casos das raias *Potamotrygonidae* é vestigial. É nesses ambientes (diluídos) que o influxo de água e efluxo de íons e de uréia em excesso também são observados, sendo necessária a reabsorção de íons de forma ativa pelas brânquias e rins.

A presente tese teve como objetivo analisar as estratégias osmorregulatórias associadas à diferentes habitats na subordem *Myliobatiformes*. Para isto, duas espécies de raias da mesma família e uma espécie externa foram utilizadas, as raias *Hypanus guttatus*, *Hypanus marianae* e *Aetobatus narinari*. Para analisar as diferenças e semelhanças entre as espécies, foram realizadas análises microscópicas e morfométricas na glândula retal, brânquias e rins. Os capítulos fornecem informações sobre variações e adaptações dessas espécies através da composição tecidual, no contexto da função osmorregulatória. As informações obtidas no presente estudo servem de base para o entendimento sobre as diferentes estratégias desses animais em relação ao ambiente e a forma de vida, tendo em vista a limitada bibliografia sobre esses animais que são classificados na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de Extinção como deficiente de dados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Osmorregulação

Processos osmorregulatórios são aqueles que permitem que o animal mantenha sua composição de fluido celular e volume em equilíbrio, são de crucial importância porque os processos protéicos das células são sensíveis à concentração iônicas, e as membranas celulares toleram desvios relativamente pequenos do volume celular (EVANS, 2011). A água não é ativamente transportada pelas membranas biológicas, e conseqüentemente o movimento dos fluídos através das superfícies epiteliais e endoteliais é regulado pelos gradientes de pressão osmótico e hidráulico gerados, ajustando a permeabilidade das barreiras compartimentais (OLSON, 1999). Assim, a regulação osmótica depende da relação entre as concentrações de soluto e solvente dos fluidos corporais internos (intra e extracelular) e o meio ambiente (HAMMERSCHLAG, 2006).

Cerca de 50% das espécies de vertebrados conhecidos são peixes (~ 60,000 spp), os quais 96% são peixes ósseos (Osteichthyes) e 3,5% peixes cartilaginosos (Chondrichthyes) (NELSON, 2016). Do total de espécies conhecidas, apenas 43% são predominantemente de água doce e apesar deste habitat constituir uma proporção pequena da superfície aquática do planeta, contém desproporcionalmente um grande número de espécies.

Os processos associados com o sucesso dos peixes em ambientes de água doce tem sido atribuído a eventos geológicos como incursões marinhas (inundação dos continentes) o que levou a colonizações desses ambientes por vicariância (WILSON et al., 2008; YAMANOUE et al., 2011). Notavelmente, adaptações da fauna moderna de peixes derivam de ancestrais de água salobra, como estuários, e a alta riqueza de espécies nessas áreas podem ter contribuído com a colonização bem sucedida dos peixes à água doce (COATES, 1993; BLOOM; LOVEJOY, 2012; KIRCHHOFF et al., 2017).

Os peixes evolutivamente desenvolveram três estratégias para manutenção osmótica e homeostase iônica: osmoconformadora, animais que mantém a composição interna osmótica similar a encontrada na água do mar; hipoosmoreguladora, quando regulam os fluídos extracelulares internos abaixo da concentração de sal da água do mar; e hiperosmoreguladora, quando regulam seus

fluídos extracelulares internos a uma maior concentração de sal do que o ambiente diluído circundante (EDWARDS; MARSHAL, 2013). De acordo com o grau de tolerância à variação de salinidade, são conhecidas espécies com restrita tolerância as variações nas amplitudes de salinidade (estenoalinas) e aquelas que toleram amplas variações (eurialinas).

As diferenças nas concentrações iônicas (e total osmótico) entre as águas salgada e doce são extremas (1000 vezes, na maioria dos casos) se comparadas com as concentrações iônicas do plasma dos peixes (aproximadamente três vezes) (EVANS, 2011). Na água salgada, os peixes desenvolveram uma variedade de estratégias adaptativas, os peixes ósseos mantêm seus fluídos extracelulares (FEC) em torno de 150 mmol NaCl, enquanto isso compensam osmolitos intracelulares (K^+ , Cl^- e osmolitos orgânicos), o que os tornam hipoosmóticos em relação ao ambiente. Desta forma, lidam com a depleção do volume celular bebendo água do mar e expelindo excesso de Na^+ e Cl^- pelas brânquias (EVANS et al., 2005) (Figura 1a). Os elasmobrânquios (peixes cartilaginosos), por outro lado, são ligeiramente hiperosmóticos em relação ao ambiente marinho (SMITH, 1931; THORSON, 1962). Eles mantêm a concentração de Na^+ e Cl^- em torno de 250 mmol, enquanto o restante de soluto celular (~500 mOsm/L) consiste em osmolitos orgânicos como uréia e óxido de trimetilamina (OLSON, 1999), não necessitando beber água do mar como mecanismo compensatório (Figura 1b).

Quando um peixe se movimenta da água salgada para um ambiente menos concentrado (estuários ou água doce), a osmolalidade do sangue diminui e tal mudança induz um estresse hipoosmótico e aumento de volume celular até que o volume seja restaurado. De forma inversa, quando um peixe se movimenta da água doce para ambientes salinos, o sangue se torna temporariamente mais concentrado, causando encolhimento celular e a regulação do volume celular aumenta para que o mesmo seja restaurado (EDWARDS; MARSHALL, 2013).

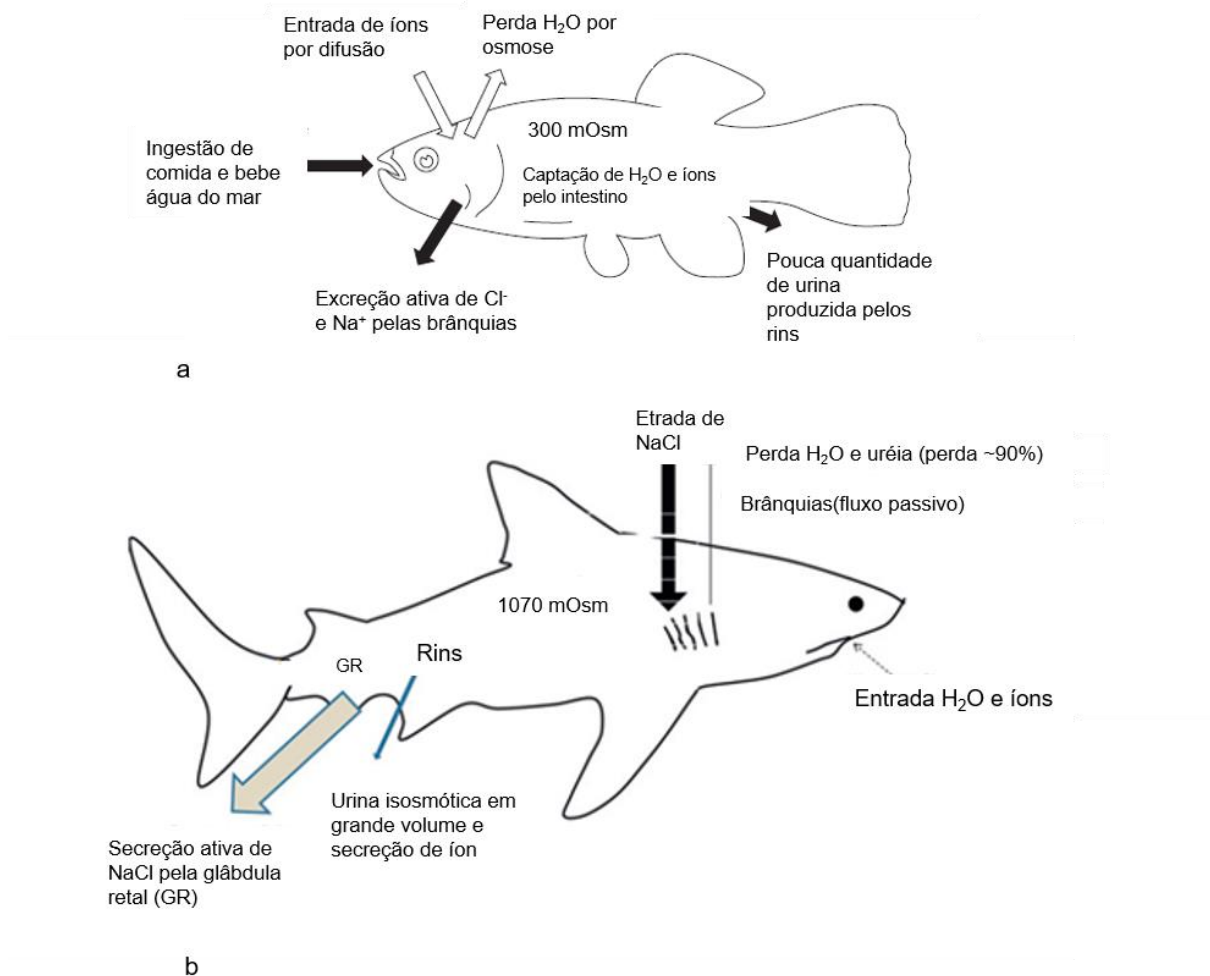


Figura 1: Esquema de osmorregulação em peixes marinhos. a) regulação hiposmótica dos peixes a perda de água por osmose através das brânquias e outros tecidos permeáveis são compensados bebendo água do mar. b) o excesso de íons é secretado pela glândula retal, com papel secundário das brânquias e parte da uréia é secretada via branquial. Modificado de MCCORMICK, Stephen D.; FARRELL, Anthony Peter; BRAUNER, Colin J. (Ed.). Fish physiology: euryhaline fishes. Academic Press, 2013.

2.2. Elasmobrânquios

Os elasmobrânquios são amplamente distribuídos em ambientes marinhos, apesar disso, 5% das espécies possuem o hábito e a capacidade de entrar em estuários e chegar até a água doce (HELFMAN et al., 1997; WEIGMAN, 2016; LUCIFORA et al., 2017) e apenas 1% vive exclusivamente em água doce (MARTIN, 2005). Evolutivamente, esses animais apresentam três estágios de colonização para ambientes mais diluídos (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). O primeiro estágio abrange as espécies marinhas que entram ocasionalmente em água doce, como o

tubarão cabeça-chata (*Carcharhinus leucas*) (JENSEN, 1976) e a raia manteiga (*Hypanus guttatus*) (THORSON; BROOKS, 1983). As espécies que vivem em água doce e toleram aumento de salinidade são classificadas no estágio dois, exemplos deste grupo incluem as populações da raia *Dasyatis sabina* no sistema do rio St. Johns da Flórida (JOHNSON; SNELSON, 1996). As raias da família Potamotrygonidae são classificadas no terceiro estágio e são espécies que vivem exclusivamente em água doce, perdendo a tolerância ao aumento de salinidade (THORSON, 1978).

Recente estudo evolutivo sobre a conquista da água doce por esses animais, indica que os processos de vicariância são as principais causas da colonização da água doce pelas raias de ferrão (KIRCHHÖFF et al., 2017). Além de outros fatores, eles sugerem que os sistemas de água salobra (estuários, lagos, etc.) são um gargalo evolutivo para a colonização, forçando as linhagens de água salobra de volta para os habitats marinhos resultando numa taxa de diversificação das linhagens de água doce, o que pode refletir processos ecológicos de especiação conduzidos pela adaptação ao novo nicho.

Espécies que toleram uma ampla variação de salinidade são denominadas de eurialinas, incluem o peixe-serra (Pristidae), alguns tubarões (Carcharhinidae), uma espécie da família Rajidae e vários membros da família Dasyatidae (LUCIFORA et al., 2015). As espécies que entram ou se restringem a água doce ocorrem apenas em regiões tropicais e subtropicais (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010) e aproximadamente 43 espécies podem tolerar a água doce por um longo período de tempo (MARTIN, 2005). Em resposta a essas variações, algumas espécies apresentam pressões osmóticas diferentes, chegando a reduzir o nível de solutos quando comparados às espécies marinhas (EDWARD; MARSHALL, 2013). Elasmobrânquios eurilianos e de água doce compreendem três ecomorfotipos não especializados, as espécies rajobentônicas, pristobentônicas e litorâneas (COMPAGNO, 1990), as adaptações à habitats de baixa salinidade podem ser em grande parte fisiológica em vez de morfológicas (MARTIN, 2005).

No ambiente marinho, a água tende a entrar no corpo dos animais devido uma maior concentração de solutos e sair quando o meio circundante contém maior concentração. Neste aspecto, os elasmobrânquios marinhos são hipertônicos em relação à água do mar (SMITH, 1931; THORSON, 1962) enquanto teleósteos marinhos são substancialmente hipotônicos (EVANS et al., 2005). Ambos enfrentam as consequências do influxo de sal (NaCl), porém de maneira distintas. Os teleósteos

bebem água do mar para compensar perda de água e expelem os íons Na^+ e Cl^- pelas brânquias (EVANS et al., 2005), enquanto os elasmobrânquios tem um órgão especializado (glândula retal) que ajuda a eliminar o excesso de sal não sendo necessária a ingestão de água (PIERMARINI; EVANS, 2000; BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). Fisiologicamente, apenas a glândula retal tem a capacidade de secretar Na^+ e Cl^- em concentrações maiores que as do plasma (OLSON, 1999). Devido a retenção de uréia (~350 mM) e N-óxido de trimetilamina (TMAO) como osmolitos no sangue e fluídos intersticiais (EDWARDS; MARSHAL, 2013) os elasmobrânquios apresentam uma elevada pressão osmótica e, como consequência, a água tende a entrar no corpo por osmose, assim como eletrólitos tendem a entrar por difusão devido a concentração de sais no sangue ser menor do que presente no mar (VLAMING; SAGE, 1972).

O acúmulo de uréia é tão importante para a estratégia osmorregulatória desse animais, que a manutenção de valores basais ($< 1\text{mM}$) deste osmólito pode ser considerada o fator evolutivo determinante para o sucesso da colonização do ambiente de água doce (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). Nesses ambientes, o influxo de água e efluxo de íons e de uréia em excesso também são observados, sendo necessária a reabsorção de íons de forma ativa pelas brânquias e rins. A urina produzida é bastante diluída de forma a secretar o excesso de água que entra no corpo do animal (WOSNICK, 2012).

A especificidade ambiental desses animais os tornam mais suscetíveis a depleção populacional causada pelas pressões extrínsecas, como as ações antrópicas (DULVY et al. 2003, BROOK et al., 2008). Apesar da maioria dos efeitos nos processos de degradação de habitat serem pouco conhecidos para os elasmobrânquios, as implicações no ciclo de vida das espécies com ocorrência em habitats vulneráveis, como as raias estuarinas e de água doce são significativas (MARTIN, 2005; LAST, 2007). Além dos diversos usos de habitat, os elasmobrânquios exibem modos de reprodução complexos (WOURMS, 1977, WOURMS et al., 1988, WOURMS; DEMSKI, 1993) e ocupam a posição trófica de mesopredador nos ambientes que ocorrem (BORNATOWSKY et al., 2014).

As características biológicas e ecológicas deste grupo são fatores que tornam esses animais vulneráveis, principalmente as ações humanas, uma vez que apresentam baixa resiliência populacional (BONFIL, 1994; CAMHI et al., 1998; FRISK; MILLER, 2005). Um dos efeitos diretos é a pesca que interfere na abundância,

nos parâmetros da história de vida, e em casos extremos, podem levar à extinção das espécies (STEVENS et al. 2000) como já ocorreu para uma espécie de raia *Pristis pectinata* (ROSA; LIMA, 2008) no nordeste brasileiro e outras espécies de raias no mundo, *Dasyatis pastinaca* no mar de Wadden, *Dipturus batis* no mar Adriático e Mediterrâneo (DULVY et al., 2003).

2.3. Glândula Retal

A glândula retal é um órgão cilíndrico, suspenso pelo mesentério dorsal em anexo ao intestino na região pós-valvular (PILLANS et al., 2008) (Figura 2a). De acordo com Olson (1999), em animais adultos apresenta três camadas de tecido concêntricas que circundam a luz do lúmen no canal central: uma capsula externa, um parênquima secretório médio e uma margem interna de epitélio transicional.

É um órgão estudado por diversos pesquisadores que o classificaram inicialmente como apêndice digitiforme, bursa cloacal, apêndice cecal e glândula anal (HOSKINS, 1917). Mais recentemente, a combinação de estudos fisiológicos e anatômicos identificaram a microestrutura da glândula retal e sua função no metabolismo de excreção de sal nos elasmobrânquios (OLSON, 1999).

Em 1960, Burger e Hess estabeleceram as funções da glândula retal como sendo um órgão secretor de sal e demonstraram que o fluido secretado era uma solução essencialmente hipertônica de Cloreto de Sódio com concentração duas vezes maior do que a encontrada no plasma sanguíneo. Ainda, Burger (1965) fez uma comparação entre animais que tiveram a glândula retal removida cirurgicamente e animais controle (com glândula retal) e observou que a taxa de secreção de NaCl está relacionada com a quantidade de solução salina que o animal é condicionado, assim quanto maior a quantidade de sal injetado no sistema maior a secreção de cloreto de sódio. Ao final, a resposta secretória parece ser dependente dos componentes osmótico, volumétrico e concentração de NaCl.

Os trabalhos de Burger deram suporte para hipótese de que a secreção de Cl^- ocorre através de transporte ativo secundário e é conduzido pelo gradiente de Na^+ através da membrana baso-lateral da célula, fato que sugere fortemente que o fluxo de Na^+ pela membrana plasmática da glândula retal é mediado pelo $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -co-transportador (NKCC) e não pelo simples processo de difusão (EVELOFF et al.,

1978). Nesse sentido, a enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA) tem participação fundamental realizando sua ativação (PILLANS et al., 2008).

A manifestação enzimática da bomba de Sódio é a NKA. Esta enzima é necessária para uma função celular adequada, uma vez que auxilia a preservar os gradientes iônicos através da membrana celular e, portanto, o potencial de membrana e o equilíbrio osmótico da célula (SKOU; MANN, 1992). Crucial para sobrevivência celular e para a homeostase do organismo, pois o gradiente de Na^+ é utilizado como fonte de energia no transportar íons ou solutos e está na origem da reabsorção vetoral de Na^+ no rim e de potenciais de ação em tecidos excitáveis (SUHAIL, 2010).

O transporte de Na^+ , K^+ e Cl^- para interior das células da glândula retal é movido pelo gradiente eletroquímico de Na^+ criado pela NKA. O potássio também é transportado novamente para o líquido extracelular via canal basolateral de K^+ . O Cl^- é secretado para o lúmen via canal de cloreto localizado na membrana apical das células do epitélio da glândula (Figura 2b). O gradiente eletroquímico negativo gerado pelo excesso de Cl^- no lúmen juntamente com o gradiente positivo criado pelo excesso de K^+ no líquido extracelular, facilita a passagem de Na^+ via parede celular para o lúmen da glândula, formando NaCl que será excretado (WOSNICK, 2012). Neste sentido, a glândula retal apresenta grande importância em ambiente marinho devido à necessidade de secretar íons, porém sua importância diminui em ambientes com baixa concentração iônica devido à necessidade em reabsorver íons e não secretá-los (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

Elasmobrânquios de água doce apresentam redução no tamanho da glândula retal, o que sugere uma redução da funcionalidade desta estrutura nestes ambientes (PIERMARINI; EVANS, 1998). Este autor observou que as glândulas de *Dasyatis sabina* em água doce são 80% menores do que as dos animais de ambiente marinho, sugerindo menor atividade do órgão na água doce. Segundo ele, essa redução auxiliaria a regulação de íons nestes ambientes porque o NaCl precisa ser conservado e não excretado. Em raias obrigatoriamente de água doce da família Potamotrygonidae a glândula retal é considerada vestigial (THORSON et al., 1978).

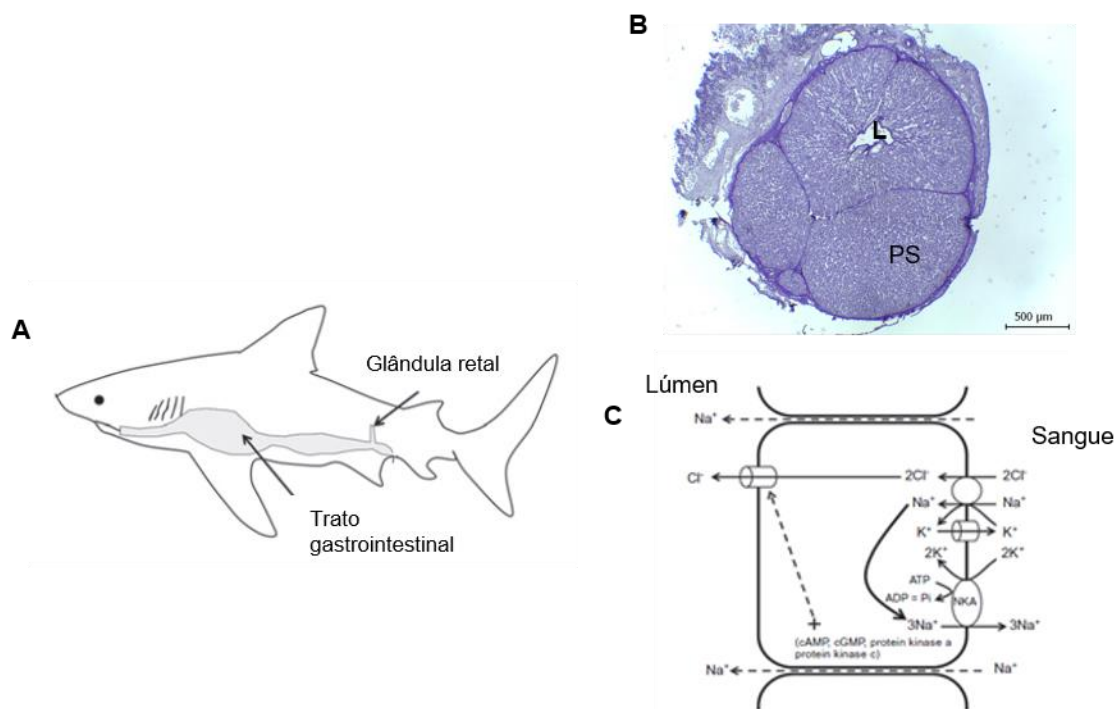


Figura 2: a) Localização da glândula retal na porção terminal do intestino dos elasmobrânquios, desenho esquemático de um tubarão. b) Corte transversal de uma glândula retal mostrando o parênquima secretor, o lúmen e a cápsula. Corado com PAS. C) Diagrama simplificado (Ballantyne; Fraser, 2012) das células ricas em mitocôndrias e os transportadores envolvidos no transporte de NaCl. A bomba Na^+/K^+ -ATPase (NKA) transporta 2K^+ para dentro da célula e 3Na^+ para lúmen. O Na^+ no lúmen ativa o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC), que transporta um Na^+ , um K^+ e dois Cl^- para o interior celular. Canais de cloreto na membrana apical na célula epitelial transportam o Cl^- para o lúmen, e o K^+ transportado (NKCC) para dentro da célula é transportado novamente para lúmen via canais de K^+ . O lado basolateral fica mais positivo pela saída do K^+ e junto com a negatividade do lado apical pela saída do Cl^- geram gradiente elétrico que favorece o transporte de Na^+ viaparacelular, formando assim o NaCl que será excretado pela glândula retal.

2.4. Brânquias

As brânquias são o principal órgão respiratório com a maior interface em contato direto com o ambiente. Nos elasmobrânquios, estão envolvidas com a troca gasosa, equilíbrio ácido-base e retenção de uréia (HUGHES et al., 1986; SHUTTLEWORTH, 1988). O papel das brânquias na regulação iônica ativa é claramente secundária à glândula retal. Takabe et al. (2016) sugere que as células envolvidas com a ionorregulação do tubarão listrado japonês *houndshark Triakis schylium* são provavelmente mais importantes na adaptação a ambientes com baixa salinidade, nesses ambientes a atividade da Na^+/K^+ -ATPase diminui, sendo particularmente

importante no influxo de íons (PIERMARINI; EVANS, 2000; HAMMERSCHLAG, 2006).

Na maioria dos elasmobrânquios são observados cinco arcos brânquiais nos dois lados da cavidade orobrânquial com fileiras em forma de arco ou pilha de filamentos (hemibrânquia) (Figure 3a). A água passa pela cavidade orobrânquial vinda da boca e espiráculos, e através de uma sequência de contrações peristálticas do músculo constritor é forçada a passar através dos filamentos brânquiais, onde a troca gasosa acontece. Cada lado de cada filamento suporta uma fileira de lamelas (figura 3b), as quais tem uma morfologia plana e achatada que proporcionam uma grande área de superfície e distância curta para difusão para eficiência de troca gasosa entre o sangue e a água (WEGNER, 2015). O sangue flui através da lamela na direção oposta à da água criando um mecanismo de contra-corrente. A barreira que separa o sangue da água é formada por três camadas de células epiteliais: as células pavimentosas, revestem a superfície da brânquia; as células indiferenciadas posicionadas logo abaixo; uma membrana basal e as células pilares que formam a camada interna da parede do lúmen sanguíneo (Figura 3c).

No epitélio do filamento brânquial e lamelar, células especializadas chamadas de células ricas em mitocôndria (CRM) (também chamadas células de cloreto devido sua função na excreção desse íon na brânquias de teleósteos marinhos) (figura 3d) e células mucosas são observadas. Em contraste com as células de cloreto em brânquias de teleósteos marinhos, as células ricas em mitocôndrias dos elasmobrânquios carecem de um sistema complexo de membrana basolateral/sistema tubular, cripta apical e células acessórias (PIERMARINI, 2002) que cria uma rota paracelular no efluxo de Na^+ . Em uma espécie de tubarão marinho (*Squalus acanthias*), a atividade branquial da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi menor quando comparada as brânquias de teleósteos e glândula retal de elasmobrânquios (MORGAN et. al, 1997). Isto porque não há necessidade de altas concentrações de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias de elasmobrânquios marinhos porque a excreção de sal é feita pela glândula retal (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010). Quando ocorre a diminuição ou extinção da função de excreção pela glândula retal, as brânquias tendem a assumir o papel secretor (PIERMARINI; EVANS, 2000; EVANS et. al., 2005).

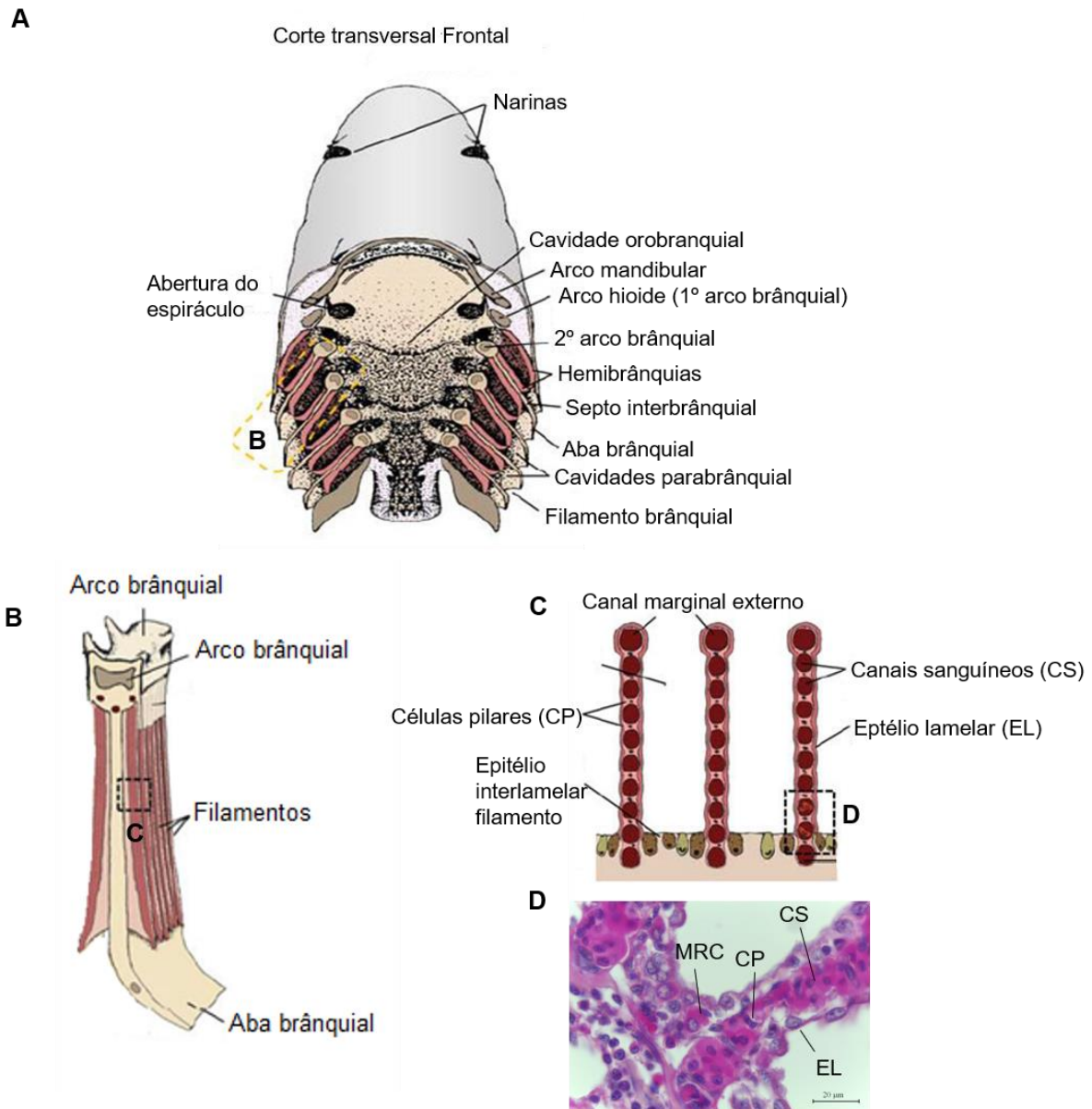


Figura 3: Esquema geral da morfologia das brânquias de elasmobrânquios. A) Visão ventral de corte frontal da região branquial, mostrando as cavidades branquiais e brânquias. B) Aumento de um corte de uma holobrânquia da região pontilhada amarela (A) mostrando a posição do arco brânquial, filamentos e lamelas. C) Ampliação da caixa pontilhada preta (B) de corte através três filamentos mostrando a configuração lamelar: epitélio lamelar, células pilares, canais sanguíneos e epitélio interlamelar do filamento visto em corte transversal (D) em detalhe. D) Composição do epitélio do filamento brânquial: célula ricas em mitocôndria (MRC) na região interlamelar; célula pilar (CP), canal sanguíneo (CS) e epitélio lamelar (EL). Desenhos esquemáticos adaptados de Wegner (2015). Fotomicrografia corada com hematoxilina e eosina (autoral).

Quanto ao mecanismo de regulação ácido-base em brânquias de elasmobrânquios, ele está ligado à regulação iônica, pois a absorção de Cl^- pode estar acoplada à liberação de HCO_3^- via trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, e a absorção de Na^+ pode estar acoplada à liberação de H^+ pelo trocador Na^+/H^+ (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

Duncan et al. (2009) em estudo com *Potamotrygon aiereba* realizado no rio Amazonas (águas claras) e rio Negro (água negra) observou que a atividade da enzima Na^+ / K^+ -ATPase nas brânquias e rim foi significativamente menor em águas claras do que em águas negras. Segundo Wood et al. (2002), essa é uma importante adaptação da espécie na retenção de íons em águas (negras) que são pobres em íons. A caracterização físico-química das diferentes composições da água na Bacia Amazônica pode atuar como uma barreira hídrica (ou filtro hidrológico) para dispersão das raias Potamotrygonidae (DUNCAN; FERNANDES, 2010).

2.5. Rins

Os rins dos elasmobrânquios são órgãos pareados que flanqueiam a aorta dorsal, apresentam formatos de semilunar a alongado, com lobações bem marcadas, especialmente na superfície ventral. Cada lobo consiste em pequenos lóbulos, os quais apresentam duas regiões distintas: a porção dorsal do parenquima, mais delgada com túbulos empacotados e reduzida vascularização, chamada de zona empacotada (*bundle zone*) (Figura 4); a outra na porção ventral, mais grossa na qual os túbulos estão agregados uns aos outros por espaços vasculares amplos similares a lacunas, chamada de zona sinusal (*sinus zone*) (Figura 4). Nos animais de água doce também apresentam duas zonas, mas devido a reduzida capacidade em reabsorver uréia, seus túbulos são mais curtos e distribuem-se na zona simples e zona complexa localizadas na na porção periférica e central do órgão, repectivamente. Os corpusculos renais geralmente separam zona empacotada da zona sinusal na maioria dos elasmobrânquios marinhos e eurialinos (LACY; REALE, 1999).

A configuração dos túbulos renais em espécies marinhas e eurialinas é extremamente complexa e mais organizada do que o observado para maioria dos vertebrados (LACY; REALE, 1999). Resulta em um sistema de *loop* duplo, dois na zona empacotada e dois na zona sinusal com a porção caudal (segmento distal) do último *loop* passando pela zona empacotada (juntamente com os dois primeiros *loops*) (Figura 4a). A descrição a seguir segue o estabelecido por Lacy e Reale (1985) para raia (*little skate*) *Leucoraja erinacea* e o tubarão galhudo *Squalus acanthias*. O

início do primeiro *loop* surge da cápsula de Bowman e o final do último *loop* penetram a bainha peritubular na zona empacotada onde o néfron altera a morfologia do ducto distal, que então segue em direção à superfície dorsal do rim para se juntar aos ductos coletores (Figura 4b). Assim, na zona empacotada há uma restrita segregação de segmentos de néfrons de cada glomérulo enquanto a zona sinusal ocorre a mistura indiscriminada de túbulos de um número de néfrons.

O néfron é dividido na sequência de segmentos a partir da cápsula de Bowman: (1) neck, (2) proximal, (3) intermediário e (4) distal. O primeiro segmento está localizado entre a capsula de Bowman e o túbulo proximal, está presente apenas na zona empacotada e é o mais curto dos segmentos (Figura 4c). É dividido em duas porções, cracterizadas por células epiteliais cúbicas ciliadas. O segundo segmento se estende da zona empacotada à zona sinusal, seu epitélio varia de cúbico a prismático com microvilos facilmente identificados que fomam a borda em escova (Figura 4c). O terceiro segmento, é o maior e se estende da última porção ascendente do segundo *loop* e termina na porção ascendente do último *loop* onde passa entre as arteríolas aferente e eferente para se tornar a porção inicial do túbulo distal (Figura 4c). O epitélio varia de prismático a cúbico com abundância de granulos e alguns ou nenhum microvilos. O último segmento termina na zona empacotada onde junta ao ducto coletor, apresenta células epiteliais de cúbicas a pavimentosa sem microvilosidade (Figura 4c).

Os elasmobrânquios compartilham com a maioria dos demais vertebrados rins com glomérulos que produzem um ultra-filtrado oriundo do sangue arterial na primeira etapa da formação da urina (DANTZLER, 1989; LACY; REALE, 2018). O sistema contracorrente observado nesses animais produz uma urina menos concentrada, pois esse animais alcaçam homeostase mantendo altas concentrações de uréia no plasma e tecidos, elevando assim a osmolaridade do meio interno a concentrações próximas a da água do mar. Apenas uma fração do uréia plasmática é excretada e esse sistema de contracorrente renal provavelmente facilita o processo de reabsorção (SMITH, 1936; LACY et al., 1985; LACY; REALE, 1987). Os túbulos renais são capazes de reabsorver cerca de 70- 99% de toda a uréia filtrada (BOYLAN, 1967; HAMMERSCHLAG, 2006). Além dessa função, os rins atuam na regulação plasmática de Na^+ e Cl^- , excreção de Mg^{2+} , PO_4^{2-} e SO_4^{2-} , assim como amonia e retenção de metilaminas (BALLANTYNE; FRASER, 2012).

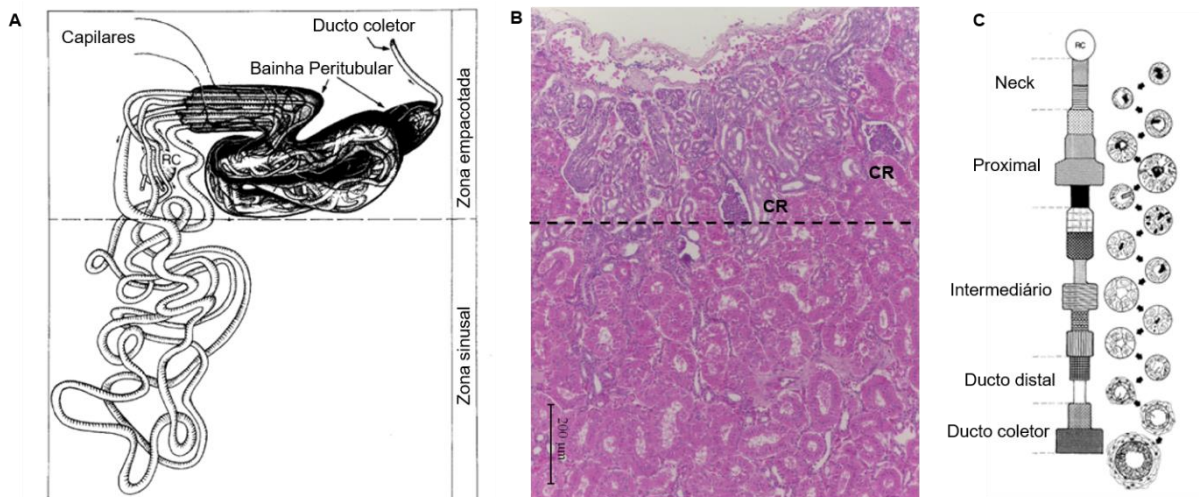


Figura 4: Configuração de rim de eslamobânquio separado pelas zona empacotada e sinusal e composição celular dos segmentos tubulares. A) Desenho baseado na sequência simplificada do néfron indicando o corpúsculo renal (RC), bainha peritubular e ducto coletor. B) Corte transversal de rim de raia mostrando a zona empacotada mais estreita (mais escura) e a zona sinusal (mais clara) ocupando maior parte do parênquima renal. Os corpúsculos renais são observados na região mais dorsal do rim delimitando o zoneamento dos túbulos renais. C) Composição do epitélio renal em cada segmento do néfron a partir do corpúsculo renal até o ducto coletor. Desenhos (A, C) adaptados de Lacy e Reale (1985). Fotomicrografia corada com hematoxilina e eosina (autoral).

O processo de reabsorção iônica pelos rins se dá a partir da ativação de co-transportadores NKCC (isoforma absorptiva) localizados na região apical das células de cloreto. A ativação permite a captação dos íons Cl^- do meio, o gradiente negativo criado pelo Cl^- no lúmen ativa canais de cloreto na membrana basolateral responsáveis pela reabsorção de Cl^- . O gradiente também irá ativar a reabsorção de Na^+ via parede celular. Quando elasmobrânquios são aclimatados em ambientes diluídos, o fluxo urinário aumenta de vinte a cinquenta vezes (EVANS et al., 2004), a absorção ativa de íons mono e divalentes tornam-se necessária devido à perda de osmólitos para o meio (SMITH, 1931; HAZON et al., 2003; WOSNICK, 2012). Em animais eurihalinos a reabsorção de uréia ainda é necessária, porém em raias exclusivamente dulcícolas, tal composto passa a ser secretado de forma a manter os valores basais característicos ($<1\text{mM}$) (BALLANTYNE; ROBINSON, 2010).

2.6. Caracterização das espécies

As raias da ordem Myliobatiformes (*stingrays* e raias pelágicas) é a segunda mais especiosa no dos batoides. São encontradas do ambiente marinho à água doce em regiões tropicais e temperadas, aproximadamente 160 espécies são conhecidas (COMPAGNO, 1999). Todas as raias apresentam corpo comprimido dorso-ventralmente, suas nadadeiras peitorais são unidas aos dois lados da cabeça e tronco e estendem-se posteriormente à origem da barbatana (DUNN et al., 2003). Alimentam-se comumente de vermes, moluscos, crustáceos e peixes pequenos (BIGELOW; SCHROEDER 1953). São ecologicamente especializadas e tem habitats preferenciais, como a raia *Hypanus guttatus* que transita entre os ambientes marinho e estuarino e a a raia *Hypanus marianae* em ambientes costeiros marinhos próximos aos recifes de coral, enquanto a raia *Aetobatus narinari* é costeira e semi-pelágica, associada ao ecossistema do recife de coral (KYNE et al., 2006; ROSA; FURTADO, 2016).

Segundo a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) das espécies ameaçadas, as raias *Hypanus guttatus* (Figura 5) e *Hypanus marianae* (Figura 6) apresentam aspectos sobre o status populacional assim como biológicos insuficientes (*data deficient*) (ROSA; FURTADO, 2016). Enquanto a *A. narinari* (figura 7) está próxima da ameaça (*near threatened*). A maior ameaça para maior parte dessas raias é a pesca, tendo em vista que são animais frequentes nas pesca artesanal como *bycatch* no Brasil, Colômbia e Venezuela (KYNE et al., 2006; TAGLIAFICO et al., 2013; MELO, 2016).

De extrema importância para diversos animais, os habitats costeiros são essenciais como zonas de berçário, alimentação e crescimento. A relação do gênero *Hypanus* com esses locais é relatada por Yokota e Lessa (2006) no Rio Grande do Norte, áreas que sofrem intensa influência do aporte fluvial, assim como do regime de marés. A raia *H. guttatus* tem uma íntima relação com áreas marinhas e estuarinas e parece manter uma dependência desses ambientes em diferentes estágios do seu desenvolvimento (MELO, 2016), visto que maior parte de seu ciclo de vida é no estuário, mas a forma jovem está no mar. Dados de marcação e recaptura da raia *Aetobatus narinari* indicam que essa espécie apresenta fidelidade multianual numa mesma localidade com padrões de movimentação de curta e longa distância e

tendências sazonas de abundância (BASSOS-HULL et al., 2014; AJEMIAN; POWERS, 2014; SELLAS et al., 2015).

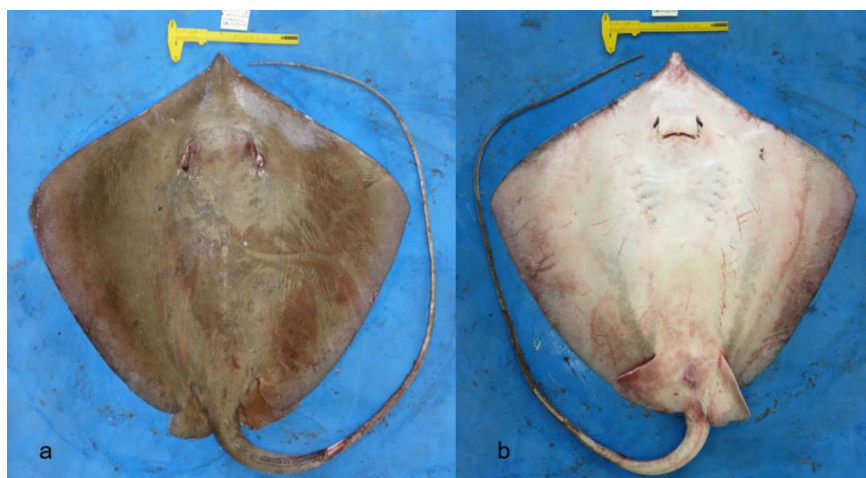


Figura 5: Exemplar de *Hypanus guttatus* vista dorsal (a) e ventral (b).

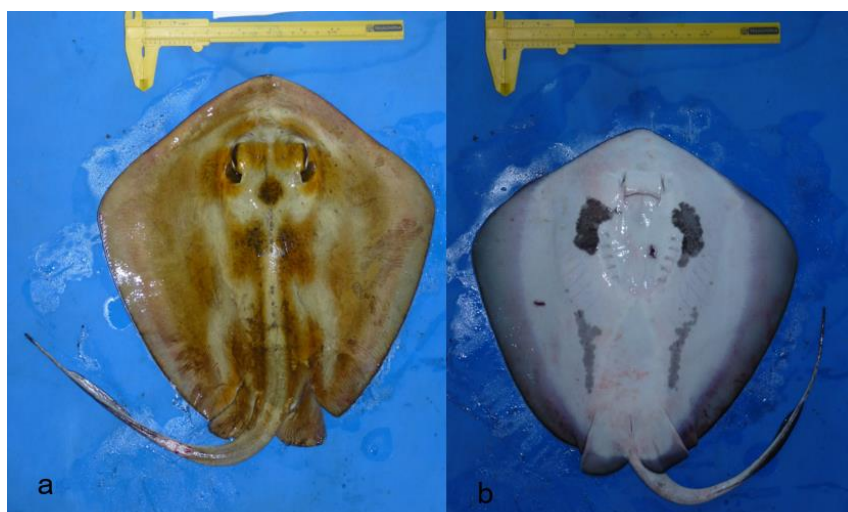


Figura 6: Exemplar de *Hypanus marianae* vista dorsal (a) e ventral (b).

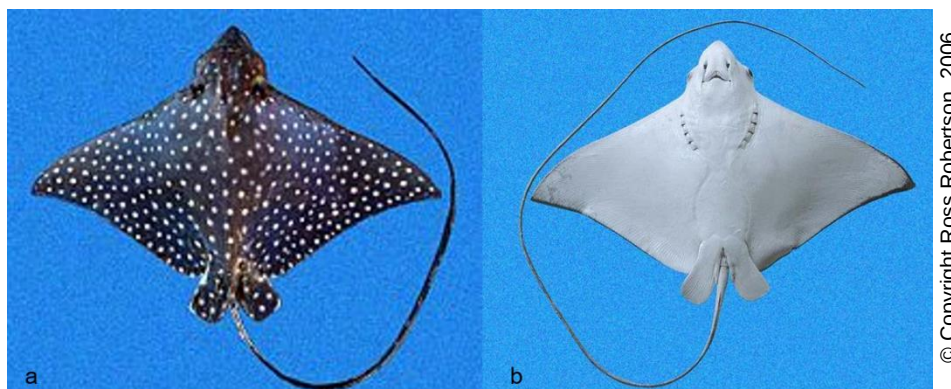


Figura 7. Exemplar de *Aetobatus narinari* vista dorsal (a) e ventral (b).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar as estratégias osmorregulatórias, variações morfofisiológicas das brânquias, glândula retal e rim de três espécies das raias *Hypanus guttatus*, *Hypanus marianae* e *Aetobatus narinari*.

3.2. Específicos

- Analisar e descrever morfológicamente as brânquias, glândula retal e rim das raias em diferentes ambientes (estuarino e marinho);
- Quantificar a variação dos componentes destes órgãos nos diferentes ambientes;
- Determinar a influência do ambiente sob as alterações morfológicas das espécies.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de coleta e animais

Os exemplares foram coletados no litoral norte do estado de Pernambuco, oriundos da pesca artesanal. Os exemplares foram coletados em ambiente estuarino na região do Canal de Santa Cruz – Itapissuma e na região costeira marinha de Itamaracá e Ponta de Pedras. Apenas *Hypanus guttatus* foi coletada na região estuarina. De todos os indivíduos foram registradas as larguras do disco (cm), comprimento e largura da glândula retal (cm) foram registrados. As coletas foram realizadas em todas as estações do ano, dados abióticos (salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido) foram mensurados no período seco (Setembro a fevereiro) e chuvoso (Março a Agosto).

4.2. Processamento das amostras

Imediatamente após desembarque, as brânquias (terceiro arco branquial), glândula retal e rins foram coletados. Os órgãos foram preservados em solução de formaldeído a 10% com água do mar. Foram feitas secções transversais dos órgãos estudados (5-10 mm) de acordo com suas estruturas e em seguida o material clivado foi analisado em Microscopia de Luz (microscópio óptico trinocular DM500 Leica®, ML), microscopia de transmissão (MT) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras clivadas dos órgãos foram fixadas e processadas de acordo com a metodologia descrita a seguir.

4.3. Microscopia de luz e microscopia de varredura

O exame histológico de rotina foi utilizado para caracterizar a estrutura geral dos componentes celulares dos órgãos estudados para a glândula retal: cápsula (Ca), camada muscular (CM), parênquima secretório (PS), e epitélio de transição/ducto cetral (ET); brânquias: células pilares (CPi), células pavimentosas (CPV), células ricas em mitocôndria (CRM), seio venoso central (SVC), filamento (F) e lamela (L); rins: segmentos proximal I e II (SPI e SPII), 'Neck' (N), segmento distal (SD), glomérulo (G), paredes capilares (CP), lúmen capilar (LC).

Em ML os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70-100%), diafanizados em álcool butílico e incluídos em paraplast (BEHMER et al., 1976; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983; BANCROFT; STEVENS; TURNER, 1996). Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo rotativo (RM2125RT da Leica®) em series de 5 µm, montados em laminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori, Tricrômico de Masson e Ácido Periódico de Schiff (PAS). A análise da estrutura geral dos componentes teciduais dos órgãos foram visualizadas e fotografados utilizando câmera HD acoplada e programa de imagem SigmaScan Pro 5.0.

As amostras analisadas em MEV (TESCAN VEGA 3) foram fixadas em formoldeído 10%, lavados em água destilada, desidratadas em solução crescente de

etanol (70%-90%) e três banhos de 100% por 10 minutos cada. Depois disso, o material foi seco com hexamethyldisilazane (HMDS) por 3 min em 100% de HMDS e transferidas para um dissecador por 25 min. Após secagem, foram coladas em suporte de alumínio revestido de ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura. As imagens digitais foram usadas para analisar a superfície celular branquial, especificamente as células ricas em mitocôndria/células de cloreto.

4.4. Morfometria

Para análise histomorfométrica da glândula retal e rim (lúmen e túbulos), e brânquias (filamentos branquiais) o protocolo modificado estabelecido por Pillans et al. (2008) e Matey et al. (2009) para glândula retal; Duncan e colaboradores (2011) para brânquias e Lacy; Reale (1991) para rins.

4.5. Análise estatística

Todos os dados são apresentados com suas respectivas médias e desvio padrão (média $\pm$ d.p.). A normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias (ANOVA) foram verificadas para dados com distribuição normal. Para ANOVA on-way, a média dos valores foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0.05$. Para dados não normais, o teste Kruskal-Wallis foi utilizado. Todas as análises foram realizadas com o software RStudio.

5. REFERÊNCIAS

- AJEMIAN, M.J.; POWERS, S.P. Towed-float satellite telemetry tracks largescale movement and habitat connectivity of myliobatid stingrays. **Environmental Biology of Fishes**, v. 97, n. 9, p. 1067–1081, 2014.
- BALLANTYNE, J.S.; FRASER, D.I. Euryhaline elasmobranchs. In: S. D. McCormick, A. P. Farrell and C. J. Brauner (eds.) **Fish Physiology**, v. 32, pp. 1–44. New York: Elsevier. p. 125-198, 2012.
- BALLANTYNE, J.S.; ROBINSON, J.W. Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry. **Journal of Comparative Biology**, v.180, n. 4, p.475-493, 2010.
- BANCROFT, J.; STEVENS, A.; TURNER, D. Theory and practice of histological techniques. 4th Ed Churchill Living Stone. New York Edinburgh. Madrid, Sanfrancisco, 766 pp., 1996.
- BASSOS-HULL, K.; WILKINSON, K.A.; HULL, P.; DOUGHERTY, D.A.; OMORI, K.L.; AILLOUD, L.E.; MORRIS, J.; HUETER, R.E. Life history and seasonal occurrence of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*, in the eastern Gulf of Mexico. **Environmental Biology of Fishes**. v.97, n.9, p.1039–1056, 2014.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C., FREITAS-NETO. A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológicas**. EDART/EDUSP, São Paulo. 256 pp., 1976.
- BIGELOW; SCHROEDER. **Fishes of the Western North Atlantic**. Sawfishes, Guitarfishes, Skates and Rays. Memoirs Sears Foundation for Marine Research, New Haven.588 pp., 1953.
- BLOOM, D.D.; LOVEJOY, N.R. Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). **Journal of Evolutionary Biology**, v.25, n.4, p. 701–715, 2012.

BONFIL, R. **Overview of world elasmobranch fisheries**. Food & Agriculture Org., Rome, Italy, 119 pp., 1994.

BORNATOWSKI, H.; NAVIA, A.F.; BRAGA, R.R.; ABILHOA; CORRÊA, M.F.M. Ecological importance of sharks and rays in a structural food web analysis in southern Brazil. **ICES Journal of Marine Science**, v. 71, n. 7, p. 1586-1592, 2014.

BOYLAN, J.W.; FELDMAN, B.; ANTOWIAK, D. Gills permeability in *Squalus acanthias*. In: P.W. Gilbert, R.F Mathewson and D.P. Rall (eds.). **Shark, skates, and rays**, pp. 197-206. Baltimore: Johns Hopkins Press.

BROOK, B. W.; SODHI, N.S.; BRADSHAW, C.J.A. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 8, p. 453-460, 2008.

BURGER, J.W.; HESS, W.N. Function of the rectal gland in the spiny dogfish. **Science NY**, v.131, n. 3401, p.670–671, 1960.

BULGER, R.E. Electron microscopy of the stratified epithelium lining the excretory canal of the dogfish rectal gland. **The Anatomical Record**, v.151, n.4, p. 589-608, 1965.

CAMHI, M.; FOWLER, S.; MUSICK, J.; BRÄUTIGAM, A.; FORDHAN, F.S. **Sharks and their relatives**. Occasional Papers of the IUCN Species Survival Commission, n. 20, p. 1-39, 1998.

COATES, D. Fish ecology and management of the Sepik- Ramu, New Guinea, a large contemporary tropical river basin. **Environmental Biology of Fishes**, v. 38, n.4, p. 345–368, 1993.

COMPAGNO, L.J.V. **Shark exploitation and conservation**. In: Pratt H.L., Gruber S.H., Taniuchi T. (eds), Elasmobranchs as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries, Technical report NMFS 90,

National Oceanic and Atmospheric Administration Washington, DC, 391–414 pp, 1990.

COMPAGNO, L.J.V. **Systematic and body form**. In: Hamlett, W.C. (eds). *Sharks, Skates, and Rays: The biology of Elasmobranch fishes*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. 1999.

DANTZLER, W.H. **Comparative physiology of the vertebrate kidney**. Berlin: Springer, 1989.

DULVY, N.K.; SADOVY, Y.; REYNOLDS, J.D. Extinction vulnerability in marine populations. **Fish and fisheries**, v. 4, n. 1, p. 25-64, 2003.

DUNN, K.A.; MCEACHRAN, J.D.; HONEYCUTT, R.L. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, n.2, p. 259-270, 2003.

DUNCAN, W.P.; FERNANDES, M.N. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 3, p. 454-464, 2010.

DUNCAN, W.P.; SILVA, N.F.; FERNANDES, M.N. Mitochondrion-rich cells distribution, Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill morphometry of the Amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 523-531, 2011.

EDWARDS, S.L.; MARSHALL, W.S. **Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes**. In: S.D. McCormick; A.P. Farrell and C.J. Brauner (eds.), *Fish Physiology*, Vol. 32, Euryhaline Fishes pp. 1–44. New York: Elsevier, 2013.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. **Homeostasis: osmoregulation, pH regulation, and nitrogen excretion.** In: Carrier, J.C.; Musick, J.A.; Heithaus, M.R., *Biology of Sharks and their Relatives*. Crc Press, p. 254-275, 2004.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M., CHOE K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n.1, p. 97–177, 2005.

EVANS, D.H. **Osmoregulation in fishes.** In: A.P. Farrel; J.J. Cech Jr.; J.G. Richards and E.D. Stevens (eds). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment.*, Academic Press Elsevier, pp. 1348-1353, 2011.

EVELOFF, J., KINNE, R., KINNE-SAFFRAN, E., MURER, H., SILVA, P., EPSTEIN, F. H., et al. Coupled sodium and chloride transport into plasma membrane vesicles prepared from dogfish rectal gland. **Pflügers Archiv**, v.378, n.2, p. 87-92, 1978.

FRISK, M.G.; MILLER, T.J. Life histories and vulnerability to exploitation of elasmobranchs: Inferences from elasticity, perturbation and phylogenetic analyses. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 35, p. 27–45, 2005.

HAMMERSCHLAG, N. Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 209-228, 2006.

HAZON, N.; WELLS, A.; PILLANS, R.D.; GOOD, J.P.; ANDERSON, W.G. & FRANLIN, C.E. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 4, p. 685-700, 2003.

HELFMAN, G.S.; COLLETTE, B.B.; FACEY, D.E. **The diversity of Fishes** Blackwell, Malden. EE. UU. 1997.

HOSKINS, E. R. On the development of the digitiform gland and the post-valvular segment of the intestine in *Squalus acanthias*. **Journal of Morphology**, v. 28, n. 2, p. 329-367, 1917.

HUGHES, G.M.; PERRY, S.F.; PIIPER, J. Morphometry of the gills of the elasmobranch *Scyliorhinus stellaris* in relation to body size. **Journal of Experimental Biology**, v. 121, n. 1, p. 27-42, 1986.

JENSEN, N.H. 1976. **Reproduction of the bull shark, *Carcharhinus leucas*, in the Lake Nicaragua-Rio San Juan system**. In: T.B. Thorson (ed.), Investigation of the ichthyofauna of Nicaraguan lakes, pp. 539-559. Lincoln: University of Nebraska, 1976.

JOHNSON, M.R.; SNELSON, F.F. Reproductive life history of the Atlantic stingray *Dasyatis sabina* (Pisces, Dasyatidae), in the freshwater St. Johns River, Florida. **Bulletin of Marine Science**, v.59, n.1. p. 74–88, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Santos Editora. Santos, v. 123, 1983.

KIRCHHOFF, K.N.; HAUFFE, T.; STELBRINK, B.; ALBRECHT, C.; WILKE, T. Evolutionary bottlenecks in brackish water habitats drive the colonization of fresh water by stingrays. **Journal of Evolutionary Biology**, v.30, n. 8, p. 1576-1591, 2017.

KYNE, P.M., ISHIHARA, H, DUDLEY, S.F.J.; WHITE, W.T. 2006. *Aetobatus narinari*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006: e.T39415A10231645. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T39415A10231645.en>. Downloaded on 27 January 2020.

LACY, E.R.; E. REALE. The elasmobranch kidney. 11. Sequence and structure of the nephrons. **Anatotomy and Embryology**, v. 173, n. 2, p. 163- 186, 1985.

LACY, E.R.; CASTELLUCCI, M.; REALE E. The elasmobranch renal corpuscle: fine structure of Bowman's capsule and the glomerular capillary wall. **The Anatomical Record**, v. 218, n. 3, p. 294-305, 1987.

LACY, E.R.; REALE, E. The fine structure of the elasmobranch renal tubule: Intermediate, distal, and collecting duct segments of the little skate. **American journal of anatomy**, v. 192, n. 4, p. 478-497, 1991.

LACY, E.R.; REALE, E. **Urinary system**. In: Hamlet W.C. (ed), Sharks skates and rays: biology of elasmobranch fishes. Baltimore, Maryland, pp 353–397, 1999.

LACY, E.R.; REALE, E. A unique juxtaglomerular apparatus in the river ray, *Potamotrygon humerosa*, a freshwater stingray. **Zoomorphology**, v. 137, n. 1, p. 155-164, 2018.

LAST, P.R. The state of chondrichthyan taxonomy and systematics. **Marine and Freshwater Research**, v. 58, n. 1, p. 7–9, 2007.

LUCIFORA, L.O.; CARVALHO, M.R.; KYNE, P.M.; WHITE, W.T. **Freshwater sharks and rays**. *Current Biology*, v. 25, n. 20, p. R971-R973, 2015.

LUCIFORA, L.O.; BALBONI, L.; SCARABOTTI, P.A.; ALONSO, F.A.; SABADIN, D.E.; SOLARI, A.; et al. Decline or stability of obligate freshwater elasmobranchs following high fishing pressure. **Biological conservation**, v. 210, p. 293-298, 2017.

MARTIN, R.A. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs. **Journal of the Marine Biology Association United Kingdom**, v. 85, n. 5, p. 1049–1073, 2005.

MATEY,V.; WOOD, C.M.; DOWD, W.W.; KULTZ, D.; WALSH, P.J. Morphology of the rectal gland of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) shark in response to feeding. **Can J Zool**, v. 87, p. 440-452, 2009.

MELO, A.C.M. Biologia e pesca da raia *Dasyatis guttata* (Block & Schneider, 1801) (Elasmobranchii: Dasyatidae) na plataforma continental de Pernambuco, Brasil. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco 96f.

MORGAN, J.D.; WILSON, J.M.; IWAMA, G.K. Oxygen consumption and Na⁺-K⁺-ATPase activity of rectal gland and gill tissue in the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. Canadian Journal of Zoology, v. 75, n. 5, p. 820-825, 1997.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V.H. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

OLSON, K.R. **Rectal gland and volume homeostasis**. In W.C. Hamlett (ed.), Sharks, skates, and rays. Johns Hopkins University Press, Blatimore, Md., pp. 339-352, 1999.

PIERMARINI, P.M.; EVANS, D.H. Effects of environmental salinity on Na⁺/K⁺-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 19, p. 2957–2966, 2000.

PIERMARINI, P.M.P. Extra-Renal Mechanisms of Osmotic and Acid/Base Regulation in a Euryhaline Elasmobranch (*Dasyatis sabina*). 2002. (Tese de doutorado), University of Florida, Florida, 159p.

PILLANS, R.D.; GOOD, J.P.; ANDERSON, W. G.; HAZON, N.; FLANFLIN, C.E. Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. **Journal of Fish Biology**, v.72, n. 7, p. 1559-1571, 2008.

ROSA, R.; FURTADO, M. 2016. *Hypanus marianae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016:e.T45925A104128768. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T45925A104128768.en>. Downloaded on 23 September 2019.

ROSA, R. S.; LIMA, Flávio CT. **Os peixes brasileiros ameaçados de extinção**. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, v. 2, p. pp278, 2008.

SELLAS, A.B.; BASSOS-HULL, K.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.C.; ANGULO-VALDÉS; et al. Population structure and seasonal migration of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 3, p. 266-275, 2015.

SHUTTLEWORTH, T.J. **Salt and water balance - extrarenal mechanisms**. In: Physiology of Elasmobranch Fishes, pp. 171–199, 1988.

SKOU, J.C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics Biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 249-261, 1992.

SMITH, H.W. The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes I. Freshwater elasmobranchs. **American Journal of Physiology**, v. 98, n. 2, p. 296–310, 1931.

SMITH, H.W. The retention and physiological role of urea in the elasmobranchii. **Biological Reviews**, v. 11, n. 1, p. 49-82, 1936.

STEVENS, J.D.; BONFIL, R.; DULVY, N.K.; WALKER, P.A. The effects of fishing on sharks, rays and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. **ICES Journal of Marine Science**, v. 57, n. 3, p. 476-494, 2000.

SUHAIL, M. Na⁺, K⁺-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 2, n. 1, p. 1, 2010.

TAGLIAFICO, A.; RAGO, N.; RANGEL. M.S. Aspectos biológicos de las rayas *Dasyatis guttata* y *Dasyatis americana* (Myliobatiformes: Dasyatidae) capturadas por la pesquería artesanal de la Isla de Margarita, Venezuela. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 48, n. 2, p. 365-373, 2013.

TAKABE, S.; YAMAGUCHI, M.; HYODO, S. Distribution and dynamics of branchial ionocytes in houndshark reared in full-strength and diluted seawater

environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 198, p. 22-32, 2016.

THORSON, T.B. Partitioning of body fluids in the Lake Nicaragua shark and three marine sharks. **Science**, v. 138, 3541, p. 688–690, 1962.

THORSON, T.B.; WOOTON, R.M.; GEORGI, T.A. Rectal gland of freshwater stingrays *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **The Biological Bulletin**, v. 154, n. 3, p. 508-516, 1978.

THORSON T.B.; BROOKS, D.R. The evolution of freshwater adaptation in stingrays. **Nat Geog Soc Res Rep**, v. 15, p. 663–694, 1983.

WEGNER, NICHOLAS C. **Elasmobranch gill structure**. In: Fish Physiology. Academic Press, p. 101-151. 2015.

WILSON A.B.; TEUGELS, G.G.; MEYER, A. Marine incursion: the freshwater herring of Lake Tanganyika are the product of a marine invasion into West Africa. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.

YAMANOUE, Y.; MIYA, M.; DOI, H.; MABUCHI, K.; SAKAI, H.; NISHIDA, M. Multiple invasions into freshwater bupufferfishes (Teleostei: Tetraodontidae): a mitogenomic perspective. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y.O.; GONZALEZ, R.J.; WILSON, R.W.; PATRICK M.L. & VAL, A.L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n: 19, p. 3039–3054, 2002.

WOSNICK, N. Eurialinidade em *Zapterix brevirostris* (raia-viola-de-fucinho-curto) Espécie Ameaçada de Elasmobrânquio da Costa Sul-Americana. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba 57p.

WOURMS, J.P. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. **American Zoologist**, v. 17, n. 2, p. 379-410, 1977.

YOKOTA, L.; LESSA, R.P. Nursery area for sharks and rays in northeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v.75, n. 3, p. 349–360, 2006.

CAPITULO II: Artigo I

Artigo a ser submetido ao *Journal of Fish Biology*

EcoMorphology of Rectal Gland of three species of Myliobatiformes

Andressa Melo¹ | Cláudio Andrade² | Mariana Rêgo² | Joaquim Evêncio Neto^{1,2} | Maria Lúcia Góes de Araújo¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence: Andressa Melo, Laboratório de Histologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

E-mail: andressa_cmm@hotmail.com

Funding information

A.C.M.M. received a PhD grant from FACEPE (IBPG-1696-5.05/15) and PDSE-CAPES (88881.190640/2018-01). A.C.B. received a scholarship from PIBIC/CNPq (139336/2017-6). R.M.G. received a post-doctoral fellowship from CAPES.

Abstract

The rectal gland ecomorphology was analyzed in three different stingrays from pelagic and benthic habitat. Forty-nine mature stingrays of both sexes from *Hypanus marianae* (n= 19), *Hypanus guttatus* (n= 10), and *Aetobatus narinari* (n= 20) captured in the marine coastal area of Pernambuco state Brazil were sampled. The lobulated gland showed two distinct forms: small compact S-shaped for *H. marianae* and long S-shaped for *H. guttatus*, and pod shaped for *A. narinari*. Rectal gland length (RGL) was higher in *A. narinari*, but length expressed as percentual represents only 2.5% of disc, while in *H. guttatus* and *H. marianae* were 3.9% and 4.1%, respectively. The dense connective tissue in the capsule was three times thicker in *A. narinari* than in *Hypanus* genus (K-W; df = 2, p = 0.014). The secretory parenchyma structure in *H. marianae* was simpler, differing from other species that showed a well-defined lobulation arranged around the central duct. The diameter of secretory tubules did not vary among species, however *H. marianae* presented lower values. The central duct of *A. narinari* and *H. guttatus* exhibited branches that invaginate into the lobes and originate the lobular ducts, while in *H. marianae* the central duct does not have branches and secrete tubule open direct into central lumen. Also, the central duct of *A. narinari* showed higher number of cells and thickness differed significantly to the other stingrays analyzed (ANOVA; F = 6.90, p = 0.01). We suggest that the morphological differences observed here could be related with different habitat lifestyle of the stingray species, which means for stingrays in higher salinities the rectal gland acts more actively than in stingrays habiting coastal areas where the function is reduced.

Keywords: salt gland, salinity, environment, comparison, histology

Introduction

Mostly 1139 spp. of known elasmobranch occur in marine environments. Only 5% of all species live in low salinities habitats (Weigmann 2016; Lucifora et al. 2017). The species-specific differences in the osmoregulation capacity in the environment with a wide range of salinity influence species distribution and their ecological niche (Anderson et al. 2006). For this reason, just a few of elasmobranchs species are truly euryhaline (Grant et al. 2019).

The elasmobranch's ability to move between marine and freshwater habitats for extended periods, primarily depend on organic nitrogenous compound concentration in the body fluid such as urea and trimethylamine oxide (TMAO) (Gelsleichter 2004). Besides that, sharks and rays eliminate the excess of Na^+ and Cl^- by the rectal glands to maintain ionic homeostasis. Therefore, the rectal gland is a critical organ for ion balance in marine and euryhaline species (Evans and Lambert 2015). The gland secretes into the cloaca a plasma-hypertonic solution, with a salt concentration approximately double that in the plasma (Burger and Hess 1960; Silva et al. 1977; Ernst et al. 1981).

The rectal gland is a tubular organ, suspended in the dorsal mesentery above the intestine and attached in the postvalvular region (Crofts 1925; Chan and Phillips 1967). It is a highly vascularized organ, in which the main structure is a system of simple and branched tubules that drain into a central duct a NaCl -rich fluid (Doyle 1962; Ernst et al. 1981; Shuttleworth 1988; Newbound and O'Shea 2001). Studies of elasmobranch rectal gland morphology had focus on the gland structure of NaCl secretion (Doyle 1962; Bulger 1963; Fänge and Fugelli 1963; Bulger 1965; Chan and Phillips 1967; Van Lennep 1968; Ernest et al. 1981; Newbound and O'Shea 2001) on habitat use (Oguri 1964; Gerzeli et al. 1976; Thorson et al. 1978) and phylogeny (Crofts 1925; Larsen et al. 2019). In all these studies the number of batoid species analyzed is reduced when compared with shark species.

Within the batoids, the order Myliobatiformes are a highly diverse group, with species stenohaline marine, stenohaline freshwater, and euryhaline. The vast majority of euryhaline batoids belongs to this order (Ballantyne and Fraser 2012). Despite that, the knowledge of stingrays rectal gland is limited to how environmental salinity influence the rectal gland of the euryhaline stingray *Hypanus sabinus* (Lesueur 1824) (Piermarini and Evans 2000; Evans and Lambert 2015), and some histological and cyto/histochemistry reports about rectal gland of *Urolophus jamaicensis* (Cuvier 1817) (Doyle 1962); *Bathytoshia centroura* (Mitchill 1815), *Myliobatis freminvillei* (Lesueur 1824), *Gymnura altavela* (Linnaeus 1758) and *Rostroraja eglanteria* (Bosc 1800) (Bonting 1966); *Myliobatis aquila* (Linnaeus 1758) (Polver and Bernocchi 1970); *Potamotrygon* spp (Thorson et al. 1978); e *Hypanus sabinus* (Enest et al. 1981; Piermarini and Evans 2001). It seemed necessary to increase the knowledge of the rectal-gland morphology of stingrays. Therefore, this study aimed to assess the variation in the rectal gland structure of three Myliobatiformes species related to their phylogenetic position and habitat type.

Material and Methods

The project was carried out under environmental permits ICMBIO (permit number SISBIO-55756-6) and the sampling procedure following the principles of the Animal Use Ethics Committee (permit number CEUA-F15, 133/2017).

Species considered in this study

Dasyatidae Family

Hypanus marianae (Gomes, Rosa and Gadig 2000) the big eye stingray is a small and benthic batoid, endemic to coastal areas of northeastern Brazil (Costa et al. 2017). This species is associated with coral reef and seagrass environments (Gomes et al. 2000; Yokota and Lessa 2007; Costa et al. 2017). It is a carcinophagic species (Costa et al. 2015; Queiroz et al. 2019), that exhibit ontogenetic and sexual segregation, with the juveniles in sandbanks in shallow waters near the beach (Yokota and Lessa 2007; Costa et al. 2017).

Hypanus guttatus (Bloch and Schneider 1801), the longnose stingray is a benthic euryhaline species of Myliobatiformes, with distribution from the southern Gulf of Mexico and the West Indies south to Brazil, with habitat in coastal waters at depths below 36 m (Bigelow and Schroeder 1953; Cervigón 1966; McEachran and Carvalho 2002) and estuary (Thorson 1983). It is a generalist predator (Gianeti et al. 2019). The neonates and young of the year occur in the muddy bottom in the marine environment (Yokota and Lessa 2006; Melo 2016).

Aetobatidae Family

Aetobatus narinari (Euphrasen 1790) the large marine spotted eagle ray is a coral reef-associated, and mainly coastal and pelagic myliobatiform, which until recently, were described as a single species, with circumtropical distribution (Compagno and Last 1999). According to Richards et al. (2009), *A. narinari* is a species complex, with two distinct types one from Western and Central Pacific and the other through the Central Atlantic and the Eastern Pacific. The spotted eagle ray is a hard-prey specialist (Schluessel et al. 2010) that uses the northeastern Brazilian coast as a nursery area (Yokota and Lessa 2006).

Data collection

A total of 49 mature stingrays of both sexes from *H. marianae* (n= 19), *H. guttatus* (n= 10), and *A. narinari* (n= 20) captured in the marine coastal area of Pernambuco state Brazil were sampled from November 2016 to February 2018. For each specimen, after the record of the disc width (DW, cm), the length rectal gland was measured (LRG, cm), and the organ collected and fixed in formalin 10% with seawater for histological analysis.

Histology

Rectal glands were removed from stingrays and fixed in formalin 10% for 24hr. After that, the glands were cut transversely in three sections the anterior, medial, and posterior to the intestine valve and re-fixed in formalin 10% for another 24hr, and then transferred to 70% ethanol. Each section was dehydrated through immersion in increasing concentrations of ethanol, from 80 to 100%, diaphanized in butyl alcohol, and finally impregnated and embedded in paraplast. The paraplast blocks were cut in rotary microtome (Leica® RM2125RT) in 5 µm series, mounted on glass slides, and stained with Haematoxylin and Eosin (H&E). In the light microscope, the composition and structure of histological components of the rectal gland identified were photographed using a coupled HD camera and SigmaScan Pro 5.0 Image Software®.

Morphometric Analysis

The rectal gland values were expressed as percentual of disc width and compare among species. After routine histological examination, two slides from the transverse section of the medial part of the rectal gland of five animals of each species ($n = 15$) were used to morphometry analysis of three major components of the rectal gland. At 10x magnification, the rectal gland slide was divided into four quadrants regarding the dorsal intestinal vein. In each quadrant, five distinct points were aleatory chosen to measure the thickness of capsule components. The diameter and lumen of the small, medium and large tubules composing secretory parenchyma were measured, as well as the number of cell layers and the stratified epithelium thickness of the central duct. All measurements were obtained in ten random fields at 40x magnification, using ImageJ 1.49v software®.

Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk test was conducted to test data normality. All data are presented as mean $\pm$ the standard deviation (SD). The relationship between disc width and the rectal gland length was analyzed for all species. The best fit model to the data was selected based on r-squared value. The data normally distributed were compared using One Way ANOVA and post hoc Tukey HSD test. For Non-normal distribution data, the nonparametric test Kruskal-Wallis was performed (Zar 2010). All analysis was carried out using the RStudio 1.2.1335 Software. The significance level of 0.05 was applied *a priori* for all tests.

Results

The rectal gland is suspended in the dorsal mesentery, located on the right side of the dorsal side of the post-valvular intestine in *Hypanus guttatus* and *Hypanus marianae*, and for *Aetobatus narinari* in the left side. The rectal gland shape has distinct forms: small compact S-shaped for *Hypanus mariane* (Fig. 1a) long and S-shaped for *Hypanus guttatus* (Fig. 1b) and pod shaped aspect for *Aetobatus narinari* (Fig. 1c). In all species, the gland lobulate aspect is visible in the external surface, mainly in *A. narinari*. In the anterior region, the rectal

gland is associated with a mass of lymphoid tissue in all species. In *Hypanus* species, this lymphoid mass is limited to the dorsal part of the gland. However, in *A. narinari* the lymphoid tissue is continuous with the posterior end of the epigonal organ and wrap the gland.

In cross section, the lobular organization of rectal gland is more apparent, with a central lumen delimited by the central duct. There is an increasing in the number of lobes and in the inner structure complexity of each lobe from *H. marianae* (Fig. 1d) to *A. narinari* (Fig. 1f). *A. narinari* has gland length higher than *H. guttatus* and *H. marianae* (Table 1). The RGL length expressed as percentual of disc width (RGL%) represents just $2.5\% \pm 0.3$ of *A. narinari* disc width while in *Hypanus marianae* and *Hypanus guttatus* species it represents, respectively, 3.9 ± 0.5 and 4.1 ± 0.5 . The RGL % differed significantly among species (ANOVA; $F = 60.72$, $p = 0.000$). Tukey post hoc test indicated the difference lies in *Aetobatus* and *Hypanus* species (with $p=0.0000$ in both comparisons). The relationship between disc width and the rectal gland length was linear for all species analyzed, with the best fit to linear model the *H. marianae* data (Table 1).

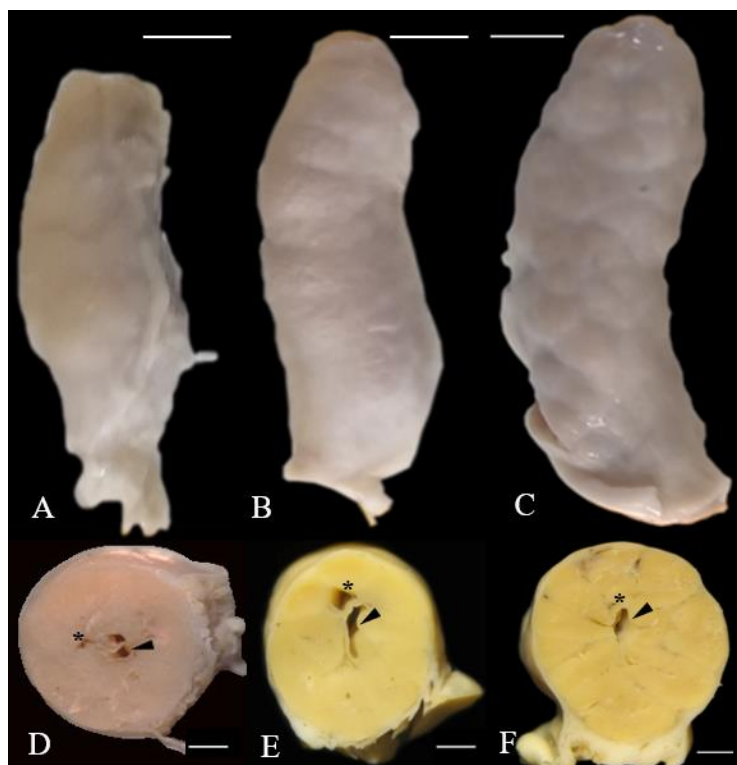


Fig. 1 Rectal gland lobulated aspect of *Hypanus marianae* (A) *Hypanus guttatus* (B) and *Aetobatus narinari*, (C). In transverse section, the lobular organization, the central duct (arrowhead) and blood vessel (*) are visible in the inner part of the gland from *Hypanus marianae* (D) *Hypanus guttatus* (E) and *Aetobatus narinari* (F). Scale bar (A) 0.5 cm, (B-C) 1cm, (D-F) 0.1cm.

Microscopically, the gland is composed of three distinct regions the capsule, the secretory parenchyma and the central duct (Fig. 2). The capsule consists of connective tissue layer, high vascularized, and a band of smooth muscle fiber, which surround the organ and invaginates into the secretory parenchyma forming lobe. Outside the capsule, the single layer of epithelium from peritoneum and lymphoid tissue are present (Fig. 2a & b). Peripheral blood vessels are seen in this region, in the anterior portion of the rectal gland it is mainly veins and arterial branched round the gland circumference, vast superficial venules are seen penetrating the secretory parenchyma getting wider when close to the central lumen (Fig. 2a).

Table 1 Disc width and Rectal gland length (mean $\pm$ SD), linear equation, coefficient of determination (r^2) and Pearson Coefficient test of three *Myliobatiformes* stingray

Species		RGL (cm)	DW (cm)	Equation	r^2	Pearson Coefficient
<i>Hypanus</i> (n=19)	<i>marianae</i>	1.06 $\pm$ 0.23	27.35 $\pm$ 2.34	$y = 0.02x - 0.16$	0.89	$p = 0.0000$; $t = 12.256$
<i>Hypanus</i> (n=10)	<i>guttatus</i>	2.15 $\pm$ 0.06	52.38 $\pm$ 6.61	$y = 0.05x - 0.79$	0.69	$p = 0.0000$; $t = 4.282$
<i>Aetobatus</i> (n=20)	<i>narinari</i>	3.14 $\pm$ 0.57*	123.80 $\pm$ 17.91	$y = 0.09x - 1.49$	0.68	$p = 0.0000$; $t = 6.246$

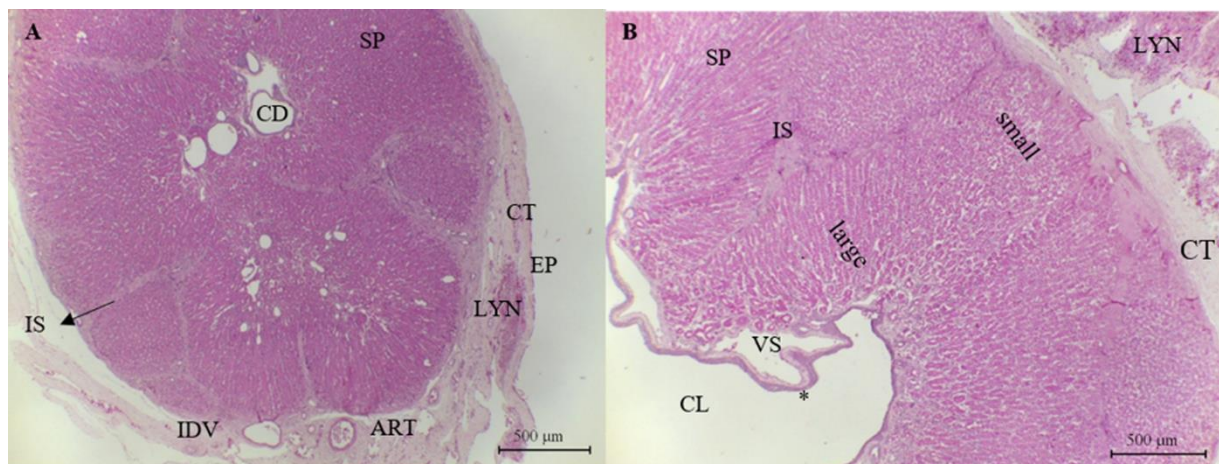


Fig. 2 A - Cross-section of anterior portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland. The superficial epithelium (EP) surrounds externally the capsule and just below it the concentric connective tissue layer (CT) with several blood vessels (BV) from capsule. The secretory parenchyma (SP) is partially divided by interlobular septum (IS) and in the innermost part of the gland occur the central duct (CD). Venous drainage is performed by the intestinal dorsal vein (IDV) and a main artery (ART). B - Cross-section of anterior portion of female *Hypanus guttatus* rectal gland, where are observed the secretory parenchyma (SP), interlobular septa (IS), large venous sinus (VS) near the central duct with central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*) and the lymphoid tissue external of the gland. H&E Staining

The interlobular sept divided partially the parenchyma region. It is formed by a smooth muscle and connective tissue and blood vessel. Inside each lobe, branched secretory tubules lined with capillaries dispose

around the central duct. The secretory tubules open in the central duct, which lumen is lined by a stratified epithelium. The capillaries connect the blood sinuses present in central and periphery areas of the rectal gland (Fig. 2b). The secretory tubules consist of columnar/pyramidal cell with conspicuous and basal nuclei, with cytoplasmic granules and striated border in apical membrane (Fig. 3b & c). In some specimens, the secretory cell had a vacuolized cytoplasm (Fig. 3 b & c). The tubules are tightly packed close to the capsule, with small lumen, and usually have four secretory cells (Fig. 4 a & b). In the middle portion of secretory parenchyma and close to the central duct, the tubules are loosely packed, forming medium and large tubules, which have at least five secretory cells (Fig. 3 a & c). The tubules secrete their products into the lobular duct (Fig. 4).

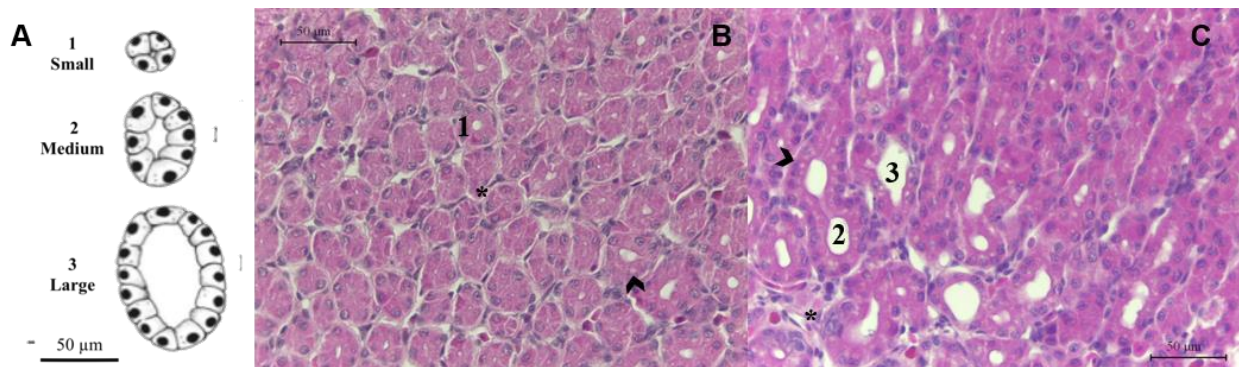


Fig. 3 General secretory tubules of Myliobatiformes stingrays. A - The scheme of the different tubules and secretory cells with prominent basal nuclei. B: Near the capsule tubules high cubic cells and small lumen are abundant (1). C: As approach to the central duct in the middle portion of parenchyma, the secretory cubic cells became lower and tubules with medium and large lumens are visible. Arrowhead indicates one secretory cell with vacuolized cytoplasm; * extra tubular space with capillaries and nucleated red blood cells visible. H&E Stain

The lobular duct from each lobe open into the central duct which has a central lumen lining with stratified epithelium with four to seven cells layers (Fig. 4 a & b). The superficial stratum of epithelium presents granular cells with nuclei polymorphs and striated border and mucous cells (Fig. 4 c). There is a decreased in number of mucous cells in central duct from anterior part of the rectal gland near the cloaca through the posterior part (Fig. 4 c-f). Between the central duct and secretory parenchyma, just below the basal membrane of stratified epithelium, the venous sinuses presence is well delimited in connective tissue (Fig. 4 a).

Despite the common histological structure, there are significative difference in rectal gland of stingrays studied. Outside the capsule, the simple epithelium layer from peritoneum exhibit a squamous/cubic cell in *H. marianae* (Fig. 5a) and a columnar/cubic cell with basal nuclei *H. guttatus* and *A. narinari* (Fig. 5 b & c). In *H. guttatus* besides the columnar cell, round cells with acidophilic granules in cytoplasm were visible (Fig. 5b). The lymphoid tissue associated with the capsule, for the spotted eagle ray is abundant in comparison with the other species. In the capsule, the dense connective tissue and smooth muscle layers varied in thickness among species (Fig. 5). *Aetobatus narinari* capsule is three times thicker than *H. guttatus* and *H. marianae* (K-W; df = 2, p = 0.014), (Table 2).

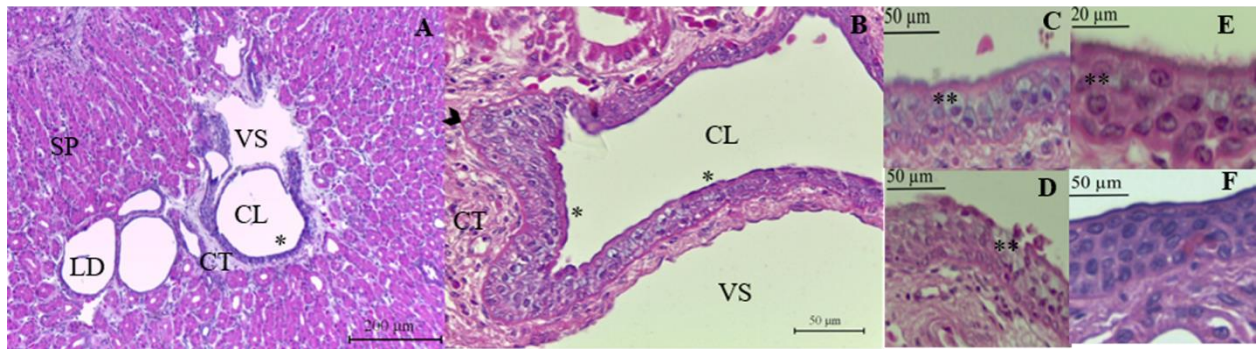


Fig. 4 A - Cross-section of posterior portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland, where central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), lobular duct (LD), connective tissue (CT), secretory parenchyma (SP), B - Cross-section of medium portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland, where central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), venous sinuses (VS), connective tissue (CT), arrowhead indicates epithelium basal membrane. C-F, detail of stratified epithelium, showing reduction of the number of mucous cell (**) from anterior part (C), through middle part (D-E) to posterior region (F) of the gland. H&E Stain

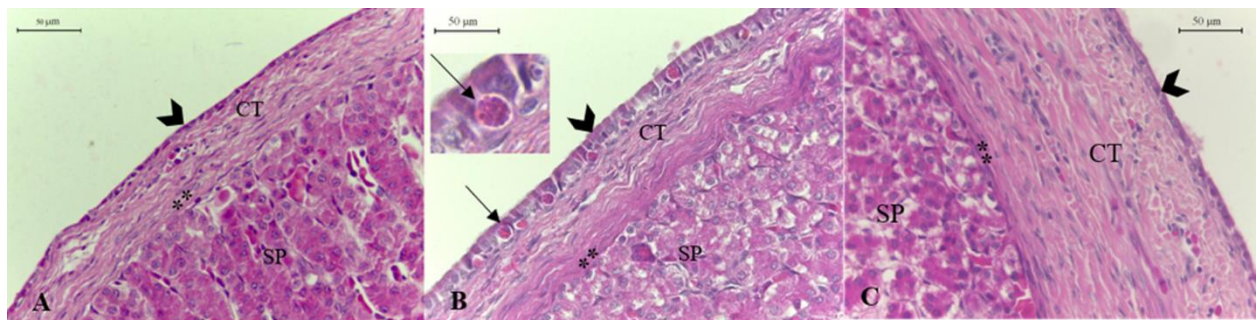


Fig. 5 Transverse section of the anterior part of the rectal gland, with detail of capsule component of A – *Hypanus marianae*. B- *Hypanus guttatus*. C-*Aetobatus narinari*. The superficial epithelium (arrowhead), the concentric connective tissue (CT), and (**) smooth muscle layers, and the secretory parenchyma (SP). Epithelium cell with acidophilic granules (arrow). H&E Stain

The interlobular septum is thin in *Hypanus* species. In *H. marianae* the parenchyma structure is more simple than in *H. guttatus* (Fig. 6 a & b). The absence of well-defined lobule and branches tubules gives a radial disposition to secretory tubules around the central duct in transverse section through medium part of the *H. marianae* rectal gland. The rectal gland of the spotted eagle ray has the parenchyma area well divided in lobules by the large interlobular septum (Fig. 6c). When the interlobular ramifications are conspicuous, the secretory tubules exhibit a compact aspect inside each lobe, which has lobular ducts originated from the central duct branches (Fig. 5 a). In this structural organization, the lobes are arranged around the central duct as noted in the glands of *Aetobatus narinari* (Fig. 6 a) and *Hypanus guttatus*, but in the latter less evident (Fig. 6 b).

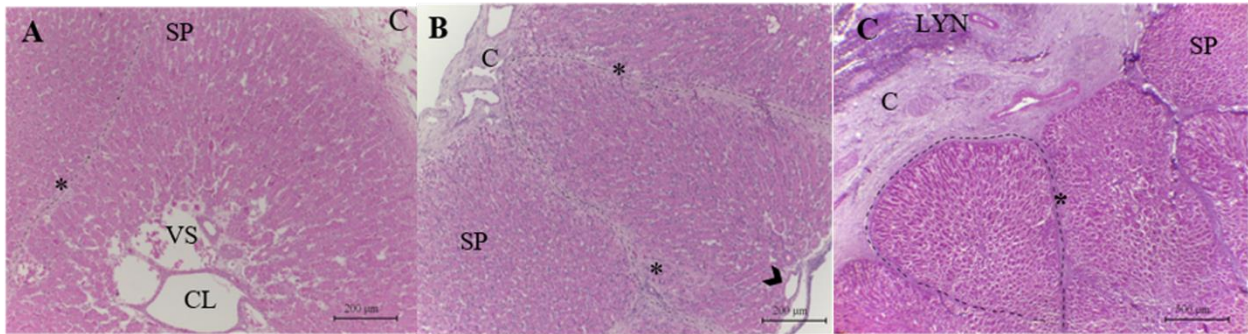


Fig. 6 A -Cross-section of anterior portion of female *Hypanus marianae* rectal gland. B- Cross-section of anterior portion of male *Hypanus guttatus* rectal gland. C- Cross-section of anterior portion of rectal gland male *Aetobatus narinari* Where : Capsule (C), secretory parenchyma (SP) is partially divided by interlobular septum (IS) in Lobules (L), large venous sinus (VS) near the central duct with central lumen (CL) lined by the stratified epithelium (*), lobular duct (arrowhead) and the lymphoid tissue (LYN) external of the gland. H&E Stain

The diameter of secretory tubules did not vary among species. *H. marianae* presented lower diameter of lumen values compared to other stingrays analyzed. The lumen of tubules near the capsule shown differed significantly regard the lumen diameter among the batoids in this study (K-W, $df = 2$, $p = 0.049$) (Table 2). The central duct of *A. narinari* and *H. guttatus* exhibited branches that invaginate into the lobes and originate the lobular ducts (Fig. 4 a). In *H. marianae* the central duct does not have branches and secrete tubule open direct into central lumen. In this species, intraepithelial acidophilic cells occur besides granular cells and mucous cells at stratified epithelium (Fig. 7 a). The central duct of *A. narinari* the epithelium has a higher number of cells and the values of thickness differed significantly of the values measured in *H. guttatus* and *H. marianae*, (ANOVA; $F = 6.90$, $p = 0.01$) (Table 2).

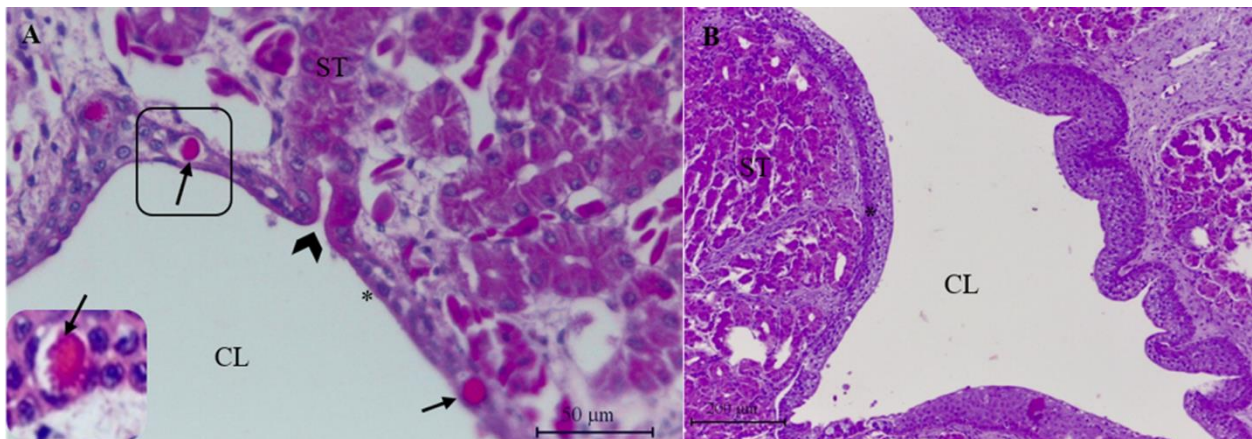


Fig. 7 Rectal gland cross-section of: A –*Hypanus marianae*, showing the secrete tubule (ST) open direct into central lumen (CL) (arrowhead), intraepithelial acidophilic cells (arrow) at stratified epithelium (*). B- *A. narinari* showing the thickness of stratified epithelium (*) lining the central lumen (CL), and the lobules around the central duct. Stained with H&E

Table 2 Morphometric parameters of the rectal gland of the three stingrays analyzed in this study

Secretory Parenchyma									
Species	Capsule (thickness, mm)	Small tubules		Medium tubules		Large tubules		Stratified epithelium (thickness, mm)	No..of cel Stratified epitheliu m (layers)
		Diamenter (mm)	Lumen (mm)	Diamenter (mm)	Lumen (mm)	Diamenter (mm)	Lumen (mm)		
<i>H.mariana</i>	0.04±0.008	0.037±0.006	0.008±0.007	0.056±0.007	0.042±0.007	-	-	0.042±0.00	5.4±1.34
<i>H.guttatus</i>	0.05±0.01	0.037±0.020 ^a	0.014±0.009	0.077±0.010	0.044±0.009	0.105±0.022	0.073±0.012	0.045±0.01 a	5.2±0.44
<i>A. narinari</i>	0.15±0.12	0.04±0.035	0.09±0.03	0.07±0.002	0.03±0.002	0.138±0.035	0.092±0.035	0.09±0.044	7.4±1.51

Notes: Values are average ± SD (n = 5).

Discussion

The rectal glands vary in shape and size in all elasmobranch groups, and those differences in the morphology may be related to the role of the gland in homeostasis (Newbound and O'Shea 2001). Crofts (1925) described some batoids rectal gland form as club-shaped, in *Torpedo*, ovoid in *Pristis*, and digitiform in *Acroteriobatus blochii* (Müller and Henle 1841). In *Hypanus sabinus* is cylindric-shape (Ernest et al. 1981), for *Urolophus jamaicensis* is S-shaped and lobulated (Doyle 1962), the same pattern observed in the rectal gland of the most stingrays of this study (Fig. 1).

In stingrays, the lymphoid tissue associated with the rectal gland is related to the posterior end of the epigonal organ (Zapata et al. 1996). The freshwater stingray *Potamotrygon motoro* has a lymphomieloid tissue lobulated and related to its reduced rectal gland (Thorson et al. 1978). In spotted eagle ray, as observed in *Acroteriobatus blochii* the gland is surrounded by lymphomieloid tissue (Crofts 1925). The rectal gland size in batoid is smaller than sharks, as noted in *Leucoraja erinacea* (Mitchill 1825) (Kelley et al. 2014) and in *Acroteriobatus blochii* (Crofts 1925). In the pelagic *A. narinari*, the lower RGL% observed is due to the high value of DW caused by the lateral expansion of the disc while in benthic *Hypanus* spp, the rhomboid-shape of the body (Martinez et al. 2016) gives the lower value of DW and therefore high RGL% values.

The Myliobatiformes species studied so far have the rectal gland divided into lobules (Bonting 1966; Polver & Bernocchi 1970). In sharks, the rectal gland morphology is associated with taxonomic affiliation. The ancestral hexanchids and echinorhinids have lobulated rectal glands, and the most derived sharks such as carcharhinids and sphyrnids exhibit the digitiform type of gland (Larsen et al. 2019). In Holocephali, an ancient group of Chondrichthyes, the salt secreting structure is tubular secretory structures divided in lobes (Crofts 1925; Fänge and Fugelli 1963; Hyodo et al. 2007). According to Larsen et al. (2019), the Holocephali glandular structure has anatomical similarities with hexanchids lobulated rectal gland.

The remarkable differences observed in the RG structure of the stingrays could be related to the phylogeny of the group. The myliobatoids are the most advanced and specialized batoids (González-Isáis and Domínguez 2004). The basal species, *H. marianae*, exhibited the lobulated aspect of the gland undeveloped due to the thin capsule and tiny muscle layer. The absence of lobular ducts gave the gland a digitiform aspect in transverse section similar to *Sciliorhinus canicula* (Linnaeus 1758), *Heptranchias perlo* (Bonnaterre 1788) (Crofts 1925), *Squalus acanthias* Linnaeus, 1758 (Matey et al. 2009) *Centrophorus uyato* (Rafinesque 1810) (Larsen et al. 2019).

On the contrary, the most derived species in this study, *A. narinari*, has a rectal gland with a higher thickness of capsule structures that allow a distinct lobule division. This lobular aspect had some morphological resemblance to tubular secretory structures of elephant fish (Hyodo et al. 2007). In this way, our results are in agreement with Larsen et al. (2019) that lobulated rectal gland morphology is a primitive plesiomorphic characteristic in elasmobranch fishes.

H. guttatus has pointed snout that is one characteristic from derived species of Dasyatidae family (Rosenberger, 2001). The capsule is more enlarged than the observed in *H. marianae* RG, and the lobulated division was similar to *Urolophus jamaicensis* (Doyle, 1962) and the euryhaline shark *Carcharhinus leucas* (Müller and Henle 1839) (Pillans et al. 2008). Both *Hypanus* species are benthic, but *H. guttatus* is the only euryhaline species (Thorson 1983).

The acidophil cells present in the outer layer epithelium only occurred in the euryhaline species *H. guttatus*. The same kind of cell is present in other euryhaline stingray *H. sabinus* (Piermarini and Evans 2001). These cells are similar to type I granular cells found in the spiral intestinal epithelium of thornback ray, *Raja clavate* (Linnaeus 1758), and possibly are related to the first-line defense mechanisms of the rays spiral intestine (Dezfuli et al. 2018). However, the role of these granular cells in the RG function still needs to be elucidated.

The elasmobranch rectal gland capsule is probably involved and may actively participate in glandular activities, as suggested by Masini et al. (1994). The smooth muscle layer in the periphery of the capsule respond to stimuli of vasoactive signaling agents, which can alter the gland dimensions and influence the secretory function of the RG (Piermarini and Evans 2001).

The marine stenohaline spotted eagle ray has the most developed muscle layer present in the capsule of the batoids studied. This result suggests that the differences observed in the thickness of the muscle layer can be more related to habitat type pelagic/benthic or phylogeny than associated with different environmental conditions.

The simple columnar epithelium of secretory tubules in stingrays analyzed is conservative character in Chondrichthyes class (Crofts 1925; Doyle 1962; Chan and Phillips 1967; Polver et al. 1970; Ernst et al. 1981; Newbound and O'Shea 2001; Hyodo et al. 2007; Larsen et al. 2019), and is similar to hypertonic secretory epithelia of other structures (Ernst et al. 1981).

The diameter of small tubules of *Scyliorhinus canicula* (Crofts 1925); *Cetorhinus maximus* (Gunnerus 1765) (Fänge and Fugelli 1963) and *Squalus acanthias* (Matey et al. 2009) is in range of stingrays in this study (30 – 40 µm). In euryhaline *C. leucas*, there were not separated areas of small and large tubules, and the diameter of secretory tubule ranged 26 to 52 µm (Pillans et al. 2008). These values are similar to the diameter range of small and medium-size tubules of stenohaline *H. marianae*. The inactive rectal gland of freshwater stingray *P. motoro* has the number of tubules extremely reduced and their distribution is restricted around central duct (Thorson et al. 1978).

Tubules branched and with large lumen diameter were missing in *H. marianae*. However, in *H. guttatus* and *A. narinari*, large and branched tubules near the central duct and around the venous sinuous were present. The large lumen increases the surface area of the tubules available for secreting salt (Newbound and O'Shea 2001) and allied to branching could indicate a possible intense salt transport in the region (Masini et al. 1994).

All species of stingrays have rectal gland with the secretory cells of the tubular epithelium with vacuolized cytoplasm. According to Chan and Phillips (1967), vacuoles in cytoplasm occur in rectal gland of low secretory activity or/and in individuals in fasting condition (Matey et al. 2009). The rectal gland activity is directly influenced by changes in environmental salinities and feeding (Anderson et al. 2002; Mackenzi et al. 2002; Matey et al. 2009), resulting in a reduction in gland width, weight, and microscopic structures.

H. guttatus is a generalist and opportunistic predator feeding on the most available prey in the environment (Gianetti et al. 2019), with the ability to move between habitats with saltwater to brackish water (Thorson 1983). This movement requires the capacity to rapidly increase or decrease the RG secretion of NaCl in different environmental salinity, as noted in the euryhaline stingray *H. sabinus* (Piermarini and Evans 1998; Piermarini and Evans 2000). The vacuolized cytoplasm in the secretory cell in *H. guttatus* could be a result of the use of brackish habitat more than difficult to feeding.

A. narinari is a hard-prey specialist and feeds almost exclusively gastropods (Schluessel et al. 2010), and *H. marianae* is a specialized predator preying mainly shrimps and polychaetes (Queiroz et al. 2019). Both species are stenohaline, and they use shallow coastal water as a nursery area (Yokota and Lessa 2006; Yokota and Lessa 2007). It can be suggested that vacuolized cytoplasm in the secretory cell in both stingrays could be the result of the difficulty of feeding due to the preference of specific prey groups.

The pelagic *A. narinari* showed a higher number of cells and thickness stratified epithelium than benthic *Hypanus* species. Nevertheless, all stingrays studied had the number and shape of superficial cell similar to *U. jamaicensis* (Doyle 1962), *S. acanthias* (Burger 1965), *Chiloscyllium plagiosum* (Chan and Phillips 1967) and *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer 1793) (Newbound and O'Shea 2001).

The cellular specialization in luminal epithelium, showed variation depending on the region of the gland (Newbound and O'Shea 2001). The majority of superficial cell is granular type of cell (Ernst et al. 1981). However, mucous cells were more abundant in the anterior part of gland, near the duct exiting the gland in post valvular intestine area (Boyle 1965; Chan and Philipps 1967; Newbound and O'Shea 2001; Fishelson et al. 2004). Mucous cells occupy a large mass in a tubular-shaped glandular tissue in Holocephalan fishes (Yui et al. 1970; Hyodo et al. 2007), the mucus substance may bind Na-ions that have been secreted into the central duct, and assist in the Na-secreting process by rectal gland (Bonting 1966).

The diversity of cells in the surface layer of the stratified epithelium suggest a physiological role for this tissue (Boyle, 1965). The presence of acidophilic cell in central duct of *H. marianae* is not related to acidophil cell describe by Chan & Philipps, (1967) in *C. plagiosum*. The cell morphology is not similar, and role of this cell in central duct still needs to be elucidated.

The morphological differences observed in this study could be related to benthic versus pelagic lifestyle. *H. guttatus* and *H. marianae* are coastal benthic stingrays with highly specificity of habitat (Thorson 1983; Costa et al. 2017). *A. narinari* is a wide-range species that lives in pelagic environment (Richards et al. 2009). Few

coastal sharks have preference for habitats with moderate salinities to decrease metabolic costs associated with osmoregulation (Larsen et al. 2019). One may assume that in the marine pelagic area, where salinity is higher, the rectal gland acts more actively in the osmoregulation than in coastal areas where the function of the gland is reduced.

Acknowledgments

Our special thanks to the fisherman who directly contributed to project execution. Thanks to the Laboratory of Marine Population Dynamics of Universidade Federal Rural de Pernambuco/Departamento de Pesca e Aquicultura for partnership and collaboration in sampling.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Contributions This paper is the result of A.C.M.M. Ph.D. research. C.B.A. collaborated processing samples and data analysis also assisted in editing the final text. Scientific contributions and discussions were jointly conducted with the authors M.G.R., M.L.G.A. and J.E.N. as well as the final wording text.

References

- Anderson WG, Good JP, Hazon N (2002) Changes in chloride secretion rate and vascular perfusion in the rectal gland of the European lesser spotted dogfish in response to environmental and hormonal stimuli. *Journal of Fish Biology* 60: 1580–1590
- Anderson WG, Taylor JR, Good JP, Hazon N, Grosell M (2007) Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry Physiology Part A Molecular Integrative Physiology* 148:3-13
- Ballantyne JS, Fraser DI (2012) Euryhaline elasmobranchs. In: McCormick SD, Farrell AP and Brauner CJ (eds.) *Fish Physiology* v. 32. New York: Elsevier. pp 125-198
- Bigelow and Schroeder (1953) *Fishes of the Western North Atlantic. Sawfishes, Guitarfishes, Skates and Rays.* Memoirs Sears Foundation for Marine Research, New Haven. pp.588
- Bonting SL (1966) Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase—XV the rectal gland of the elasmobranchs. *Comparative biochemistry and physiology* 17(3):953-966
- Bulger RE (1963) Fine structure of the rectal (salt secreting) gland of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *The Anatomical Record* 147:95–127
- Burger JW, Hess WN (1960) Function of the rectal gland in the spiny dogfish. *Science* NY 131:670–671
- Burger RE (1965) Electron microscopy of the stratified epithelium lining the excretory canal of the dogfish rectal gland. *The Anatomical Record* 151:589-608

Cervigón F. (1966) Los Peces Marinos de Venezuela. Estación de Investigaciones Marinas de Margarita – Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Caracas, pp 951

Chan DK, Phillips JG (1967) The anatomy, histology and histochemistry of the rectal gland in lip-shark *Hemiscylium plagiosum* (Bennet). *Journal of Anatomy* 101: 137

Compagno LJV, Last PR (1999) Mobulidae: devil rays. In: Carpenter KE, Niem VH (eds) *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific Volume 3. Batoid fishes, chimaeras and bony fishes part 1 (Elopidae to Linophrynidae)*. Rome, FAO. pp 1397-2068

Costa TLA, Thayer JA, Mendes JF (2015) Population characteristics, habitat and diet of a recently discovered stingray *Dasyatis marinae*: implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 86:527-543

Costa TLA, Penino M, Mendes LF (2017) Identifying ecological barriers in marine environment: The case study of *Dasyatis mairiana*. *Marine environmental research* 125:1-9.

Crofts, D. R. (1925) The comparative morphology of the caecal gland (rectal gland) of selachian fishes, with some reference to the morphology and physiology of the similar intestinal appendage throughout Ichthyopsida and Sauropsida. *Proceedings of the Zoological Society of London* 95: 101–188.

Doyle WL (1962) Tubule cells of the rectal salt gland of *Urolophus*. *American Journal of Anatomy* 111:223–237

Ernst SA, Hootman SR, Schreiber JH, Riddle CV (1981) Freeze-fracture and morphometric analysis of occluding junctions in rectal glands of elasmobranch fish. *The Journal of membrane biology*, 58:101-114

Evans AN, Lambert FN (2015) Na⁺/K⁺-ATPase α 1 mRNA expression in the gill and rectal gland of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, following acclimation to increased salinity. *BMC research notes*, 8: 219

Fänge R, Fugelli K (1963) The rectal salt gland of elasmobranchs, and osmoregulation in chimaeroid fishes. *Sarsia*, 10:27-34

Fishelson L, Baranes A, Delarea Y (2004) Morphogenesis of the salt gland in the viviparous Oman shark, *Iago omanensis* (Triakidae) from the Gulf of Aqaba (Red Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84:433-437

Gelsleichter J (2004) Hormonal regulation of elasmobranch physiology. In: Carrier JC, Musick JA., Heithaus MR (eds) *Biology of sharks and their relatives*. CRC Press, pp 294-332

Gerzeli G, De Stefano GF, Bolognani L, Koenig KW, Gervaso MV, Omodeo-Sale MF (1976) The rectal gland in relation to the osmoregulatory mechanisms of marine and freshwater elasmobranchs. In: Thorson TB (ed) *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes*. Lincoln, NE: School of Life Sciences, University of Nebraska, pp 619–627

Gianeti MD, Santana FM, Yokota L, Vasconcelos JE, Dias JF, Lessa RP (2019) Age structure and multi-model growth estimation of longnose stingray *Hypanus guttatus* (Dasyatidae: Myliobatoidei) from north-east Brazil. *Journal of Fish Biology* 94:481-488

Gomes UI, Rosa RS, Gadig OBF (2000) *Dasyatis macrophthalma* sp. n. A new species of stingray (Chondrichthyes: Dasyatiidae) from the southwestern Atlantic. *Copeia* 2:510-515

González-Isáis M, Domínguez HMM (2004) Comparative anatomy of the superfamily Myliobatoidea (Chondrichthyes) with some comments on phylogeny. *Journal of Morphology* 262:517-535

Grant MI, Kyne PM, Simpfendorfer CA, White WT, Chin A (2019) Categorising use patterns of non-marine environments by elasmobranchs and a review of their extinction risk. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1-22

Hyodo S, Kakumura K, Takagi W, Hasegawa K, Yamaguchi Y (2014) Morphological and functional characteristics of the kidney of cartilaginous fishes: with special reference to urea reabsorption. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307:1381-1395.

Kelley CA, Decker SE, Silva P, Forrest-Jr JN (2014) Gastric inhibitory peptide, serotonin, and glucagon are unexpected chloride secretagogues in the rectal gland of the skate (*Leucoraja erinacea*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 306(9):R674-R680

Larsen ME, Abel DC, Crane DP, Parker SL, Yancey PH, Keller BA, Grubbs DR (2019) Unique osmoregulatory morphology in primitive sharks: an intermediate state between holocephalan and derived shark secretory morphology. *Journal of Fish Biology* 95:1331-1341

Lucifora LO, Balboni L, Scarabotti PA, Alonso FA, Sabadin DE, Solari A, Astarloa JMD (2017) Decline or stability of obligate freshwater elasmobranchs following high fishing pressure. *Biological conservation*, 210:293-298

MacKenzie S, Cutler CP, Hazon N, Cramb G (2002) The effects of dietary sodium loading on the activity and expression of Na, K-ATPase in the rectal gland of the European dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131: 185-200

Martinez CM, Rohlf FJ, Frisk MG (2016) Re-evaluation of batoid pectoral morphology reveals novel patterns of diversity among major lineages. *Journal of morphology*, 277(4):482-493

Masini MA, Uva B, Devecchi M, Napoli L (1994) Renin-like activity, angiotensin I-converting enzyme-like activity, and osmoregulatory peptides in the dogfish rectal gland. *General and comparative endocrinology* 93:246-254

Matey V, Wood CM, Dowd WW, Kultz D, Walsh PJ (2009) Morphology of the rectal gland of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) shark in response to feeding. *Can J Zool*, 87:440-452

McEachran JD, De Carvalho MR, Carpenter KE (2002) Batoid fishes. In: Carpenter EE (ed) *The living marine resources of the Western Central Atlantic*, Vol 1. Rome: FAO pp 507-589

Melo ACM (2016) *Biologia reprodutiva e pesca da raia Dasyatis guttata* (Block & Schneider, 1801) (Elasmobranchii: Dasyatidae) na plataforma continental de Pernambuco, Brasil. MSc Dissertation, Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil. Retrieved from <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/7082>

Newbound DR, O'Shea JE (2001) The microanatomy of the rectal gland of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer) (Heterodontidae): suggestions for a counter-current exchange system. *Cells Tissues and Organs*, 169:165–175

Oguri M (1964) Rectal gland of marine and freshwater sharks. *Comparative Histology Journal*, 144:1151–1152

Piermarini PM, Evans DH (1998) Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater lake Jesup of the St Johns River, Florida. *Physiological Zoology*, 71:553–560

Piermarini PM, Evans DH (2000) Effects of environmental salinity on Na^+/K^+ -ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology*, 203:2957–2966

Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Hazon N, Franklin CE (2008) Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, 72:1559-1571

Polver PDP, Bernocchi G (1970) La Ghiandola Rettale in *Myliobatis Aquila*: Raffronto comparativo con *Scylliorhinus canicula*. *Italian Journal of Zoology* 37:151-160

Queiroz AP, Araújo ML, Lessa R (2019) Dietary composition and trophic level of *Hypanus marianae* (Myliobatiformes: Dasyatidae), captured off Pernambuco coast, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research* 47:808-817

Richards VP, Henning M, Witzell W, Shivji MS (2009) Species delineation and evolutionary history of the globally distributed spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). *Journal of Heredity*, 100(3):273-283

Rosenberger LJ (2001) Pectoral fin locomotion in batoid fishes: undulation versus oscillation. *Journal of Experimental Biology* 204:379-394

Schluessel V, Bennett MB, Collin SP (2010) Diet and reproduction in the white-spotted eagle ray *Aetobatus narinari* from Queensland, Australia and the Penghu Islands, Taiwan. *Marine and freshwater research* 61:1278-1289

Shuttleworth TJ (1988) Salt and water balance extrarenal mechanisms. In: *Physiology of Elasmobranch Fishes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 171-199

Silva P, Solomon RJ, Epstein FH (1997) Transport mechanisms that mediate the secretion of chloride by the rectal gland of *Squalus acanthias*. *Journal of Experimental Zoology*, 279:504-508

Thorson TB, Brooks DR (1983) The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *Nat Geog Soc Res Rep*, 15:663–694

Thorson TB, Wootton RM, Georgi TA (1978) Rectal gland of freshwater stingrays *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biological Bulletin. Marine Biological Laboratory Woods Hole*, 154:508-516

Van Lennep EW (1968) Electron microscopic histochemical studies on salt-excreting glands in elasmobranchs and marine catfish. *Journal of ultrastructure research*, 25(1-2):94-108

Weigmann S (2016) Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology*, 88(3):837-1037

Yokota L, Lessa RP (2007) Reproductive biology of three ray species: *Gymnura micrura* (Bloch & Schneider, 1801), *Dasyatis guttata* (Bloch & Schneider, 1801) and *Dasyatis marianae* Gomes, Rosa & Gadig, 2000, caught by artisanal fisheries in northeastern Brazil. *Cahiers de Biologie Marine* 48:249–257

Yokota L, Lessa RP (2006) A nursery area for sharks and rays in northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 75:349–360

Yui R, Shimada M, Fujita T (1990) Immunohistochemical studies on peptide-and amine-containing endocrine cells and nerves in the gut and the rectal gland of the ratfish *Chimaera monstrosa*. *Cell and tissue research*, 260(1):193-201

Zapata AG, Torroba M, Sacedon R, Varas A, Vicente A (1996) Structure of the lymphoid organs of elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 275:125-143.

CAPÍTULO III: Artigo II

Artigo a ser submetido à revista *Zoomorphology*

Morphological variations in osmoregulation organs of three Myliobatiformes stingrays

Andressa C.M. Melo¹, Mariana G. Rêgo², Maria Lúcia G. de Araújo¹, Joaquim Evêncio Neto^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence

Andressa Melo, Laboratório de Histologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

E-mail: andressa_cmm@hotmail.com

Abstract

The Elasmobranch fishes are widely distributed and face different environments with osmoregulatory strategies in different ways. The rectal gland is essential in the marine environment and responsible for the secretion of sodium chloride in large quantities. In diluted environments that the influx of water and the efflux of ions and excess urea are observed, the requirement now is the active reabsorption of ions by the gills and kidneys. Thus, the present study analyzed the morphological variations in the rectal gland, kidney, and gills between the spotted eagle ray *Aetobatus narinari*, the longnose stingray *Hypanus guttatus* and the large-eye stingray *Hypanus marianae*. The rectal gland tissue composition changes between species with the *A. narinari* showing developed connective capsule, smooth muscle layer and central lumen. In the Kidney, the glomeruli differed ($\chi^2 = 15.52$, $p = 0.000$) in size and the small diameters were observed in *H. marianae*, possibly associated with high salinities inhabited by this species. Together with *H. guttatus* showed the juxtaglomerular region in the distal duct with high cuboid cells with large nucleus occupying the cytoplasm, the abundant euchromatin possibly is related with cell activity. Only the gill epithelium of *Hypanus* was analyzed and showed cell-like mitochondria rich cells in the interlamellar space. Mucous cells were observed in mayor numbers in *Hypanus guttatus* and may be related to the transitions that this species is submitted between seawater and estuarine areas. Changes observed are related not only with the habitat of these species but with species-specific physiological regulation to deal with environmental changes.

Keywords Ionoregulation Salinity Histology Rectal Gland Kidney Gills

Introduction

In marine environments, elasmobranchs face the hyperosmotic stress maintain their plasma isosmotic or slightly hyper-osmotic to surrounding seawater. These animals are widely distributed in marine seawater and few species routinely enter freshwater (Martin, 2005; Grant et al., 2019). To overcome problems with transitioning from a marine to a freshwater environment, these animals face osmoregulatory, ionoregulatory, energetic costs and other constraints (Ballantyne and Robinson, 2010).

In seawater, plasma Na^+ and Cl^- concentrations are significantly lower compared to saltwater, facilitating a slight osmotic flow of water and a large influx into the dysfunctional gradient into the animal (Olson, 1999; Pillans & Franklin, 2004; Smith, 1931). The constant ions influx balance is achieved by excretion of the rectal gland, a highly specialized organ responsible for the secretion of sodium chloride (NaCl) at a concentration twice as high as blood plasma and slightly larger than seawater (Burger & Hess, 1960; Cramp *et al.*, 2015). In fact, this is due to the high plasma levels of urea and trimethylamine N-oxide (TMAO) which in addition to elevating plasma osmolality to values slightly above those found in seawater drive osmotic water uptake (Smith, 1931; Wosnick & Freire, 2013). When salinity decreases, solutes follow the same trend and urea and methylamines are the main organic osmolytes that are reduced. In these environments, elasmobranchs need to actively conserve plasma osmolytes, and NaCl secretion via the rectal gland would be physiologically unviable (Pillans *et al.*, 2008). The rectal gland then reduces its activity and the gills and kidneys play a major role in ionic, water balance and urea retention (Cramp *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2005; Piermarini & Evans, 2000).

The role of elasmobranch gill in active ion regulation is considered secondary to the rectal gland (Burger and Hess, 1960), and is important for salt uptake and acid-base balance, while the rectal gland is the primary site for salt excretion (Piermarini and Evans, 2000; Hazon et al., 2003). However, the mechanism of NaCl elimination in secretory cells of the rectal gland is the same as described in the teleost gill mitochondria rich cells (cell-type involved in the active Cl^- efflux) (Wilson et al., 2002a; Riordan et al., 1994). The kidney plays a role in the regulation of sodium chloride, it is capable to alter its capacity in response to environmental salinity (Hammerschlag, 2006), and it is suggested that has more important roles in ion retention in freshwater than in seawater (Pillans et al., 2005; Ballantyne and Robinson, 2010). When the rectal gland is removed elasmobranch is capable to osmoregulate, producing urine that isotonic with the plasma. Nevertheless, there is no change in

brachial mitochondria rich cells (ultrastructure, numbers or Na^+/K^+ -ATPase activity) in glandless *Squalus acanthias* (Wilson et al., 2002b) and Evans et al. (2004) suggested that elasmobranch kidney is probably not able to create a net secretion of salt and cannot solely compensate for the rectal gland after its removal. The roles in compensatory mechanisms in elasmobranchs are not clear despite the wide information about their osmoregulation.

The histological approach was used in the present study to analyze differences between osmoregulatory organs in distinct species to highlight mainly changes that may help to understand the adaptation mechanisms of Myliobatiforms stingrays in different environments.

The Materials and methods

Animals

This work followed the environmental permits (SISBIO-55756-6) and sampling procedure in accord with the Animal Use Ethics Committee (CEUA-F15, 133/2017). Stingrays mature and mixed-sex, eagle ray *Aetobatus narinari*; longnose stingray *Hypanus guttatus* and large-eye stingray *Hypanus marianae*, were obtained from artisanal fishing with big-mesh ray-net and longline in coastal waters of the north of Pernambuco, Brazil.

Rectal gland, Kidney and gill morphology

Samples of rectal gland were cut transversely from the cut end to the anterior half (Pillans et al., 2008), the kidney was cut in half in the midway between the cephalic and caudal ends of the organ (see Lacy and Reale, 2018) and the third gill arch in the left side was cut in the middle portion and three adjacent filaments were removed (adapted by Hughes et al., 1986). All tissues were fixated in formalin 10% for 24hr and examined using both light microscope and SEM. For light microscope, fixed tissue was embedded in paraffin, and semithin sections with 5 μm were mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin, Gomori's and Masson's trichrome, Alcian blue (pH 2.5) and Periodic acid-Schiff (PAS). The three tissue layer of the rectal gland (*A. narinari* n = 4; *H. guttatus*, n = 4; *H. marianae*, n = 4) (connective tissue of the capsule with the muscle layer, secretory parenchyma and central lumen epithelial layer) were analyzed; for the kidney (*A. narinari*, n = 2; *H. guttatus*, n = 9; *H. marianae*, n = 3) the glomeruli diameter and nephron general segments aspects (neck segment, proximal tubule

segment, intermediate segment and distal segment); and for the gills, lamellar structure, and the presence of mitochondria rich cell (MRC) and mucous cells was observed. Gills observations were made only between *H. guttatus* (n = 5) and *H. marianae* (n = 3) species. Overall structures were visualized and photographed with a coupled HD camera and SigmaScan Pro 5.0 image Software. For SEM (TESCAN VEGA 3), samples were deionized water, slowly dehydrated in ethanol solutions from 70% to 90%, and three times 100%, for 10 min each. After that, samples were dried with hexamethyldisilazane (HMDS) for 3 min in 100% HDMS (Alfa Aesar), samples were then transferred to a desiccator for 25 min. After drying, the samples were sputter-coated with gold-palladium.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Significant differences for the measurements between species were determined by using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The limit of significance was 5% and all analysis was performed using the RStudio 1.2.1335 Software.

Results

Rectal Gland

The outer layer of the gland is bounded by the peritoneum and its show as simple cuboidal with basal nuclei in *A. narinari* and *H. guttatus* (Figure 1 a-b) and simple pavement in *H. marianae* (Figure 1 c). Still in this epithelium, the presence of cells with acidophilic granules stained with Giemsa stain is common (box Figure 1c). Usually, in the anterior region of the gland connected with the intestine, there is a lymphoid tissue associated with the capsule, for the spotted eagle ray is abundant in comparison with the other species. The connective tissue of the capsule is thicker in *A. narinari* than in the other species. Between the secretory parenchyma and the capsule, a distinct layer of elongated cells and nuclei is seen (Figure 1d-e) this is the smooth muscle layer surrounding the secretory parenchyma of the rectal gland. This layer is PAS-positive stain (Figure 1e) and when stained with Gomori's trichrome (Figure 1d) the thin layer surrounds the gland tubular epithelium is visualized. The spotted eagle ray *A. narinari* showed thick muscle layer ($38.27 \pm 5.91 \mu\text{m}$) followed by *H. gutttaus* ($27.84 \pm 6.16 \mu\text{m}$) and *H. marianae* ($19.32 \pm 5.34 \mu\text{m}$), thickness varying significantly between species ($\chi^2 = 43.47$, $p < 0.000$).

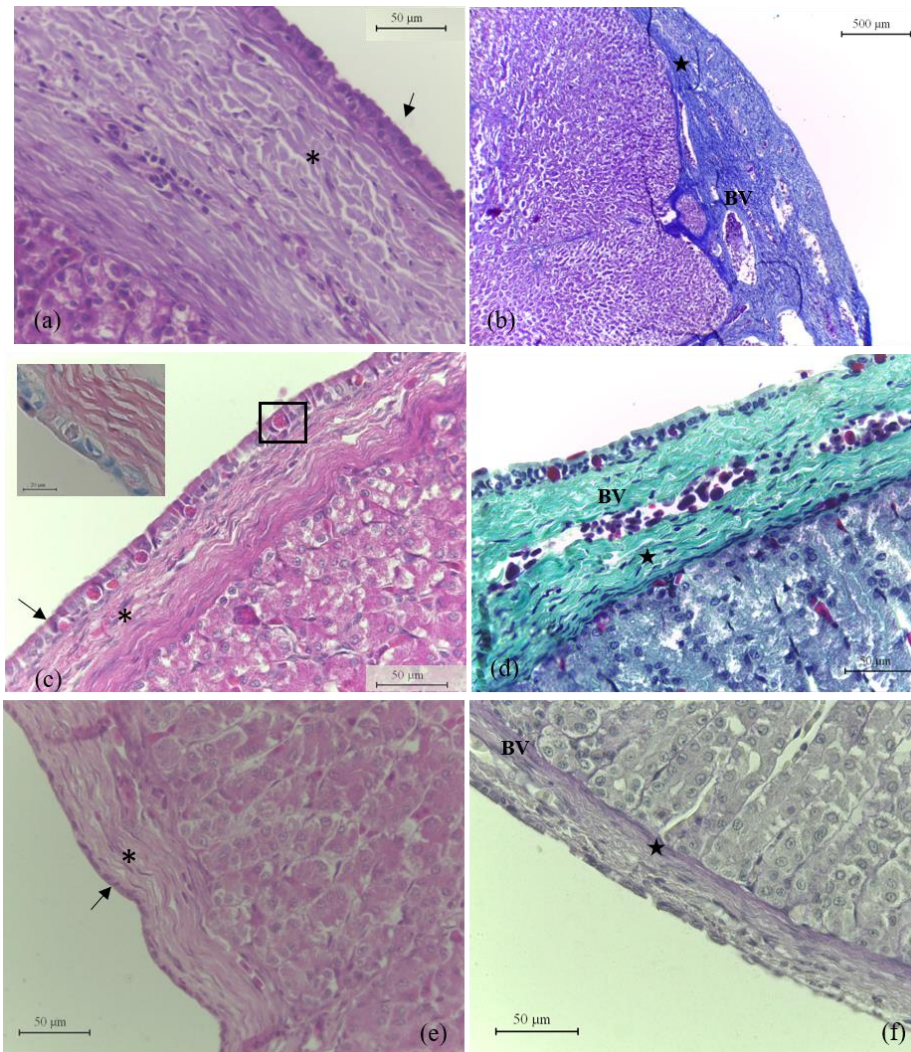


Figure 1. The rectal gland outlayer tissue of *Aetobatus narinari* (a-b), *Hypanus guttatus* (c-d) and *Hypanus marianae* (e-f). The thicker connective tissue of the capsule (asterisks) vary in between species and could be visualised in different stains. The presence of acidophilic cells in the peritoneum layer is observed only in *H. guttatus* (c-d), detailed in “c” shows the granules in these cells. Note the thin smooth muscle layer (star) under the connective tissue with elongate cells. And abundant blood vessels (BV) in the capsule of the organ. (a,c,d) stained with H&E; detailed in “c” is Giemsa stain; (b) Masson’s trichrome; (d) Gomory’s trichrome; (f) PAS.

All animals showed in the central lumen of the rectal gland, the PAS-positive stratified epithelium composed by four to seven cells with specific characteristics and is surrounded by irregular venous sinuses (Figure 2a). The first layer is in the surface and presents granular cells and nuclei polymorphs (Figure 2 b), which have granules on their border, further on the surface of the lumen. Also, in the surface is observed mucous cells (Figure 2b). The second layer, the intermediate cells could be observed in the intercellular space, some with many granules in their cytoplasm and others with an oval and central nucleus (Figure 2b). Below this layer, a group of basal cells lays on the basement membrane, has prominent nuclei and little cytoplasm (Figure 2b). The granular cells in the surface, mucous cells, and intermediated cells showed more PAS-positive affinity. In addition, these cells showed positive AB stain, strongly in *A. narinari* and *H. guttatus* (Figure 3a, d), but weakly for *H. marianae* which only cells in the stratified surface of the central lumen stained (figure 3g).

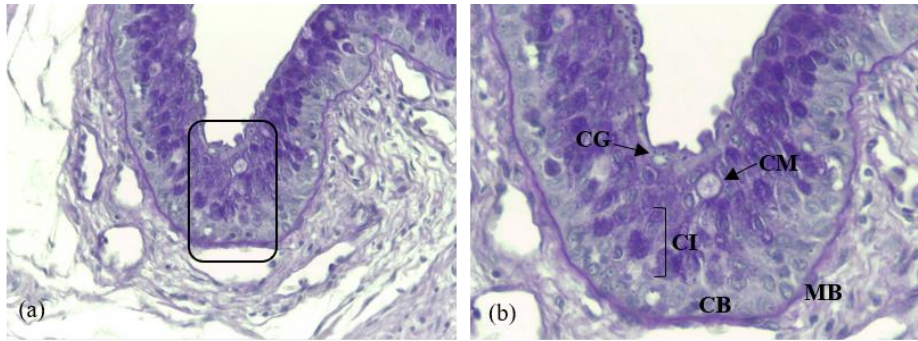


Figure 2. Composition of the stratified epithelium of the central lumen of stingrays. (a) cross-section of the epithelium showing cell specialization and distribution along the layer. (b) On the surface near the lumen, granular cells (GC) and their granules are shown, also mucous cells (MC) are present in this area. Right below, the intermediated cells (IC) and lining in the basement membrane (BM) the basal cells (BC). (a) 40x, (b) 100x, stained with PAS.

Few microvilli called filaments by Bulger (1963) are seen in the granular cell in the central lumen surface (Figure 3c, f, i), structures similar with filaments are seen in *Aetobatus narinari* (Figure 3c), but is not clear for *Hypanus* genus (Figure 3f,i). The stratified epithelium thickness of the central duct of *A. narinari* differ ($F = 6.90$, $p = 0.01$) to the *H. guttatus* and *H. marianae*. In the stratified epithelium of the central duct, acidophilic cells were common only for *Hypanus marianae* (Figure 3h) while the parenchyma cells did not show any affinity.

Kidney

The renal structure is organized in two distinct zones that extend from the lateral to the medial margins of the kidney (Figure 4), the peripheral zone which has in the parenchyma of all species glomeruli lie close to the border separating this zone to the medial zone. This peripheral zone is thinner in *Hypanus* genus (Figure 4b-c) and thick in *A. narinari* (Figure 4a) and show packed tubules that compound the bundle zone. A “proliferative zone” or germinal center (Elger et al., 2003) in the lateral margin of the lobes is observed (circle Figure 4a), this is a place of formed new glomeruli and tubules. From the cortical to the medial margin, in general, the renal corpuscle showed size varying from ovoid to elongated. The glomeruli in the medial margin was usually large than observed in the lateral margin. The diameter of the glomeruli changed significantly between species (ANOVA; $F = 26.01$, $p = 0.000$), the eagle ray *A. narinari* presented high diameters ($164.04 \pm 20.67 \mu\text{m}$) in comparison with *Hypanus guttatus* ($106.06 \pm 18.05 \mu\text{m}$) and *Hypanus marianae* ($81.37 \pm 17.55 \mu\text{m}$). The distal tubule in the juxtaglomerular apparatus (Lacy ad Reale, 1990) showed differences between species, cuboid high cells were characteristic of *A.*

narinari and cuboid smaller cells for the genus *Hypanus* (Figure 4f). All species showed a large basal nucleus, most of the chromatin is light staining or euchromatic with small areas darkly stained heterochromatin (Figure 4f).

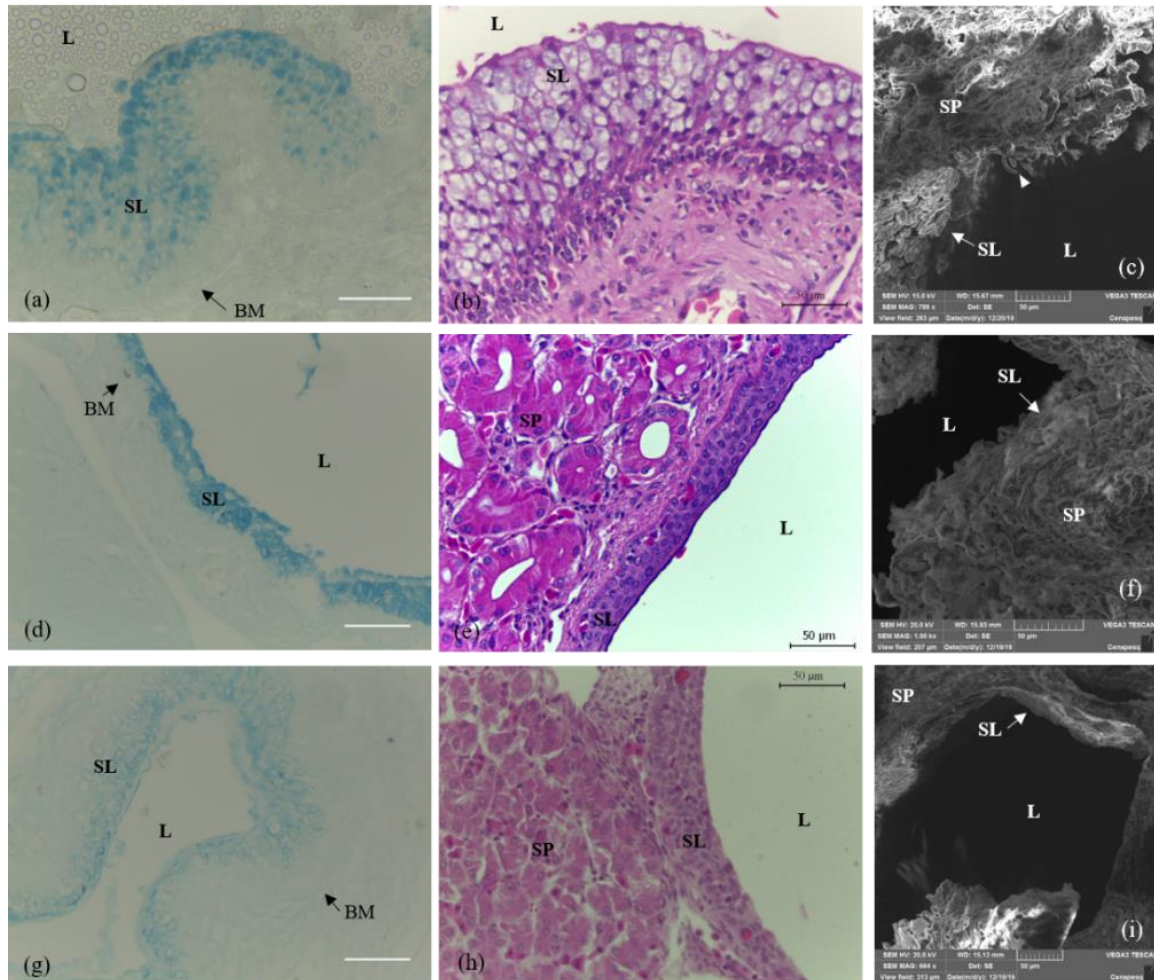


Figure 3. The stratified epithelium of the central lumen of *Aetobatus narinari* (a-c), *Hypanus guttatus* (d-f) and *Hypanus marianae* (g-i). High affinity with AB stain is observed in “a” and “d” when compared with “g”, also for the *A. narinari* the layer thickness is prominent (b) and shows some filaments in surface (arrowhead). (b,f,h). (c,f,i) Electron micrographs of the central lumen. H&E stained. SL stratified layer, SP secretory parenchyma, BM basal membrane, L lumen. Scale bars 50µm.

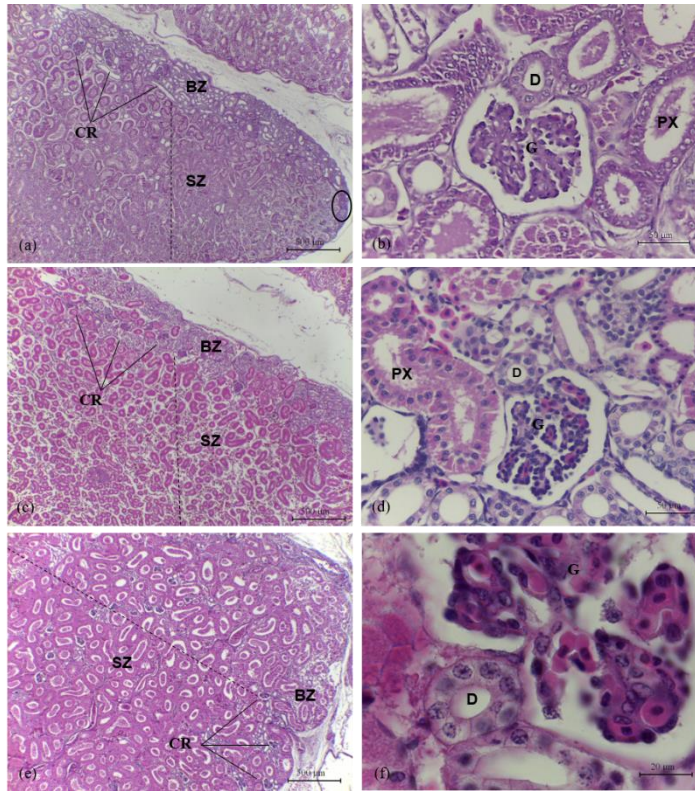


Figure 4. The kidney configuration of three Myliobatiformes stingray. The lobule is zoned by the bundle and sinus zone. In the cortical area of the parenchyma, the bundle zone of *Aetobatus narinari* (a) is large in comparison with species of *Hypanus guttatus* (c) and *Hypanus marinae* (e). The sinus zone occupying major part of the parenchyma and the area of each nephron segment, in special the intermediate one, shows differences between species. In “a” the circle represents the germinal zone in the lateral periphery of the lobule. The size of the renal corpuscle and its distribution delimiting the zones is shown. The variation in cuboid cells of the distal tubule that compound the juxtaglomerular apparatus is shown (b,d,f), notice the abundant euchromatin in the nuclei in “f”. SZ sinus zone, BZ bundle zone, CR corpuscle renal, Px proximal segment, D distal segment, G glomerule.

The complex renal tubule has distinctive segments from the renal corpuscle: neck, proximal, intermediate, distal and collecting duct segments. The neck segment is one of the shortest segments and it is between the Bowman's capsule and the proximal tubule, present only in the bundle zone. The cuboidal irregular epithelium with vast flagella has large nuclei and progressively changes to nonflagellar cells with smaller nuclei and more intracellular space in all species analyzed here. The brush border is the main characteristic of this bundle and sinus zone segment. The cylindric brush border cells with apical nuclei had no variation. The intermediate segment do not have brush border, a wide lumen and prismatic high cells with central nuclei and abundant granules in the cytoplasm, although in the intermediate segment of *Hypanus marianae* that showed shorter prismatic cells in comparison with other species, resulting in more lumen space and sparse distribution of the segment in the sinus zone (Figure 4 a, c, d). No significant variations were observed in the first portion of the distal segment between species, only in the juxtaglomerular portion, the cuboid cells showed large nucleus occupying the cytoplasm in *Hypanus* genus.

Gills

The lamellar epithelium shows the three typical cells (5d-e), the pavement cell in the outer surface, the non-differentiated epithelial cell underlining and the pillar cell which extend across the blood lumen and connect the respiratory epithelium on either side. The vascular “sac” (Figure 5a-c) is present in all regions of the filament and only one was observed per lamella, usually located in the outer marginal channel, also could be associated with mucous cells in each lamella (Figure 5b). The mucous cells are common in the interlamellar space, but in *H. marianae* they are rare in comparison with *H. guttatus*. Gills lamellae of *H. guttatus* (Figure 5a) are taller than *H. marianae* (Figure 5c), and cell proliferation is commonly observed in the apical surface of the lamellae (Figure 5b). One to two large cells with acidophilic cytoplasm, large and basal nuclei are commonly observed in the interlamellar space and in the filament (Figure 5d) of the gills, these cells have the same characteristic of the lamellar specialized epithelial cells the MRCs.

Discussion

Exposure to different environments result in an adaptation and potential act in osmoregulatory organs. The rectal gland is a specialized organ unique to elasmobranchs with the main function is salt excretion producing an about twice sodium chloride plasma concentrated fluid (Burger and Hess, 1960). The importance of this organ differs among the environment and habitat, Melo et al. (unpublish data) showed that the proportion of the rectal gland in relation with the body changes between benthic and semipelagic Myliobatiformes stingrays. Also, they suggested that differences observed between these animals could be related to the secretory function of the mesopelagic species associated with different conditions. Acidophilic cells granules present in the peritoneum epithelium are similar to type I granular cells found in the spiral intestinal epithelium of thornback ray (*Raja clavata*) (Dezfuli et al, 2019), the author suggested those cells are related with the first-line defense mechanisms of the ray's spiral intestine. Despite that, the presence of these granular cells in the stingray's rectal gland it is not clear. Thus, further studies with immunohistochemistry may elucidate the function of these cells in the rectal gland.

The physiological role of the stratified epithelium is unknown, even if this site functions entirely as a passive conduit or could alter the composition of the secreted fluid (Bulger, 1965). In fact, the abundant granule cells in this layer may be related to the secretory activity. The dogfish stratified epithelium decreased in size after feeding

consisted with an increased role in salt and fluid secretion (Matey et al., 2009) they do not specify which cell type suffered reduction, but if the gland activity increase as the stratified epithelium decreased in size, this condition answered Bulger (1965) first question about passive conduit. Meanwhile, further studies must be conducted to find what kind of condition (salinity changes, exercise, etc.) could explain morphological changes in this way.

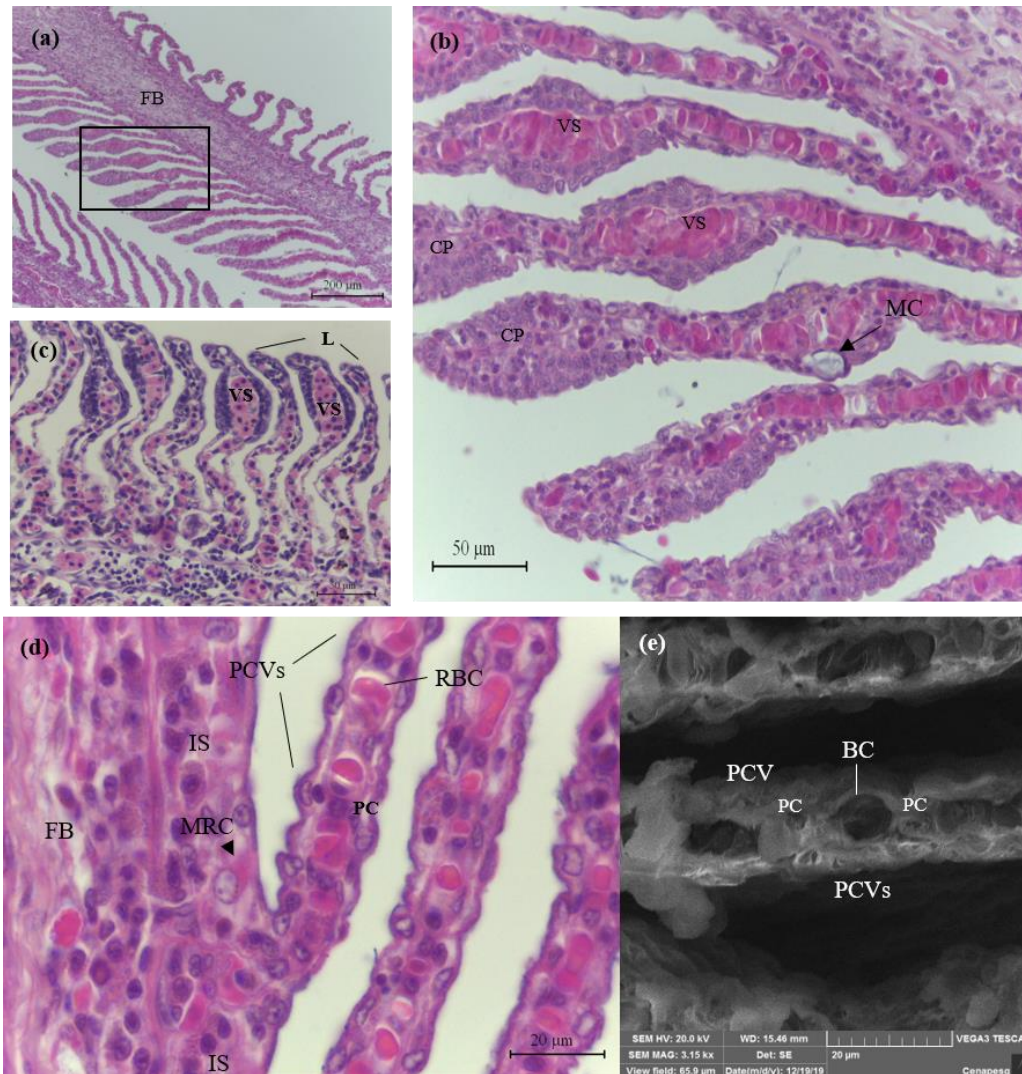


Figure 5. Photomicrography of the gill filament of Myliobatiformes stingrays. (a) longitudinal cross section of *Hypanus guttatus* and *Hypanus marinae* (c) showing differences in lamellar sizes. (b) magnified image of the box in (a) with lamellar vascular sacs (VS) filled with red blood cells and cellular proliferation (CP) in the apical surface of the lamellae. (d) Gill cellular composition, in the inner most layer the filament body with epithelial cells and blood vessels are visualized, between the lamellae the interlamellar (IS) space is compound by mitochondria rich cell and mucous cells (not shown). The lamellae have three types of cells the pavement cells (PVC), undifferentiated cells and pillar cells (PC). (e) Scanning electron micrography of a cross section through the lamella, showing the blood channel (BC) composed by pillar cells (PC) and the pavement cells (PVCs) overlaying the lamellar surface. RBC red blood cell. Stained with H&E.

Other changes could be observed in the smooth muscle layer of the rectal gland, in the present study *Aetobatus narinari* showed large layers in comparison with the other species, Piermarini and Evans (2001) demonstrated that the dogfish *Squalus acanthias* muscle layer respond to a suite of vasoactive signaling agents and suggest that the dimensions of the rectal gland can be altered by these. Furthermore, feeding or fasting could result in morphological changes as reported for the muscle layer thicker of dogfish and related with coordinated regulation of numerous proteins involved in energy metabolism and regulation of cytoskeletal or muscular activity (Matey et al., 2009). Variations observed in the present study could be related to the species physiological regulation to deal with environmental changes.

The present study is the first to analyze structural aspects of the complex kidney of *Aetobatus narinari*, *Hypanus guttatus* and *Hypanus marianae* kidney. Differences in anatomical renal corpuscle in relation to its position observed here, are large discuss in the elasmobranch group. Based on embryonic observations Kozlik's (1939), he suggests that the large corpuscles located in the medium zone are the oldest ones. The proximity of the small renal corpuscle with the "peripheral zone" called as germinal zone which is a forming area for newly glomeruli and renal tubules (Elger et al., 2003) showed morphological characteristic of this new corpuscle as a single afferent and efferent arteriole (Kozlik, 1939) which differ from the medial ones for the presence of multiple efferent arterioles (Lacy and Reale, 2018). Fact that demonstrating the distinct distribution of these structures in the renal parenchyma. Although these structures were not analyzed in the present, the germinal zone was constantly observed in the three Myliobatiformes stingrays, Elger et al. (2003) suggests that in this zone the renal regeneration happens to owe to undifferentiated cells residing in the mesenchyme of the lateral kidney zone and can provide signals that initiate cell division after stimulation nephrectomy in *Leucoraja erinacea*.

Renal corpuscle size in marine and freshwater elasmobranch fishes is extremely variable (Lacy and Reale, 1999). The glomeruli diameter variation between the three Myliobatiformes stingrays is an example of this. Besides the wide range sizes within one kidney (Lacy et al., 1987; Lacy and Reale, 2018) other facts may contribute like age, sex, body weight, surface areas (Nash, 1931). The average diameter of the glomeruli of the dusk smoothhound shark *Mustelus canis* is 185 μm and for the little skate *Raja erinacea* 190 μm , average sizes close to the value observed in the present study for *A. narinari* (164 μm), but quite far from *Hypanus* genus (100 μm and 64 μm). The reduced average diameter size of the glomeruli in *Hypanus marianae* is possibly related to the strict salinity range occurrence of this species that is associated with coral or sandstone reefs and its distribution present a positive relation with higher salinities values (36-37 PSU; see Costa et al., 2017). In high salinities, decreased

glomeruli size, as well as the mesangial tissue, was reported for teleost fish (Chenari et al., 2011; Ozaka et al., 2009). Conversely, elasmobranchs in freshwater environments have an increase in urine flow rate and glomerular filtration rate (Janech and Piermarini, 2002) by 20 to 50 folds (Evans et al., 2004). The turnover of the Na^+ and Cl^- is lower than in marine species owing to reabsorption by the kidney (Ballantyne and Fraser, 2012). The environmental condition is directly linked to osmoregulation and main determinates physiological adaptations in elasmobranch group.

The organization of the renal tubules is more complex than any vertebrate. Based in morphological features of its epithelial, the nephron is divided into numerous segments. In the present study, few variations were observed between species. In the specialized portion of the distal tubule in the juxtaglomerular apparatus, the cubic cells vary between the species and showed distinct appearance from the columnar higher cells observed in the distal duct of marine elasmobranchs and the river ray (Lacy and Reale, 1985; 2018). These variations may be related with specificities of the species since both types of cells have secreting functions. Abundant euchromatin light staining observed in the nuclei of the Myliobatiformes stingrays could be related with cell activity which comes from the abundant presence of mitochondria beyond the NKA signal strong stained with NKA antibody in this segment (Hyodo et al., 2014).

The intermediate segment is the longest segment in all marine species, and it is considered as a “dilute segment” in the spiny dogfish, in the other hand in freshwater species is signals of is comparatively short (Lacy and Reale, 1999). As described for the marine species, the Myliobatiformes stingrays analyzed showed a long intermediate segment and columnar epithelial cells range from high and small height with multiples granules. These variations were suggested to be some species-specific characteristics in this segment. For the dogfish *Squalus acanthias*, the first subdivision is thin, with a wide lumen and cuboidal cells which no intracellular granules, while in the little skate the same portion has irregular epithelium varying from columnar to squamous and contain numerous granules (Lacy and Reale 1985, 1990). The dilute function could change in the various segments of the intermediate segment due to the occurrence of sodium chloride re-absorption (Friedman and Hebert, 1990). Furthermore, the presence of the immunoreactive aquaporin type AQP4 (Cutler et al., 2012) questioned previous affirmation about low water permeability in this segment (Friedman and Hebert, 1990), the presence of AQP4, in this case, maybe involved with cell volume regulation in this segment (Cutler et al., 2012). The differences in tubular epithelial structure among elasmobranchs and other groups suggest that the nephron of marine cartilaginous fishes is highly

specialized and carries out a greater diversity functions (Lacy and Reale, 1990, 1991), so even more detailed analysis must be done to identify wide range variations between species.

The fact that marine elasmobranch is slightly hyperosmotic, ion transport at the gills is of limited importance and the needed to excrete NaCl is thus substantially reduced and handled by the rectal gland (Ballantyne and Fraser, 2012). Few variations observed in the present study are closely related to gills functions in seawater. The epithelial proliferation and the vascular sac (described by Wegner et al, 2010) near the water-entry edge of the lamellae observed here and positive correlation of their abundance with lamellar size (see Wegner, 2015) suggests a function in ensuring lamellar stability and spacing (De Vries and De Jager, 1984; Wegner et al., 2010). Wegner et al (2010) suggests one to two vascular sacs for shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) and blue shark (*Prionace glauca*) that function as vascular spaces subject to vasoactive agents and alterations in cardiac output and branchial perfusion. Only one vascular sac was observed in *Hypanus* genus, since they are benthic species the oxygen demand is low in comparison with the sharks mentioned before and probably have high levels of aerobic performance as mesopelagic species than stingrays. It is well known that active fishes typically have larger gill surface areas and shorter distances than non-active ones. In the present study, only overall characteristics of the lamella was observed, *Hypanus guttatus* showed taller lamella size in comparison with *H. marianae* this could be used in further studies to investigate differences in oxygen demand between benthic species, mainly because the *H. guttatus* is able to move from marine coastal areas to estuarine and dilute areas and require rapidly increase or decrease of salt excretion in different environmental.

The mucous cells are found throughout the gill epithelium, specifically high concentrated on both the leading and trailing edges of the filament, in the interlamellar space and lamellar surface. These cells could vary in different environmental conditions (Laurent, 1984) like changes in salinity. It tends to be a reduction in the number of mucous cells in seawater versus freshwater fishes, and they might control the loss of ions or the water influx (Laurent, 1984; Wilson and Laurent, 2002). In this way, more presence of mucous cells in *Hypanus guttatus* may be related with the range variations in abiotic factors when this species transits between seawater and dilute environments, especially in estuarine areas which organic suspended materials, domestic waste and other kinds of pollutant come from the river. Also, the mucus on the gills surface has been considered an important protection against abrasive injuries, pathogens, parasites and pollutant (see Moron et al., 2009).

The large size cells observed only in the interlamellar space of *Hypnus* stingray have the same characteristics of the Mitochondria rich cell, which is abundant in the interlamellar filament epithelium (Wilson and Laurent, 2002; Wegner, 2015). The gill MRC distribution differs from other fishes, Wegner et al. (2010) observed for the shortfin mako the absence of MRC in the lamellar epithelium, but it is common in the lamellar epithelium of the blue shark. For the dogfish, the number of MRC present in the interlamellar space was no significant difference between sham and rectal glandless animals, this fact that demonstrates that the branchial MRCs of this cartilaginous fish do not appear responsive to and osmoregulatory challenge (Wilson et al., 2002). Further immunohistochemical study must elucidate the distribution or abundance mechanisms of MRC in *Hypanus* stingray and the relationship between animals in different environments.

References

- Ballantyne JS, Fraser DI Euryhaline elasmobranchs (2012) In McCormick SD, Farrell AP, Brauner CJ (eds.) Fish Physiology, v.32, New York: Elsevier, pp 1–44.
- Ballantyne JS, Robinson JW (2010) Freshwater elasmobranchs: a review of their physiology and biochemistry. Journal of Comparative Biology, 180:475-493.
- Bulger RE (1965) Electron microscopy of the stratified epithelium lining the excretory canal of the dogfish rectal gland. The Anatomical Record, 151:589-607.
- Burger JW, Hess WN (1960) Function of the rectal gland in the spiny dogfish. Science, 131:670-671.
- Chenari F, Morovvati H, Ghazilou A, Savari A, Ronagh MT (2011) Rapid variation in kidney histology in spotted scat *Scatophagus argus* on exposed to abrupt salinity changes. Iranian journal of veterinary research 12:256-261.
- Costa TLA, Penino M, Mendes LF (2017) Identifying ecological barriers in marine environment: The case study of *Dasyatis marianae*. Marine environmental research 125:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.12.005>
- Cramp, R. L., Hansen, M. J., & Franklin, C. E. (2015). Osmoregulation by juvenile brown-banded bamboo sharks, *Chiloscyllium punctatum*, in hypo-and hyper-saline waters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 185:107-114.
- Cutler CP, Harmon S, Walsh J, Burch K (2012) Characterization of aquaporin 4 protein expression and localization in tissues of the dogfish (*Squalus acanthias*). Front Physiol, 3: 21.
- De Vries R, De Jager S (1984) The gill in the spiny dogfish. *Squalus acanthias*: Respiratory and nonrespiratory function. Am J Anat 169:1–29.
- Dezfuli SB, Manera M, Bosi G, Merella P, DePasquale JA, Giari L (2019) Description of epithelial granular cell in catshark spiral intestine: Immunohistochemistry and ultrastructure. Journal of morphology, 280: 205-213.
- Elger M, Hentschel H, Litteral J, Wellner M, Kirsch T, Luft FC, Haller H (2003) Nephrogenesis is induced by partial nephrectomy in the elasmobranch *Leucoraja erinacea*. J Am Soc Nephrol 14:1506–1518

- Piermarini PM, Evans DH (2001) Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of Experimental Biology*, 204:3251-3259.
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2004) Homeostasis: osmoregulation, pH regulation, and nitrogen excretion. In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (eds), *Biology of Sharks and their Relatives*. Crc Press, pp 254-275.
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85:97-177.
- Friedman PA, Hebert SC (1990) Diluting segment in kidney of dogfish shark. I. Localization and characterization of chloride ab-sorption. *Am. J. Physiol.*, 258:398-408.
- Grant MI, Kyne PM, Simpfendorfer CA, White WT, Chin A (2019) Categorising use patterns of non-marine environments by elasmobranchs and a review of their extinction risk. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1-22.
- Hammerschlag N (2006) Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39:209-228.
- Hazon N, Wells A, Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Franlin CE (2003) Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136:685-700.
- Hughes GM, Perry SF, Piper J (1986) Morphometry of the gills of the elasmobranch *Scyliorhinus stellaris* in relation to body size. *Journal of Experimental Biology*, 121:27-42.
- Hyodo S, Kakumura K, Takagi W, Hasegawa K, Yamaguchi Y (2014) Morphological and functional characteristics of the kidney of cartilaginous fishes: with special reference to urea reabsorption. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307:1381-1395.
- Janech MG, Piermarini PM (2002) Renal water and solute excretion in the Atlantic stingray in freshwater. *J. Fish Biol.* 61:1053–1057.
- Kozlik F (1939) Über den Bau des Nierenkana“lchens. Vergleichendanatomische Untersuchungen. I. Mitteilung: Zum Bauplan des Nierenkana“lchens der Selachier. *Z Anat Entwicklungsgeschichte* 109:624–648.
- Lacy ER, Reale E (1990) The presence of a juxtaglomerular apparatus in elasmobranch fish. *Anat Embryol* 182:249–262.
- Lacy ER, Reale E (1991) Fine structure of the elasmobranch renal tubule: neck and proximal segments of the little Skate. *The American Journal of Anatomy*, 190:118-132.
- Lacy ER, Reale E (1999) Urinary system. In: Hamlet WC (ed) *Sharks skates and rays: biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, Maryland, pp 353–397.
- Lacy ER, Reale E (1985) The elasmobranch kidney II. Sequence and structure of the nephrons. *Anat. Embryol.*, 173:163-186.
- Lacy ER, Reale E (2018) A unique juxtaglomerular apparatus in the river ray, *Potamotrygon humerosa*, a freshwater stingray. *Zoomorphology*, 137:155-164.
- Lacy ER, Castellucci M, Reale E (1987) The elasmobranch renal corpuscle: fine structure of Bowman's capsule and the glomerular capillary wall. *Anat Rec* 218:294–305
- Laurent P (1984) Gill Internal Morphology. In *Fish physiology Vol. 10*. Academic Press, pp. 73-183.

- Martin RA (2005) Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs. *Journal of the Marine Biology Association United Kingdom*, 85:1049–1073.
- Matey V, Wood CM, Dowd WW, Kultz D, Walsh PJ (2009) Morphology of the rectal gland of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) shark in response to feeding. *Can. J. Zool.*, 87:440–452
- Moron SE, Andrade CA, Fernandes MN (2009) Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerhynchus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology*, 7:491–498.
- Nash J (1931) The number and size of glomeruli in the kidneys of fishes with observations on the morphology. *Am J Anat*, 47: 425–445.
- Olson KR (1999) Rectal gland and volume homeostasis. In: Hamlett WC (ed.), *Sharks, skates, and rays*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md, pp. 339–352.
- Ozaka C; Yamamoto N, Somiya H (2009) The aglomerular kidney of the deep-sea fish, *Ateleopus japonicus* (Ateleopodiformes: Ateleopodidae): evidence of wider occurrence of the aglomerular condition in Teleostei. *Copeia*, 2009:609–617.
- Piermarini PM, Evans DH (2000) Effects of environmental salinity on Na⁺/K⁺-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology*, 203:2957–2966.
- Pillans RD, Franklin CE (2004) Plasma osmolyte concentrations of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 138:363–371
- Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Hazon N, Franklin CE (2005) Freshwater to seawater acclimation of juvenile bull sharks (*Carcharhinus leucas*): plasma osmolytes and Na⁺/K⁺-ATPase activity in gill, rectal gland, kidney and intestine. *Journal of Comparative Physiology B*, 175:37–44.
- Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Hazon N, Franklin CE (2008). Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology*, 72:1559–1571.
- Riordan JR, Forbush B., Hanrahan JW (1994) The molecular basis of chloride transport in shark rectal gland. *Journal of Experimental Biology*, 196:405–418.
- Smith HW (1931) The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes I. Freshwater elasmobranchs. *American Journal Physiology*, 98:279–295.
- Wegner NC, Sepulveda CA, Olson KR, Hyndman KA, Graham JB (2010) Functional morphology of the gills of the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, a lamnid shark. *Journal of morphology*, 271:937–948.
- Wegner NC (2015) Elasmobranch gill structure. In: *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 101–151.
- Wilson JM, Laurent P (2002a) Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293:192–213.
- Wilson JM, Morgan JD, Vogl AW, Randall DJ (2002b) Branchial mitochondria-rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132:365–374.
- Wosnick N, Freire CA (2013) Some euryhalinity may be more common than expected in marine elasmobranchs: The example of the South American skate *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii, Rajiformes, Rhinobatidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166:36–43.

CAPÍTULO IV: Artigo III

Short communication a ser submetida a revista Environmental Biology of Fishes

Morfologia comparada da glândula retal da raia eurialina *Hypanus guttatus* (Chondrichthyes: Dasyatidae) capturada em ambiente marinho e estuarino

Melo¹, A.C.M.; Andrade², C.B.; Rêgo², M.G.; Araújo³, M.L.G., Evêncio Neto, J^{1,2}.

Autor para correspondência: Andressa Melo, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

andressa_cmm@hotmail.com

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil.

Funding information: A.C.M.M. was funded by a PhD grant from Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia (FACEPE) and Programa de Doutorado Sanduíche/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE-CAPES), A.C.B. by Programa de Iniciação Científica – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq), R.M.G. Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) CAPES.

Resumo

A morfologia da glândula retal foi utilizada para analisar as alterações na estrutura tecidual de raia eurialina que conhecida por usar áreas de estuário e marinhas, a raia manteiga *Hypanus guttatus*. Macroscopicamente, não foram observadas alterações significativas na glândula nos habitats estuarinos e marinhas. No entanto, microscopicamente *Hypanus guttatus* estuarina mostrou cápsula mais espessa, espesso parênquima secretório e células mucosas abundantes na camada central do lúmen. Essas variações podem estar relacionadas ao nível de atividade da glândula retal em diferentes ambientes. Quando o *H. guttatus* entra no estuário, provavelmente as atividades celulares reduzem gerando um processo de “quiescência”, resultando parênquima secretório que ocupa cerca de 49% da glândula, enquanto nas áreas marinhas apenas 36%. O maior número de células mucosas no epitélio estratificado do ducto central em animais estuarinos pode ser um mecanismo para impedir o influxo de água e a perda de íons nesses ambientes diluídos, sendo um papel importante para manter a homeostase desses animais nesses ambientes.

Palavras-chave: glândula de sal, salinidade, ambiente, comparação, histologia, Dasyatidae

Abstract

Rectal gland morphology was used to analyze tissue variations in euryhaline stingray that is known to use estuary areas and marine areas, the longnose stingray *Hypanus guttatus*. Macroscopically no significant changes were observed in the gland in estuarine and marine habitats. However, *Hypanus guttatus* in estuary areas showed thicker capsule, large secretory parenchyma and abundant mucous cells in the central lumen layer. These variations could be related to the activity level of the rectal gland in different environments. When *H. guttatus* enter the estuarine, the low cell activities could result in the quiescence process resulting in secretory parenchyma occupy around 49% of the gland, while in marine areas only 36%. The greater number of mucous cells in the stratified epithelium of the central duct in estuarine animals could be a mechanism to prevent the water influx and loss of ions in these diluted environments, it is an important role to maintaining homeostasis of these animals in these environments.

Keywords: salt gland, salinity, environment, comparison, histology, Dasyatidae

Introdução

Cerca de 15% das espécies de elasmobrânquios são eurialinas (Wosnick & Freire, 2013). A habilidade de ocupar ambientes com diferentes salinidades não é comum nos elasmobrânquios (Ballatyne & Fraser, 2013). De acordo com Grant et al (2019), a maioria das espécies eurialinas de elasmobrânquios são da ordem Myliobatiformes tropicais da família Dasyatidae. Anderson et al. (2007) sugere que a capacidade efetiva de osmorregular em diferentes ambientes ou salinidade é reflexo de diferenças espécie-específica e provavelmente resultante dos nichos ecológicos desses animais. No ambiente marinho, as concentrações plasmáticas de alguns íons são baixas se comparadas à água doce, facilitando um leve fluxo osmótico de água e um grande influxo no gradiente disfuncional Na^+ e Cl^- para dentro do animal (Smith 1931; Olson 1999; Pillans e Franklin 2004). O balanço iônico é realizado através da glândula retal, sendo este órgão responsável pela secreção de Cloreto de Sódio (NaCl) numa concentração cerca de duas vezes maior que o plasma sanguíneo e ligeiramente maior que a água do mar (Burger and Hess 1960).

A glândula retal é um órgão de estrutura composta que consiste em milhares de túbulos simples e ramificados que drenam o produto da secreção para um canal central (Newbound e O'Shea 2001). É descrita como um órgão altamente vascularizado, apresenta uma única artéria, originada da aorta dorsal, a artéria mesentérica posterior que supre a glândula e composta por três camadas concêntricas de tecidos que circundam um ducto central ou lúmen: uma cápsula externa, um parênquima secretório mediano e uma camada interna de epitélio transicional. A cápsula é coberta pelo peritônio visceral, e é composta de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos como as artérias circunferências e fibras nervosas, e uma camada interna de músculo liso (Bulger 1963; Olson 1999).

Apesar do vasto conhecimento acerca da glândula retal dos elasmobrânquios, pouco se conhece sobre a morfologia e estrutura tecidual desse órgão em raias costeiras tropicais da América do Sul (Melo, 2016). Esses animais junto com a espécie de tubarão *Carchahirrus leucas* compõem as poucas espécies capazes de viver tanto em água doce como salgada por longo período de tempo e são capazes de osmorregular nos dois ambientes (Thorson e Brook 1983; Piermarini e Evans 2000; Pillans e Franklin 2004; Pillans et al. 2005, 2006). Tendo em vista as poucas informações sobre as raias Mylibatiformes, o objetivo do presente trabalho foi comparar a morfologia da glândula retal de *Hypanus guttatus* (Bloch e Schneider, 1801) capturada tanto em água salgada quanto em estuário, utilizando microscopia de luz e análises quantitativas entre os grupos para um melhor entendimento da função da glândula retal nesses animais.

Materiais e Métodos

O projeto foi executado com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO, SISBIO- número 55756-1 e o procedimento amostral em acordo com os princípios do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – F15, número da licença 133/2017.

Área de coleta e animais

As amostras foram obtidas da pesca artesanal com raieira no litoral norte do estado de Pernambuco, no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2018. Os animais foram coletados na região estuarina do Canal de Santa Cruz (Itapissuma e Barra de Catuãma) e na plataforma continental entre a Ilha de Itmaracá e Ponta de Pedrs, no município de Gioana (Figura 1). O Canal de Santa Cruz, é um complexo estuarino formado por seis rios que desembocam em um canal em formato de U, que separa a Ilha de Itamaracá do continente (Medeiros e Kjerfve, 1993). (Figura 1). O canal se comunica com o Oceano Atlântico através de duas entradas: ao norte entrada de Catuama e ao sul a entrada do Forte Orange (Macedo e Koenig 1987). A salinidade média varia de $24,8 \pm 4,6$

no período chuvoso a $30,9 \pm 2,1$ no período seco (Araújo et al, 2011). A plataforma continental é estreita, e a salinidade apresenta pouca variação sazonal com média de $37,0 \pm 0,3$ psu, com valores de 37,1 e 36,7 psu, no período chuvoso e seco, respectivamente, sendo mais influenciada pela interação entre plataforma e oceano adjacente, do que pela descarga fluvial (Domingues et al., 2017).

A arraia bicuda *Hypanus guttatus* é uma raia bentônica Myliobatiformes, com distribuição do sul do Golfo do México e das Índias Ocidentais ao sul do Brasil, com ocorrência em águas costeiras até profundidades inferiores a 36 m da plataforma continental (Bigelow e Schroeder 1953; Cervigón 1966; McEachran e Carvalho 2002) e áreas salobras/estuário (Thorson 1983). *H. guttatus* é um predador generalista (Gianeti et al. 2019), que ocupa áreas de fundo lamacento do ambiente marinho nas fases iniciais do ciclo de vida (Yokota e Lessa 2006; Melo 2016).

Os espécimens foram identificados no texto de acordo com o ambiente (espécie ambiente) em que foram capturados como: *Hypanus guttatus* estuário e *Hypanus guttatus* marinho. Um total de 24 animais foram amostrados nos desembarques (*H. guttatus* estuário, n = 10; e *H. guttatus* marinho, n = 14). De todos os indivíduos foram registradas as larguras do disco (LD, cm) e o comprimento da glândula retal (CGR, cm). A glândula retal foi coletada imediatamente após o desembarque e fixada em solução de formol a 10% com água do mar.

Histologia e Histoquímica

Para análise da glândula retal, foram realizados cortes transversais na região mediana da glândula retal de 5 animais de cada ambiente amostrado (n = 10). Os cortes foram processados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em álcool butílico, impregnados e embebidos em paraplast. Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo (RM2125RT da Leica®) em séries de 5 μ m, montados e corados com Hematoxilina e Eosina, tricrômico de Gomori, azul alciano (pH 2,5) e ácido periódico-Schiff (PAS). A análise da estrutura geral dos componentes teciduais do órgão foi visualizada e fotografada utilizando câmera HD acoplada e programa de imagem SigmaScan Pro 5.0.

Morfometria

O corte transversal da glândula retal foi observado na objetiva de 10x. Para leitura das lâminas cinco campos distintos foram medidos de forma aleatória e as variáveis diâmetro da glândula, a espessura da cápsula (com o peritônio), espessura do parênquima secretório (mm), espessura do epitélio de transição (mm) e número de camadas de células deste epitélio foram obtidas. Todas as medidas morfométricas foram feitas utilizando o Software de análise de imagem ImageJ 1.49v (domínio público).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilks, para distribuição normal. As variáveis morfométricas estão expressas em média $\pm$ desv.pad. As médias das variáveis por ambiente foram comparadas utilizando teste T de student ao nível de significância de $p < 0,05$. Para distribuição não normal, as médias foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney nível de significância $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o Software RStudio 1.2.1335 (domínio público).

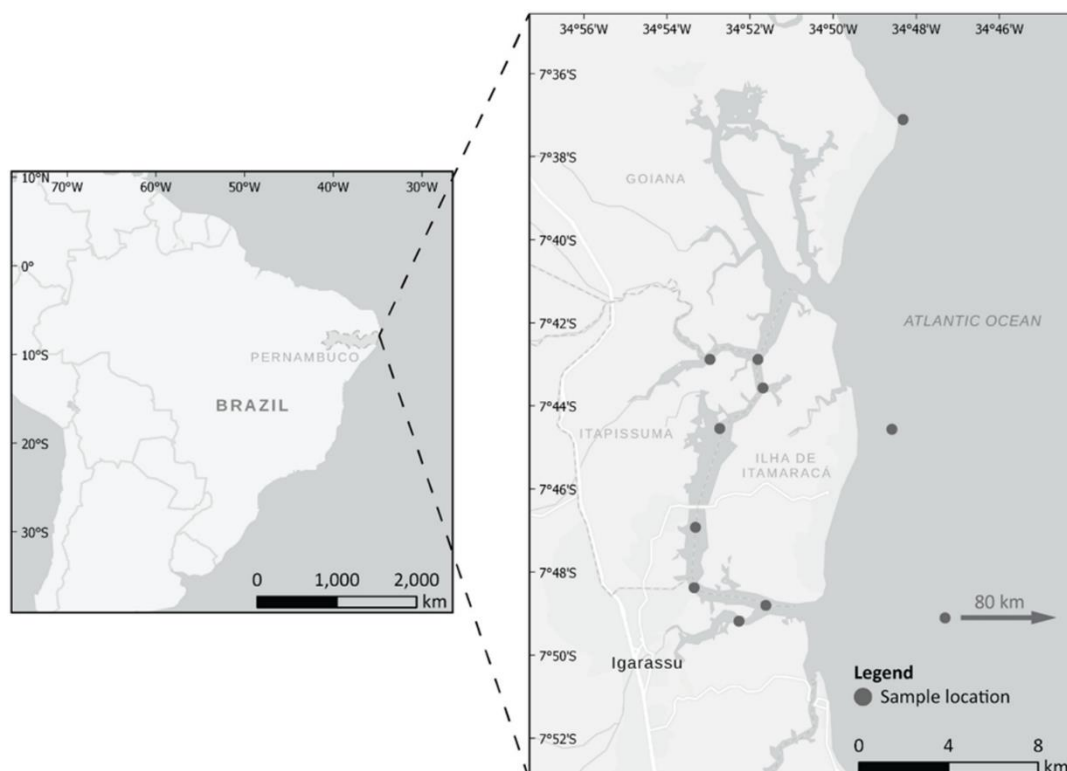


Fig. 1 Pontos de coleta na zona estuarina e costeira marinha do litoral norte de Pernambuco, Brasil

Resultados

A glândula retal das raia *H. guttatus* está suspensa no mesentério dorsal, localizada no lado direito da superfície dorsal do intestino, anexada a região pós-valvular. É um órgão pequeno e alongado, de formato fusiforme e lobulado. As larguras de disco não apresentaram diferenças significativas ($W = 82$, $p = 0,71$), assim como o CGR ($t = -0,85$, $df = 23$, $p = 0,79$), *H. guttatus* estuário ($LD = 53,02 \pm 11,55$ cm; $2,07 \pm 0,39$ cm) apesar do CGR apresentar valores médios ligeiramente menores que *H. guttatus* marinho ($LD = 52,38 \pm 6,96$ cm; $2,15 \pm 0,46$). Em corte transversal, o diâmetro da glândula retal não apresentou variação significativa nos diferentes ambientes ($t = -0,09$, $df = 17,20$, $p = 0,53$).

A glândula retal vista em secção transversal, consiste em três camadas concêntricas: a cápsula, o parênquima secretório e o ducto central (Figura 2-b). A cápsula é constituída por uma camada mais externa de epitélio de revestimento, uma camada de tecido conjuntivo e um tecido muscular liso. No parênquima secretório observam-se a área intersticial que é composta por vasos sanguíneos e tecido conjuntivo, e os túbulos secretórios, que se ramificam na região central da glândula, na periferia do ducto central. O parênquima é dividido em lóbulos, que se dispõem em torno do ducto central. Os lóbulos são separados por septos interlobulares, constituídos do tecido conjuntivo e tecido muscular invaginados da cápsula em direção ao interior da glândula. Os túbulos secretores de cada lóbulo, drenam para os ductos interlobulares que se irradiam a partir do ducto central, uma secreção rica em NaCl, para o ducto central, que tem um lúmen revestido por epitélio estratificado (Figura 2 a-b).

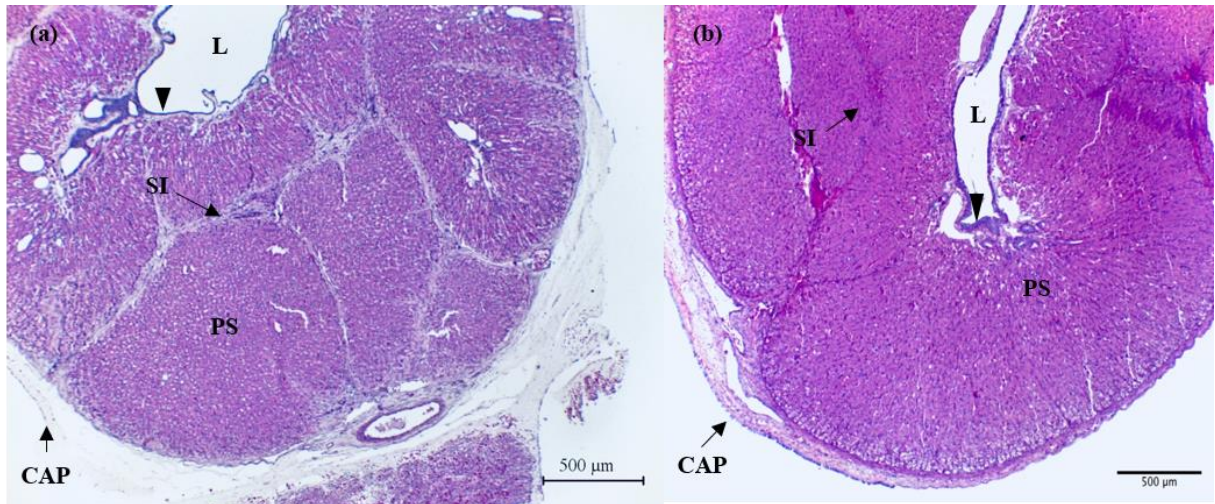


Fig. 2 Fotomicrografia da composição da glândula retal de *Hypanus guttatus* marinho (a) e *Hypanus guttatus* estuário (b). (a,b) O parênquima secretório (PS) é dividido por septos interlobulares (SI) compostos de tecido conjuntivo delimitado pelo epitélio estratificado (▼) no ducto central conectado ao lúmen (L). Coloração Hematoxilina e Eosina. CAP: cápsula.

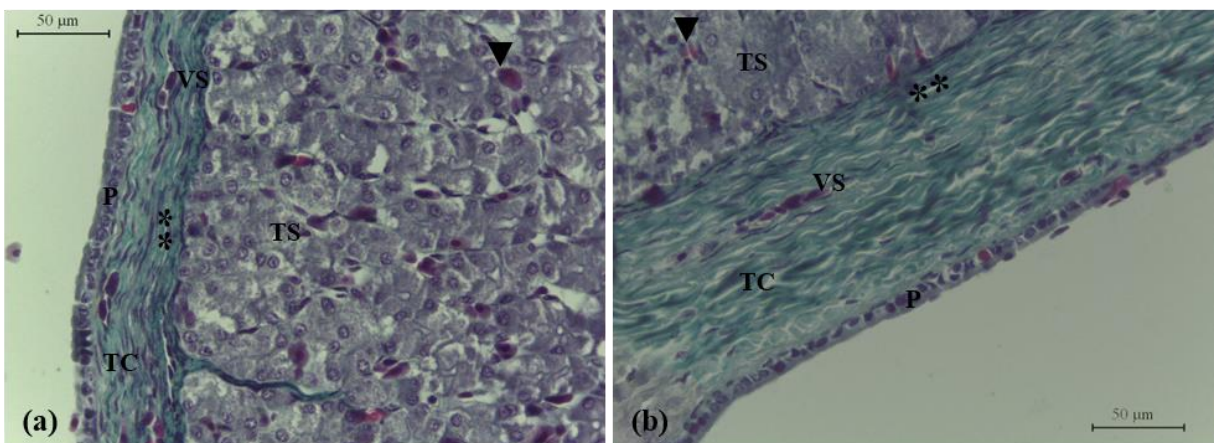


Fig. 3 Fotomicrografia da glândula retal de *Hypanus guttatus* marinho (a) e estuarina (b). (a,b) Cápsula (CAP) composta externamente pelo peritônio (P), tecido conjuntivo denso não modelado (TC), camada muscular (**), vasos sanguíneos (VS); internamente, na parênquima secretor, os túbulos secretores (TS) e vários capilares (▼) são observados. Coloração de Tricrômico de Gomori.

Desde a região mais externa até camada mais interna da glândula foi observada grande vascularização no tecido conjuntivo que envolve o órgão, as veias e artérias são evidentes (Figura 2a-b). As porções interlobulares são bem vascularizadas e no espaço intersticial diversos capilares estão presentes. Na periferia do ducto central, o seio venoso é evidente (Figura 2a-b). A camada de tecido conjuntivo denso não modelado e músculo liso (Figura 3 a-b) da cápsula apresenta espessura variada sendo mais espessa nas raias *Hypanus guttatus* estuário ($0,107 \pm 0,036$ mm) quando comparada aos animais marinhos ($0,064 \pm 0,01$ mm) (Mann-Witney; $W = 298$, $p = 0.023$). A cápsula representa cerca de 3,68% a 2,09% da glândula retal no ambiente estuarino e marinho, respectivamente (Tabela1).

Tabela 1. Morfometria da glândula retal da raia *Hypanus guttatus* capturada em ambientes estuarino e marinho.

Espécie/ ambiente	Cápsula (espessura, mm)	Parênquima secretor						Espessura do epitélio estratificado (mm)	No. camadas de células do epitélio estratificado
		Túbulos pequenos		Túbulos médios		Túbulos grandes			
		Diâmento (mm)	Lúmen (mm)	Diâmento (mm)	Lúmen (mm)	Diâmetro (mm)	Lúmen (mm)		
<i>H.guttatus</i> estuarino	0.061±0.013a	0.038±0.005a	0.011±0.006a	0.054±0.006a	0.043±0.010a	0.115±0.018a	0.083±0.010a	0.04±0.024a	4.66±1.154a
<i>H.guttatus</i> marinho	0.042±0.015b	0.037±0.020a	0.014±0.009a	0.077±0.010a	0.044±0.009a	0.105±0.022a	0.073±0.012a	0.045±0.01b	5.33±0.516a

Valores estão expressos como média ± desvio padrão (n =5). As letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05).

Os túbulos secretores consistem de quatro a dez células secretórias homogêneas cúbicas/columnares com núcleos proeminentes e basais, dispostas em volta do lúmen do túbulo. O parênquima secretor das raia oriundas da região estuarina representa 49,35% da glândula retal, enquanto em ambiente marinha constitui 36,36%. A presença de vacúolos nas células tubulares foram visualizados nas glândulas retais dos animais oriundos de ambos ambientes, mas foram mais representativos nos indivíduos do ambiente marinho (Figura 4 a-b). As células dos túbulos secretores de animais estuarinos apresentaram citoplasma denso, células cúbicas mais altas e lúmen reduzido, túbulos justapostos e pouco tecido conjuntivo ocupando o espaço extracelular (Figura 4 a). Nos animais marinhos, apesar de não ter sido observadas diferenças significativas no diâmetro e lúmen dos túbulos, a aparência das células secretoras se apresenta de maneira oposta ao observado para os animais estuarinos (tabela 1).

O epitélio estratificado do lúmen do ducto central foi composto de 3 a 6 células, não diferindo significativamente (Tabela 1) entre os ambientes, essa camada apresenta específicas e é cercada por irregulares seios venosos. Na superfície, são observadas células granulares com grânulos na porção apical, núcleos polimorfos e presença de células mucosas. As células intermediárias são observadas no espaço intercelular, algumas com grande quantidade de grânulos em seus citoplasmas e outras com núcleo oval e centralizado. Abaixo dessa camada um grupo de células basais é observado sobre membrana basal e apresentam núcleos proeminentes e pouco citoplasma. A presença de células acidófilas foi observada em animais proveniente de ambiente estuarino. A ocorrência de células mucosas no epitélio do lúmen central dos animais estuarinos, ocorreu da região anterior a posterior, e nos animais marinhos elas se restringiram a região anterior e mediana da glândula (Figura 5 c-d). A secreção das células glandulares apresentou reatividade para AB 2,5% e PAS, as células mucosas apresentaram baixa reatividade ao PAS e AB 2,5%, o que indica secreção de mucinas ácidas e neutras.

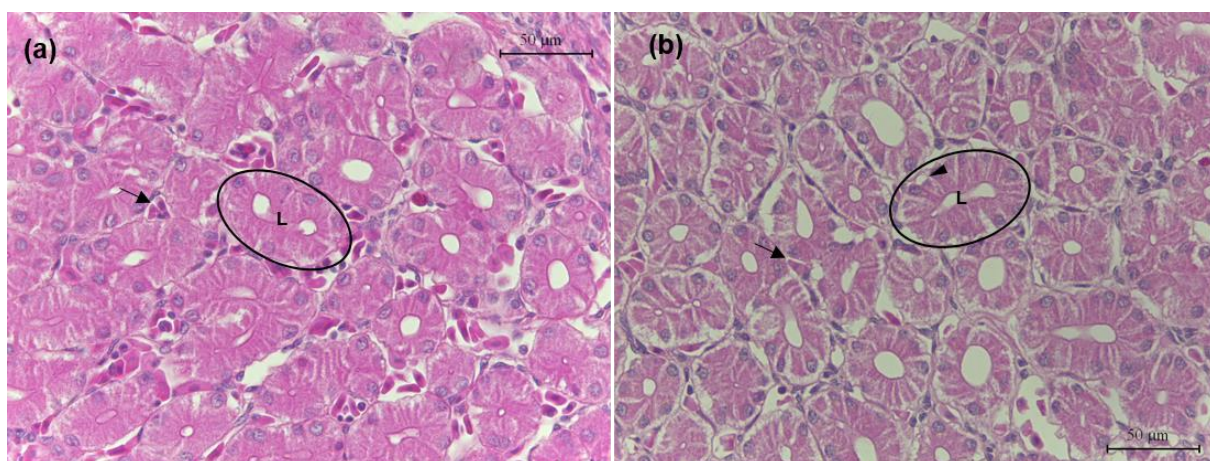


Fig. 4 Túbulos secretores do parênquima da glândula retal de *Hypanus guttatus*. (a) ambiente estuarino e (b) ambiente marinho, células secretoras eosinófilas do túbulo secretor (círculo), lúmen, capilares (seta) e vácuolo no citoplasma das células secretoras (cabeça de seta) mais desenvolvido em ambiente marinho do que estuarino. Coloração H&E.

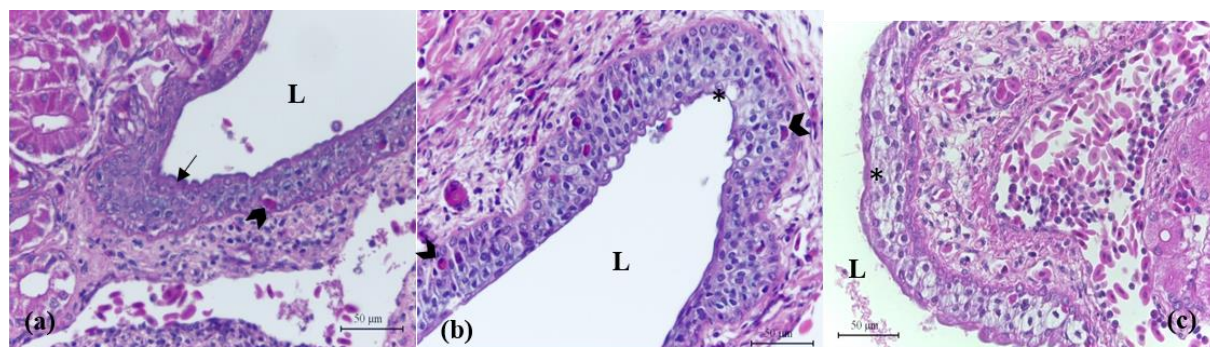


Fig. 5 Epitélio estratificado do ducto central de diferentes regiões da glândula retal de *Hypanus guttatus*. (a) Região posterior da glândula de um animal marinho (b) e estuarino (b), (c) região anterior da glândula de um animal estuarino. Observa-se maior presença de grânulos (seta) na superfície do epitélio de *H. guttatus* marinho (a), enquanto nos animais estuarinos (b-c) observa-se maior presença de células mucosas (*). Células com característica acidófila são frequentemente observadas no epitélio estratificado da glândula retal (◀). Coloração H&E.

Discussão

O padrão morfológico da glândula retal de *Hypanus guttatus* segue o modelo descrito para as demais espécies de Myliobatiformes estudadas até o momento (Bonting 1966; Polver e Bernocchi 1970; Melo et al, Capítulo II). A divisão em lóbulos foi semelhante a descrito para *Urolophus jamaicensis* (Doyle, 1962) e ao tubarão eurialino *Carcharhinus leucas* (Müller e Henle 1839) (Pillans et al. 2008).

As variações da glândula retal que ocorrem dentro do grupo dos elasmobrânquios em muitos casos estão associadas com suas especificidades (Larsen et al, 2019). O comprimento da glândula retal, por exemplo, parece variar tanto em relação ao ambiente quanto tamanho do animal. A espécie *Hypanus guttatus* é uma animal de grande porte e a glândula retal dessa espécie foi proporcional a sua largura de disco (Melo et al, Capítulo I).

A espécie eurialina *Dasyatis sabina* em água doce apresentou glândula retal 80% menor do que *D. sabina* de água salgada (Piermarini e Evans 1998). No entanto, em outras espécies eurialinas com ciclo de vida em água doce, como *Carcharhinus leucas*, glândula retal de tamanho normal ou pouco reduzido estão presentes, mas contêm menos túbulos secretores (Oguri 1964; Thorson et al. 1978), diferente do observado para espécies de potamotrygonídeos que tem glândulas retais vestigiais (Thorson et al. 1978). Nesse estudo, não foram observados diferenças significativas da morfologia da glândula retal de *Hypanus guttatus* oriundas de ambientes com diferentes salinidades. Provavelmente, o fator ambiente (tipo de estuário do Canal Santa Cruz) ou até mesmo o tempo de permanência da *Hypanus guttatus* em áreas estuarinas no presente estudo não foram suficientes para promoção de mudanças significativas em relação ao comprimento da glândula retal, experimentos devem ser conduzidos com tempos de exposições diferentes para observar se tais mudanças podem ocorrer.

Aspectos morfológicos da glândula retal de algumas espécies de tubarões indicam que mudanças ao nível celular não são tão importantes na adaptação a alterações de salinidade quanto mudanças em outras variáveis fisiológicas (Pillans e Franklin 2004; Pillans et al. 2008). Para o tubarão cabeça chata, a especificidade ambiental parece ser um fator determinante para tais mudanças. Os tubarões desta espécie oriundos do rio Brisbane em Queenslad Austrália, não apresentam diferenças morfológicas na glândula retal entre animais de água doce e salgada (Pillans et al. 2008), diferentemente dos resultados observados por Oguri (1964) e Gerzeli e colaboradores (1976) que compararam a morfologia das glândulas de animais oriundos do Lago Nicarágua (água doce) e da Costa Leste dos Estados Unidos (água salgada) e encontraram reduções tanto no comprimento do órgão quanto em elementos estruturais do tecido em animais de água doce.

De acordo com Melo (2016) e Yokota e Lessa (2006) essa espécie usa área marinha nas fases iniciais da vida (neonato e jovem do ano), após essa fase, os indivíduos entram no estuário, mas mantém uma conexão com ambiente marinho após os 40 cm de largura do disco. Todos os indivíduos analisados nesse estudo foram maiores que 42 cm. Os animais oriundos do estuário apresentaram a camada de tecido conjuntivo mais espessa e células secretoras do epitélio tubular mais irregulares e largas, diferentemente dos animais marinhos, essas distinções podem estar associadas ao espaço que os túbulos secretores ocupam quando estão em constante atividade. Para o tubarão *C. leucas* de água doce há redução do número de túbulos secretores e aumento do tecido intersticial, a glândula então se torna hipofuncional ou quiescente e, finalmente processos de regressão pode ocorrer na água doce (Oguri, 1964; Gerzeli et al., 1976). Apesar de não ter sido observado processos de regressão no presente estudo, o que acontece com a raia *H. guttatus* ao entrar no estuário é uma diminuição da atividade secretora que pode estar associado a um processo de quiescência nesses ambientes.

Alterações morfológicas da glândula retal não só estão relacionadas a salinidade do ambiente como também sofrem grande influência da alimentação. Matey e colaboradores (2009) demonstraram que após a alimentação, os tubarões *Squalus acanthias* alteraram em 6h as características morfológicas da glândula retal, processo chamado de ativação morfológica, com mudanças no padrão da superfície apical das células secretoras através do aumento da área superficial para secreção e presença de vacúolos nas células tubulares nos animais em jejum. De acordo com Queiroz (201), o maior número de *H. guttatus* com estômago vazio ocorre em ambiente marinho. Estudos experimentais que testem modelos comparativos podem servir de base no entendimento de outras relações de influência na atividade secretória da glândula retal como associação de período de inanição e baixa salinidade na resposta morfológica do órgão, exercício associado a baixa salinidade, entre outros.

O epitélio estratificado do ducto central, também classificado como de transição por Bulger (1965), apresenta características similares ao epitélio de transição encontrado na bexiga e segundo este autor compartilha mesma origem endodermal que a glândula retal. Para a época, não se sabia ao certo se a espessura desse epitélio variava como resposta a estímulos fisiológicos. No entanto, no presente estudo, foram observadas variações na espessura do epitélio estratificado em ambiente estuarino e marinho, o que sugere que as condições as quais as raia de ferrão estudadas estão submetidas podem requerer alterações neste nível.

As células do epitélio do ducto central são especializadas, com quatro tipos diferentes de células. Mesma característica foi observada por Newbuond e O'Sea (2001) para o tubarão Port Jackson (*Heterodontus portusjacksoni*). Em contrapartida, para o tubarão cachorro o mesmo epitélio apresenta aproximadamente seis tipos diferentes de células (Bulger 1965), fato que sugere que a tipificação celular desta camada pode variar de espécie para espécie. As células mucosas geralmente observadas na superfície do epitélio estratificado no presente estudo também foram visualizadas raia *Urolophus jamaicensis* (Doyle 1962) na porção anterior da glândula assim como as *Hypanus guttatus* marinho (Melo, 2016), diferindo das raia *Hypanus guttatus* estuário onde várias células mucosas foram observadas ao longo de toda a glândula, e não apenas na região posterior. Essas células são caracterizadas como caliciformes e cujo citoplasma é preenchido por grânulos mucígenos (Bulger 1965). Nos peixes teleósteos, o muco pode desempenhar papel na regulação de íons, como observado nas células mucosas presentes no epitélio do filamento branquial, e sua secreção pode ser um mecanismo de adaptação a diferentes condições no ambiente aquático (Moron et al. 2009). A densidade dessas células podem variar nas brânquias e pele em resposta a mudanças na concentração de íons como sódio, cálcio e cloreto (Perry e Wood 1985; Laurent e Hebibi 1989). Processo similar pode ocorrer para as raia *H. guttatus* em ambiente estuarino onde as variações intertidais vão influenciar expressivamente as concentrações de íons. O maior número de células mucosas no epitélio estratificado do ducto central da glândula retal destes animais pode estar relacionado com mecanismo compensatório para evitar a entrada de água e perda de íons em ambientes mais diluídos, o muco formaria uma barreira de proteção o que iria contribuir para manutenção do equilíbrio homeostático nesses animais.

As alterações morfológicas observadas no presente estudo representam a habilidade das *Hypanus guttatus* em aumentar ou diminuir a secreção de NaCl dependendo do ambiente. Os mecanismos fisiológicos de como essas alterações ocorrem ainda precisam ser esclarecidos, assim como sugere Pillans e colaboradores (2008), adicionais estudos sobre a morfologia da glândula retal de outras espécies de raia, principalmente as eurihalinas e de água doce devem ser feitos, para comparação do grau de variação estrutural e temporal na resposta fisiológica ocorrem em relação à mudança de ambiente. Segundo Thorson e colaboradores (1978), a tolerância a salinidade, associada a habilidade de retenção de uréia, o comprimento e condição da glândula retal observados em diversos estudos em variados espectros ambientais, são importantíssimas fontes de evidências a respeito da evolução da adaptação a água doce das raia de ferrão, assim como para os elasmobrânquios no geral. Desta forma, os achados do presente estudo servem de base para o entendimento adaptativo dessa espécie em diferentes condições, sendo necessário estudos experimentais para descrever os níveis dessas mudanças.

Agradecimentos

Nosso especial agradecimento aos pescadores que contribuíram de forma direta na execução do projeto. Ao Laboratório de Dinâmica de Populações Marinhas da Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Pesca e Aquicultura pela parceria e colaboração nas amostragens.

Contribuição dos Autores

Esse artigo é resultado de um trabalho de quatro anos da pesquisa de doutorado de A.C.M.M. C.B.A. colaborou com o processamento das amostras e análise dos dados, ainda auxiliou na edição no texto final. As contribuições científicas e discussões dos resultados foram realizadas em conjunto com os autores M.G.R., M.L.G.A. e J.E.N. assim como redação final do referido texto.

Referências

- Anderson WG, Taylor JR, Good JP, Hazon N, Grosell M (2007) Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry Physiology Part A Molecular Integrative Physiology* 148:3-13
- Araújo MS, Barreto AV, Negromonte AO, Schwamborn R (2011) Population ecology of the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae) in a Brazilian tropical estuary. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84: 1–9
- Ballantyne JS, Fraser DI (2012). Euryhaline elasmobranchs. In: S. D. McCormick, A. P. Farrell and C. J. Brauner (eds.) *Fish Physiology*, v. 32, pp. 1–44. New York: Elsevier. p. 125-198
- Bigelow HB, Schroeder WC (1953) *Fishes of the Western North Atlantic. Sawfishes, Guitarfishes, Skates and Rays*. Memoirs Sears Foundation for Marine Research, New Haven. 588 pp.
- Bittner A, Lang S (1980) Some aspects of the osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (*Potamotrygon hystrix*): I. Serum osmolality, Na⁺ and Cl⁻ content, water content, hematocrit and urea level. *Comparative Biochemistry Physiology* 67:9-13
- Bonting SL (1966) Studies on sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase-XV. The rectal gland of the elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.* 17: 953-966
- Burger JW, Hess WN (1960). Function of the rectal gland in the spiny dogfish. *Science* NY 131:670–671
- Bulger RE (1963) Fine structure of the rectal (salt secreting) gland of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *The Anatomical Record* 147:95–127
- Bulger RE (1965) Electron microscopy of the stratified epithelium lining the excretory canal of the dogfish rectal gland. *The Anatomical Record* 151:589-608
- Cervigón F. (1966) *Los Peces Marinos de Venezuela*. Estación de Investigaciones Marinas de Margarita – Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Caracas, pp 951
- Cramp RL, Hansen MJ, Franklin CE (2015) Osmoregulation by juvenile brown-banded bamboo sharks, *Chiloscyllium punctatum*, in hypo- and hyper- saline waters. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 185:107-114

Domingues EDC, Schettini CAF, Truccolo EC, Oliveira Filho JCD (2017) Hydrography and currents on the Pernambuco Continental Shelf. RBRH, 22

Doyle WL (1962) Tubule cells of the rectal saltgland of *Urolophus*. American Journal of Anatomy 111:223–237

Epstein FH (1979) The shark rectal gland: a model for active transport of Cl^- . Yale Journal Biological Medicine 52:517-523

Epstein FH, Silva PS (2005) Mechanisms of Rectal Gland Secretion. The Bulletin MDI Biological Laboratory 44:1-5

Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol Rev 85:97-177

Forrest JN, Boyer JL, Ardito TA, Murdaugh HV, Wade JB (1982) Structure of tight junctions during Cl^- secretion in the perfused rectal gland of the dogfish shark. American Journal of Physiology 242:388–392

Gerzeli G, De Stefano GF, Bolognani L, Koenig KW, Gervaso MV, Omodeo-Sale MF (1976) The rectal gland in relation to the osmoregulatory mechanisms of marine and freshwater elasmobranchs. In: TB Thorson (ed) Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes. Lincoln, NE: School of Life Sciences, University of Nebraska, pp 619-627

Grant MI, Kyne PM, Simpfendorfer CA, White WT, Chin A (2019) Categorising use patterns of non-marine environments by elasmobranchs and a review of their extinction risk. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1-22

Larsen ME, Abel DC, Crane DP, Parker SL, Yancey PH, Keller BA, Grubbs DR (2019) Unique osmoregulatory morphology in primitive sharks: an intermediate state between holocephalan and derived shark secretory morphology. Journal of Fish Biology 95:1331-1341

Laurent P, Hebibi N (1989) Gill morphometry and fish osmoregulation. Canadian Journal of Zoology 67:3055-3063

Macedo SJ, Koenig ML (1987). Áreas estuarinas de Pernambuco (Bibliografia comentada). Recife, PE: UFPE

McEachran JD, De Carvalho MR, Carpenter KE (2002) Batoid fishes. In: Carpenter EE (ed) The living marine resources of the Western Central Atlantic, Vol 1. Rome: FAO pp 507-589

Martin RA (2005) Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs: a review. J Mar Biol Assoc U K 85:1049–1073

Matey V, Wood CM, Dowd WW, Kultz D, Walsh PJ (2009) Morphology of the rectal gland of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) shark in response to feeding. *Can J Zool* 87:440-452

Medeiros C, Kjerfve B. (1993). Hydrology of the estuarine system: Itamaracá, Brazil. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, 36:495-515

Melo, A.C.M. Biologia e pesca da raia *Dasyatis guttata* (Block & Schneider, 1801) (Elasmobranchii: Dasyatidae) na plataforma continental de Pernambuco, Brasil. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco 96pp

Moron SE, Andrade CA, Fernandes MN (2009) Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerhynchus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology* 7:491-498

Newbound DR, O'Shea JE (2001). The microanatomy of the rectal gland of the portjackson shark, *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer) (Heterodontidae): suggestions for a counter-current exchange system. *Cells Tissues and Organs* 169:165–175

Oguri M (1964) Rectal gland of marine and freshwater sharks. *Comparative Histology Journal* 144:1151–1152

Olson KR (1999). Rectal gland and volume homeostasis. In: WC Hamlett (ed) *Sharks, skates, and rays*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md, pp 339-352

Perry SF, Wood CM (1985) Kinetics of brachial calcium uptake in the rainbow trout: effects of acclimation to various external calcium levels. *Journal of Experimental Biology* 116:411-433.

Perry SF (1997) The chloride cells: structure and function in the gills of the freshwater fishes. *Annu Rev Physiol*, 59:325-347

Piermarini PM, Evans DH (1998) Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater lake Jesup of the St Johns River, Florida. *Physiological Zoology* 71:553–560

Piermarini PM, Evans DH (2000) Effects of environmental salinity on Na^+/K^+ -ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology* 203:2957– 2966

Pillans RD, Franklin CE (2004) Plasma osmolyte concentrations of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 138:363–371

Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Hazon N, Franklin CE (2005) Freshwater to seawater acclimation of juvenile bull sharks (*Carcharhinus leucas*): plasma osmolytes and Na⁺/K⁺-ATPase activity in gill, rectal gland, kidney and intestine. *Journal of Comparative Physiology B* 175: 37-44

Pillans RD, Anderson WD, Good JP, Hyodo S, Takei Y, Hazon N, Fanklin CE (2006) Plasma and erythrocyte solute properties of juvenile bull sharks, *Carcharhinus leucas*, acutely exposed to increasing environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331: 145-157

Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Hazon N, Franklin CE (2008) Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. *Journal of Fish Biology* 72:1559-1571

Polver PP, Bernochii G (1970) La ghiandola rettale in *Myliobatis aquila*: raffronto comparativo con *Scylliorhinus canicula*. *Italian Journal of Zoology* 37: 151-160

Queiroz, APN Ecologia alimentar de *Dasyatis guttata* (Myliobatoidei: Dasyatidae) capturada pela pesca artesanal no litoral de Pernambuco, Brasil. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco 95pp

Melo, ACM Biologia e pesca da raia *Dasyatis guttata* (Block & Schneider, 1801) (Elasmobranchii: Dasyatidae) na plataforma continental de Pernambuco, Brasil. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco 96pp

Riordon JR, Forbush B, Hanrahan JW (1994) The molecular basis of chloride transport in shark rectal gland. *Journal of Experimental Biology* 196:405–418

Silva P, Solomon RJ, Epstein FH (1997) Transport mechanisms that mediate the secretion of chloride by the rectal gland of *Squalus acanthias*. *Journl of Experimental Zoology* 279:504-508

Shuttleworth TJ, Thomson JL (1986) Perfusion secretion relationships in the isolated elasmobranch rectal gland. *Journal of Experimental Biology* 125:373–384

Smith HW (1931a) The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes I. Freshwater elasmobranchs. *American Journal Physiology* 98:279–295

Thorson TB, Brooks DR (1983) The evolution of freshwater adaptation in stingrays. *Nat Geog Soc Res Rep* 15:663–694

Thorson TB, Wootton RM, Georgi TA (1978) Rectal gland of freshwater stingrays *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory Woods Hole* 154:508-516

Wosnick N, Freire CA (2013) Some euryhalinity may be more common than expected in marine elasmobranchs: the example of the South American skate *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii, Rajiformes, Rhinobatidae). *Comparative Biochemical Physiology A* 166:36–43

Yokota L, Lessa RP (2006) Nursery area for sharks and rays in northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes* 75: 349–360

Vlaming VL, Sage MS (1973) Osmoregulation in the euryhaline elasmobranch, *Dasyatis sabina*. *Comparative Biochemistry Physiology* 45:31-44

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descrição morfológica dos órgãos relacionados a osmorregulação revelou variações não só espécie-específica como também ligadas ao habitat desses animais. Tendo em vista os diferentes usos de habitat, as repostas fisiológicas aos estímulos ambientais comprovadamente geram mudanças a nível celular. Como as variações na espessura da cápsula da glândula retal e da camada muscular, na composição e distribuição dos túbulos secretores, assim como do epitélio estratificado do lúmen central. A lobulação da glândula nesses animais, parece ser um fator filogenético divergente entre as espécies analisadas. A raia *A. narinari* é considerada mais evoluída em relação ao gênero *Hypanus*, mas apresenta características compartilhadas apenas com os tubarões mais primitivos dentro do grupo dos elasmobrânquios.

Maior parte das alterações podem estar relacionadas com a variação de salinidade, como observado em *H. marianae* que é uma espécie que se restringe locais com maior salinidade com aparentemente pouca variação, resultando em redução nos componentes teciduais como os citados anteriormente, além de reduzidos valores no diâmetro do corpúsculo renal, amplamente associado às altas salinidades em peixes ósseos. Suas lamelas brânquias resuzidas também refletem essa estratégia, além de estar associada ao hábito bentônico da espécie.

A raia *H. guttatus* é caracterizada como eurialina no presente estudo por apresentar íntima relação com os ambientes mais diluídos, adentrando os rios próximos aos estuários. Desta forma, enfrenta uma ampla variação das condições ambientais o que reflete numa glândula retal com cápsula mais espessa e aparente acúmulo de secreção em suas células secretoras, principalmente nos estuários. A presença de células mucosas em maior número quando comparada as demais espécies, tanto na glândula como nas brânquias, pode refletir uma estratégia para minimizar a perda de íons em ambientes mais diluídos. Os rins apresentam características similares as observadas em *A. narinari* que compartilha similar estratégia de deslocamento, mas em diferentes ambientes marinhos. Das três espécies, em relação à glândula retal e rins, a raia *A. narinari* foi a que apresentou maior amplitude nos valores mensurados no presente estudo, provavemente reflexo do hábito semipelágico desses indivíduos.

Os achados observados no presente estudo reportam as primeiras informações acerca das variações morfológicas de espécies tropicais ao nível osmorregulatório. Apesar disso, pouco se sabe sobre o tempo de resposta e as condições em que elas ocorrem, como por exemplo, inanição, condição corporal e estresse; afirmando necessidade de mais estudos a fim de determinar todos os fatores envolvidos nessas respostas. Por se tratar de espécies classificadas como dados insuficientes e próxima ameaça na lista vermelha de espécies ameaçadas, essas informações se tornam cruciais para construção de planos de manejo e conservação desses animais.