



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

**Testando a hipótese da barreira hidrográfica: estudo dos efeitos da
exposição à água do Rio Branco sobre a osmorregulação da arraia cururu,
Potamotrygon sp. (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)**

Bolsista: Anik de Souza Kodra, CNPq.

Manaus
2011



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



RELATÓRIO FINAL
PIBIC: PIB-B/0033/2010

**Testando a hipótese da barreira hidrográfica: estudo dos efeitos da
exposição à água do Rio Branco sobre a osmorregulação da arraia cururu,
Potamotrygon sp. (Elasmobranchii: Potamotrygonidae)**

Bolsista: Anik de Souza Kodra

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

**Manaus
2011**

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Este trabalho está sendo financiado pelo Programa CT-Amazônia/CNPq (Processo N° 575369/2008-6) “Investigação sobre a mortalidade das arraiais de água doce (Potamotrygonidae) durante o manejo e transporte ao longo do Rio Negro: aspectos osmorregulatórios”, bem como pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas – PIBIC/UFAM/CNPq (2010-2011).

RESUMO

A arraia *Potamotrygon* sp. é endêmica da bacia do Rio Negro e habita preferencialmente as águas ácidas dos igapós com folhiços submersos, e raramente é capturada nos rios Demini e Branco. Com base nas diferenças físico-químicas entre os rios Negro e Branco, a hipótese da barreira hidrográfica do Rio Branco foi investigada do ponto de vista osmorregulatório. Exemplares de *Potamotrygon* sp. capturadas no Rio Negro foram expostos às águas do Rio Branco. Os íons Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , teores de uréia e osmolalidade foram analisados no plasma e fluido perivisceral. Além disso, a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) foi determinada nas brânquias e rins. As células-cloreto imuno-positivas para a NKA foram identificadas nas lamelas e nos filamentos branquiais. A exposição às águas do Rio Branco não provocaram alterações significativas nas concentrações dos íons K^+ e Ca^{+2} e uréia, e nem da atividade da NKA branquial. Por outro lado, a concentração de Na^+ plasmático, Cl^- no plasma e no fluido perivisceral e os níveis da NKA renal foram significativamente reduzidos nos exemplares expostos às águas do Rio Branco. Com isso, a redução dos eletrólitos no plasma provocou uma diminuição da osmolalidade neste fluido. Uma análise de regressão revela uma relação inversa entre a atividade da NKA branquial e renal quando estes peixes são expostos às águas do Rio Branco. Esta integração funcional foi interpretada como sendo um mecanismo de ajuste para manter a homeostase iônica. Por outro lado, a forte redução na NKA renal pode ter resultado na formação de uma urina mais concentrada, eliminando desnecessariamente, íons como o Na^+ e Cl^- nos compartimentos corporais. No contexto biogeográfico, explorar um ambiente que impõe limites fisiológicos poderá se tornar uma barreira geográfica para a distribuição daquela espécie. Portanto, as águas do Rio Branco que deságuam no Rio Negro nas coordenadas "S01°23'25" W61°50'89" podem servir como uma das muitas barreiras geográficas que delimitam a distribuição para a espécie *Potamotrygon* sp.

Palavras-chave: Potamotrigonidae, arraias de água doce, osmorregulação e barreira hidrológica

ABSTRACT

Potamotrygon sp. is restricted to black water river (Middle of Negro River), however its density is very low in the Demini and Branco rivers, both white water-rivers. Because of the physical and chemical differences between these two habitats, the hypothesis of a hydrological barrier was analyzed based on a physiological approach. The Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) activity in the gills and kidneys, the number of mitochondria-rich cells in the gills and, the plasma and perivisceral ion concentration of the stingray *Potamotrygon* sp. were determined in specimens kept in their native water (Negro River) and exposed to Branco River water. The exposure to Branco River water decreased the Na⁺ and Cl⁻ plasma concentrations as well as the Cl⁻ perivisceral concentration and osmolality, but it did not change concentrations of K⁺, Ca²⁺ and urea in the plasma and perivisceral fluid. The NKA activity of the gills (1.8 ± 0.1 and 1.7 ± 0.1 $\mu\text{mol Pi/mg pt/h}$ in stingrays kept in the Negro River and Branco River waters, respectively) did not change and was lower than renal NKA activity (12.7 ± 0.7 and 5.7 ± 0.9 $\mu\text{mol Pi/mg pt/h}$ in stingrays kept in the Negro River and in the Branco River waters, respectively). A negative relationship between gill and renal activities was detected in the stingrays kept in the Branco River water. The abundance of *Potamotrygon* sp. in the Negro River and rarely found from the Branco River (a tributary of the Negro River) shows a physicochemical hydrographic barrier for the distribution of this species, probably related to the inability of this species to maintain osmotic and ion balance in circumneutral pH and ion-rich water than that Negro River.

Key words: Potamotrygonidae, freshwater stingray, osmoregulation, hydrographical barrier

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Exemplar de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) da região de Barcelos, Médio Rio Negro. 7
- Figura 2 Mapa do Rio Amazonas evidenciando o local de coleta de *Potamotrygon* sp. 7
- Figura 3 Valores médios \pm e.p.m (\pm erro padrão da média) da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) das brânquias (A) e dos rins (B) de *Potamotrygon* sp. mantido na água nativa do Rio Negro e exposto à água do Rio Branco. O asterístico indica diferença estatística ($P < 0,05$). $N=6$ para ambos os grupos. 14
- Figura 4 Correlação entre as atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) branquial e renal de *Potamotrygon* sp. exposto à água do Rio Branco. A equação da regressão é $\text{NKA renal} = 15,76 - (5,98 \times \text{NKA branquial})$, onde $r^2 = -0,73$ ($P=0,03$). 14

LISTA DE TABELAS

- Tabela I Parâmetros físico-químicos da água do Rio Negro (lago 8 Budarizinho, S00°40'628" W63°03'506") e do Rio Branco (Boca do Rio Branco, S01°23'248" W61°50'887").
- Tabela II Valores médios±E.P.M da concentração dos íons Na⁺, Cl⁻, 12 K⁺ e Ca⁺², uréia e osmolalidade no plasma e fluido perivisceral da arraia *Potamotrygon* sp.exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. N=6 para cada grupo.
- Tabela III Valores médios±E.P.M do número de células-cloreto 13 imuno-positivas para a Na⁺/K⁺ -ATPase na lamela e no filamento branquial da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. N=3 para cada grupo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. HIPÓTESES	6
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	7
4.1 Locais de captura	7
4.2 Delineamento experimental	8
4.3 Coleta de tecido	9
4.4 Procedimentos analíticos	9
4.5 Determinação e análise das Células -cloreto	10
4.6 Análise da atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal	11
4.7 Análises estatísticas	11
5. RESULTADOS	12
5.1 Composição química do plasma	12
5.2 Células -cloreto	13
5.3 Atividade da Na^+/K^+ -ATPase	13
6. DISCUSSÃO	15
6.1 Mecanismos de ajuste osmo-ionorregulatório	15
6.2 Evidências da barreira hidrográfica	19
7. CONCLUSÕES	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
9. CRONOGRAMA	25

1. INTRODUÇÃO

A região Amazônica apresenta uma grande variedade de habitats aquáticos separado por barreiras geográficas físicas e hidrográficas que limitam o fluxo de genes entre os indivíduos. Por causa disso, tem sido postulado que este isolamento tenha favorecido os mecanismos de especiação alopátrica e/ou por adaptação divergente. Segundo Toffoli (2006), a especiação entre as arraias de água doce *Plesiotrygon iwamae* Castello & Thorson 1987, *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon schroederi* Fernández-Yépez 1958 pode ter ocorrido entre 7,7 a 6,8 milhões de anos atrás. Enquanto *Potamotrygon* sp. e *P. schroederi* são simpátricas no Rio Negro, *P. iwamae* é restrita a calha do Rio Amazonas (MARTIN, 2004; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005). Devido à ausência de evento biogeográfico que possa explicar a “separação” de *P. iwamae* das demais espécies basais que ocorrem no Rio Negro, foi proposto que a grande diferença físico-química entre o Rio Amazonas e Rio Negro tenha sido a principal força seletiva que tenha levado à especiação por adaptação divergente (TOFFOLI, 2006).

Na Amazônia, nenhum estudo foi conduzido para testar se as diferenças físico-químicas entre os corpos d'água possam atuar como verdadeiras barreiras hidrográficas. Todavia, para espécies como *Callophysus macropterus* Lichtenstein 1819, que é migratória, apresenta alto fluxo gênico, e possui extrema plasticidade populacional, as diferenças nas características físico-químicas entre o Rio Negro e o Rio Amazonas não formam barreiras impedindo o fluxo de genes entre os indivíduos (RAMIREZ-GIL, 1998). Este mesmo argumento parece ser válido para a arraia *Paratrygon aiereba* Müller & Henle 1841, que é uma espécie não-migratória, de baixa capacidade dispersiva e apresenta pouco ou nenhum fluxo gênico (FREDERICO, 2006), mas com uma flexibilidade osmo-ionorregulatórios interpopulacionais (Rio Negro e Rio Amazonas) que pode ter sido crucial durante a fase dispersiva dessa espécie para todos os Rios amazônicos ao longo de sua história evolutiva. Embora os exemplos acima

sejam instrutivos, trata-se de espécies com ampla distribuição na bacia amazônica, cuja plasticidade fisiológica lhes permitiu explorar uma miríade de diferentes ambientes aquáticos. Para espécies endêmicas, os mecanismos adaptativos provavelmente tornaram-se especializados ao ponto de se manterem permanentemente isoladas ou restritas a uma bacia em particular.

As águas da maioria dos tributários do Rio Negro são de cor preta, transparente, baixa condutividade, elevado teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) poucos sólidos totais dissolvidos, sendo às vezes chamados de rios de água destilada ligeiramente contaminada (KONHAUSER et al., 1994; AUCOUR et al., 2003). Porém, a bacia do Rio Negro possui alguns poucos rios de água branco-esverdeada, os quais contrastam com os rios de água preta. Os principais são os rios Demini e Branco, ambos deságuam na margem esquerda do Rio Negro. Estes rios possuem características limnológicas intermediárias entre aqueles observados nas águas pretas e brancas (KÜCHLER et al., 2000). O Rio Branco possui pH 6-7, baixo teor de DOC, e sendo mais rico em íons que rios de água preta. Algumas espécies de Potamotrygonidae são endêmicas e altamente especializadas para sobreviver nas águas mais ácidas e diluídas da bacia do Rio Negro (ARAÚJO, 1998) e são raramente capturadas nos tributários de água branca. Estudos realizados com a arraia *Potamotrygon* sp. têm sugerido que a estratégia de adaptação à água preta e pobre em íons parece similar a de alguns ciclídeos (teleósteos) do Rio Negro (GONZALEZ & WILSON, 2001; GONZALEZ et al., 2002; WOOD et al., 2002). Segundo Wood et al. (2002), esta arraia possui um sistema de transporte iônico de baixa afinidade (alto K_m e baixo J_{max}), mas está equipada com um sistema de baixa perda difusiva de íons. O exato mecanismo de transporte iônico ainda não está completamente compreendido. Mas, pode estar profundamente associado a uma redução da permeabilidade branquial, através das junções paracelulares (GONZALEZ & PREEST, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que o DOC (como os ácidos húmicos) interage

direta ou indiretamente com as membranas biológicas reduzindo a perda e/ou estimulando a capacidade de tomada iônica; portanto, exercendo um papel protetor contra distúrbios ionorregulatórios nas arraias de água doce (WOOD et al., 2003) e teleósteos nativos do Rio Negro (MATSUO & VAL, 2007). No entanto, desconhece-se o grau de envolvimento, ou as possíveis mudanças dos processos renais e extra-renais em resposta a uma súbita mudança nas características físico-químicas do meio durante uma incursão da arraia *Potamotrygon* sp. ao Rio Branco.

Regulação iônica em peixes é mediada principalmente pelas brânquias e pelos rins. Estes órgãos são os principais responsáveis pelo balanço do movimento iônico entre perda e ganho. No epitélio branquial, as células-cloreto constituem-se no principal sítio para o transporte ativo e passivo de íons (PERRY, 1997). Nestas células, a membrana basolateral é expandida para acomodar a enzima Na^+/K^+ -ATPase (PISAM et al., 1990; WILSON et al., 2002).

A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) é uma enzima universal que ativamente transporta íons Na^+ e K^+ . Sua importância vai além da manutenção da homeostase intracelular, pois proporciona uma força eletrogênica que impulsiona a maioria dos sistemas de transporte iônico tanto nas brânquias, quanto nos rins (LIN et al., 2003; LIN et al., 2004). Em *Dasyatis sabina* Lesueur 1824, esta enzima presente nas células-cloreto branquiais está relacionada à tomada de íons Na^+ e excreção de H^+ para o meio (PIERMARINI & EVANS, 2000; EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). Enquanto nos túbulos contorcidos renais de *Tetraodon nigroviridis* Marion de Procé 1822, o aumento da atividade da NKA tem um papel essencial nos mecanismos de reabsorção de sais, minimizando a perda excessiva para o meio (LIN et al., 2004). Portanto, em peixes de elevada plasticidade fisiológica as brânquias e rins atuam de maneira integrada, mesmo quando estes organismos estão sujeitos aos desafios ambientais. Por outro lado, espécies que possuem mecanismos altamente especializados, e que esporadicamente se sujeitam aos habitats extremamente hostis podem enfrentar sérios

distúrbios osmo-ionorregulatórios. Por exemplo, Wood et al. (2002) demonstraram que os sistemas de transportes de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} da arraia *Potamotrygon* sp. são sensíveis às mudanças de pH e às variações de sais no ambiente.

Portanto, por ter uma distribuição geográfica tão restrita e, raramente ser capturada nos tributários de água branca (Rio Demini e Rio Branco), o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da exposição à água do Rio Branco sobre os processos osmo-ionorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. Estas informações podem contribuir para a compreensão dos fatores abióticos determinantes na distribuição geográfica dessa espécie, bem como conhecer quais processos orgânicos são afetados quando as características do ambiente forem diferentes daquelas que os animais estão adaptados a sobreviver.

2. OBJETIVOS

Por ter uma distribuição geográfica tão restrita e raramente ser capturada nos tributários de água branca (Rio Branco), este estudo avaliou a exposição à água do Rio Branco sobre os processos osmo-ionorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). A obtenção dessa informação foi essencial para a compreensão dos fatores abióticos determinantes na distribuição geográfica dessa espécie, bem como conhecer quais foram os processos orgânicos afetados pela mudança do habitat.

Os principais aspectos osmorregulatórios analisados foram:

- A determinação das alterações na composição/concentração química (íons, osmolalidade e uréia) dos fluidos corporais de *Potamotrygon* sp. após exposição à água do Rio Branco;
- A determinação dos efeitos do transporte sobre os transportadores iônicos (Na^+/K^+ -ATPase) branquiais e renais de *Potamotrygon* sp. após exposição à água do Rio Branco.

3. HIPÓTESES

Hipótese nula (H_0):

- **Ocorrem** mudanças nos processos osmorregulatórios das arraias *Potamotrygon* sp. com a troca do ambiente de água preta, do Rio negro, para o de água branca, Rio Branco.

Hipótese alternativa (H_a):

- **Não** ocorrem mudanças nos processos osmorregulatórios das arraias *Potamotrygon* sp. com a troca do ambiente de água preta, do Rio negro, para o de água branca, Rio Branco.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1. Locais de captura

Os exemplares de *Potamotrygon* sp. foram capturados com auxílio de rapichés nas áreas rasas dos igapós do Médio Rio Negro (Igarapé do Zalala, S00°41'881" W62°59'153"), distante cerca de 120 km acima da boca do Rio Branco na estação da seca. As características físico-químicas do local de captura foram: pH 4,4; oxigênio 5,8 mg/L; sólido total dissolvido (TDS) 8,7 mg/L; condutividade 16,3 μ S/cm e temperatura 30,1°C. Os animais foram aclimatizados na água do lago Budarizinho, cujas condições físico-químicas foram semelhantes à água do Igarapé Zalala.

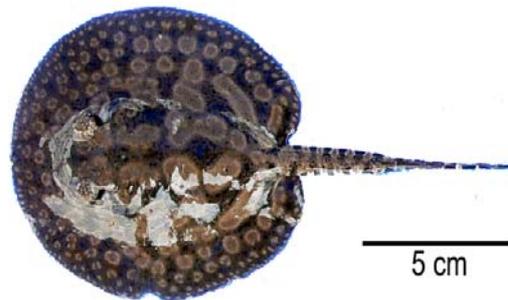


Figura 1. Exemplar de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) da região de Barcelos, Médio Rio Negro.

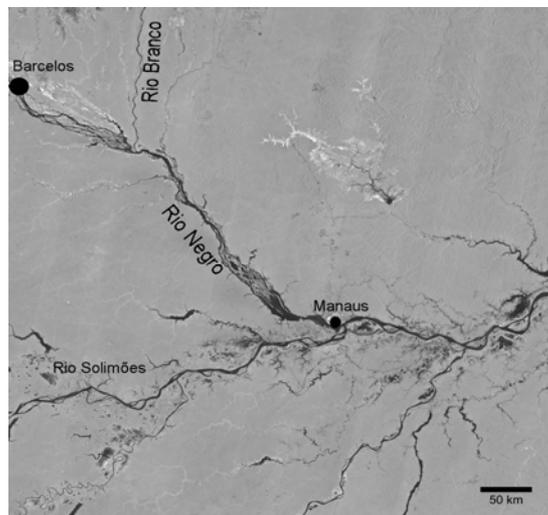


Figura 2. Mapa do Rio Amazonas, evidenciando o local de captura de *Potamotrygon* sp.

4.2. Delineamento experimental

Três unidades experimentais, com 2 arraias/unidade ($N=6$; $354,1\pm 11,8$; largura do disco, $17,8\pm 2,3$ cm) foram expostos durante 12 horas à água do Rio Branco (foz do Rio Branco, $S01^{\circ}23'248''$ $W61^{\circ}50'887''$). Outras 3 unidades experimentais, sendo 2 animais/unidade ($N=6$; $416,0\pm 9,3$ g; largura do disco, $20,6\pm 1,7$ cm) foram mantidos na água do Rio Negro (lago do Budarizinho, $S00^{\circ}40'628''$ $W63^{\circ}03'506''$). Nos dois grupos (Rio Negro e Rio Branco), a renovação da água foi contínua. Isto evita o acúmulo de material nitrogenado de excreção, além de manter as condições de aeração necessárias. As características físico-químicas da água dos grupos experimentais estão listadas na Tabela I. Todas as análises das águas foram realizadas com auxílio de um analisador multiparâmetro (Consort C535), exceto as concentrações dos íons Na^{+} e K^{+} , os quais foram determinados por fotometria de chama (Digimed DM 61).

Tabela I. Parâmetros físico-químicos da água do Rio Negro (Lago Budarizinho, $S00^{\circ}40'628''$ $W63^{\circ}03'506''$) e do Rio Branco (Boca do Rio Branco, $S01^{\circ}23'248''$ $W61^{\circ}50'887''$). (*) Indica diferença significativa. $N=6$ para cada grupo experimental.

Parâmetros	Rio Negro	Rio Branco
pH	$4,1\pm 0,3$	$6,8\pm 0,2^{*}$
Temp. ($^{\circ}C$)	$31,4\pm 0,2$	$30,5\pm 0,3$
[O_2] dissolvido (mg/L)	$5,2\pm 0,4$	$5,3\pm 0,4$
Condutividade ($\mu S/cm$)	$9,3\pm 1,4$	$27,5\pm 1,1^{*}$
TDS (mg/L)	$5,2\pm 0,7$	$14,7\pm 0,2^{*}$
[Na^{+}] (mM)	$11,8\pm 2,1$	$72,3\pm 9,5^{*}$
[K^{+}] (mM)	$14,8\pm 2,4$	$23,8\pm 7,9^{*}$

4.3. Coleta de tecido

Após exposição, os animais foram anestesiados (MS 222, 1:5.000) e o sangue retirado por meio de punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação. Uma incisão ventral expôs a cavidade visceral para a retirada do fluido perivisceral. O plasma e fluido perivisceral foram armazenados em N₂-líquido para análises dos íons, uréia e osmolalidade.

Fragmentos das brânquias e rins foram removidos armazenados em tampão SEI (0,3 mol/L Sacarose, 20 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 2-mercaptoethanol, and 0,1 mol/L imidazole, pH 7,4) para análise da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (NKA). A outra brânquia foi imediatamente fixada em solução Bouin gelada para imuno-localização das células-cloreto positivas para a Na⁺/K⁺-ATPase. O excesso de ácido pícrico foi removido por meio de lavagens sucessivas em álcool 70%.

4.4. Procedimentos analíticos

Os íons Na⁺ e K⁺ foram determinados por fotometria de chama (Digimed DM-61). O método colorimétrico da ortocresolftaleína-complexona foi utilizado para determinar a concentração de cálcio ([Ca⁺²]), enquanto o método da urease e uma modificação do princípio de Berthelot foram usados para determinar a concentração de uréia. A concentração de cloreto foi determinada por meio de titulação. Em todos os ensaios espectrofotométricos foram utilizados os “kits” comerciais In Vitro Diagnostica (Barbacena, São Paulo). A osmolalidade foi estimada por osmometria usando um μ -Osmette Precision. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas.

4.5. Determinação e análise das Células- cloreto

A localização das células-cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) foi realizadas por métodos imunocitoquímicos, modificados a partir de Piermarini & Evans (2000). Brevemente, os cortes foram desparafinizados, e, em seguida lavados em tampão fosfato de potássio-salino (TPS, 10 mM, pH 7,4). As ligações não específicas foram bloqueadas após a adição de H_2O_2 10% durante 20 min., seguido de soro de cabra (20% em TPS com Triton X-100, 0,1%) durante 20 min. Os cortes foram incubados durante a noite com o anticorpo primário anti- α -5 Na^+/K^+ -ATPase (1:100 em TPS com Triton X-100, 0,1%). Após isso, os cortes foram lavados em TPS durante 10 min. Os cortes foram incubados durante 1 hora em um segundo anticorpo conjugado com a Peroxidase anti-peroxidase (IgG goat anti-mouse Peroxidase) diluído 1:150 em TPS. O excesso foi retirado por meio de lavagens em TPS por 10 min. Todas as incubações foram realizadas em baixa temperatura em câmara úmida e escura. A coloração das CC-NKA foi realizada com solução de 3-3-diaminobenzidine com sulfato de níquel II amônio em H_2O_2 . A coloração apareceu entre 5 a 10 min. A coloração não se desenvolveu quando o anticorpo primário (IgG α 5) foi omitido nas secções controles.

A identificação das CC-NKA foi realizada em perfis de 3 cortes/animal (N=3/grupo experimental) em cada um dos cinco arcos branquiais. Foram realizadas 50 contagens independentes e aleatórias (nas lamelas e nos espaços interlamelares, separadamente). Todas as medidas foram realizadas utilizando um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera de vídeo e um computador com o software C.A.S.T. System (Olympus, Denmark).

4.6. Análise da atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal

Para determinação da NKA, os homogeneizados foram preparados com o tampão SEI em baixa temperatura usando um homogeneizador (Dispensor Extratur, Quimis) em 7.000 rpm, e centrifugados (Sigma 30-K) por 30 min a 12.000 g (4 °C). O sobrenadante foi utilizado para determinação dos níveis de proteínas totais e da atividade da NKA. A atividade da enzima foi realizada nas seguintes condições de ensaio: 1µg de proteína: 1µL de tampão contendo NaCl (100 mM), MgCl_2 (5 mM), KCl (13 mM), ATP (3 mM) e imidazol (30 mM). Um segundo ensaio foi realizado simultaneamente contendo os mesmos reagentes, exceto KCl, mas com ouabaína (inibidor da NKA). O fosfato inorgânico (Pi) produzido pela hidrólise do ATP foi determinado pelo método de Fiske & Subbarow (1925). A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase foi definida como sendo a diferença entre o fosfato liberado na mistura de ensaio na presença e ausência de ouabaína. As leituras de absorvância foram realizadas em 620 nm (Spectrum SP-2000 UV) e a atividade específica expressa em µmoles de Pi/ mg proteína/h. Fragmentos das brânquias foram desidratados e incluídos em parafina. Os cortes de 6 µm sagitais ao filamento branquial foram obtidos por meio de um micrótomo (Microm hm360).

4.7. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. As médias entre os parâmetros físico-químicos da água, entre os parâmetros osmorregulatórios nos dois grupos experimentais (Rio Negro *versus* Rio Branco) foram comparadas usando o teste *t* de *Student*. Quando apropriado, também foi utilizado o teste de Mann-Whitney (não-paramétrico). Uma análise de regressão foi feita entre a atividade da NKA renal e branquial para se verificar o grau de integração funcional entre os órgãos osmorreguladores. Em todos os testes, o nível de significância aceito foi $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Composição química do plasma

A exposição à água do Rio Branco não provocou alterações significativas nas concentrações dos íons (K^+ e Ca^{+2}), uréia do plasma e, nem do fluido perivisceral. Porém, houve uma redução significativa ($P<0,05$) na $[Na^+]$ do plasma, e na $[Cl^-]$ plasmático e do fluido perivisceral das arraias expostas à água do Rio Branco em relação aquelas aclimatizadas à água do Rio Negro (Tabela II). A redução dos eletrólitos (Na^+ e Ca^{+2}) plasmáticos provocou uma redução na osmolalidade total do plasma. Por outro lado, a redução na $[Cl^-]$ no fluido perivisceral não afetou a osmolalidade deste fluido.

Tabela II. Valores médios \pm E.P.M da concentração dos íons Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{+2} , uréia e osmolalidade no plasma e fluido perivisceral da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. N=6 para cada grupo. (*) indica diferença significativa (teste *t* de Student, $P<0,05$).

	Plasma		Fluido perivisceral	
	Rio Negro	Rio Branco	Rio Negro	Rio Branco
$[Na^+]$ (mM)	152,7 \pm 13,3	124,8 \pm 11,9*	83,5 \pm 10,1	77,2 \pm 11,7
$[Cl^-]$ (mM)	156,4 \pm 14,4	135,3 \pm 11,3*	168,4 \pm 8,9	147,6 \pm 13,4*
$[K^+]$ (mM)	4,7 \pm 0,5	4,9 \pm 0,6	6,1 \pm 0,9	6,9 \pm 0,8
$[Ca^{+2}]$ (mM)	2,8 \pm 0,2	2,7 \pm 0,3	2,0 \pm 0,2	1,8 \pm 0,3
Uréia (mmol/L)	2,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,4	17,3 \pm 1,6	16,9 \pm 1,3
Osmolalidade (mOsmol/kg)	298,2 \pm 17,1	254,7 \pm 22,9*	329,5 \pm 15,1	307,2 \pm 21,4

5.2. Células-cloreto

Também, não houve diferenças significativas no número de células-cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (lamela ou filamento) branquial entre os dois tratamentos (Tabela III).

5.3. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase

Os níveis de atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) branquial também não variou entre os dois grupos experimentais. Os níveis da NKA foram $1,7 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,1$ $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/h, nas arraias expostas às águas dos rios Branco e Negro, respectivamente (Figura 3A). Porém, as arraias expostas às águas do Rio Branco apresentaram valores de NKA renal significativamente ($5,7 \pm 0,9$) mais baixos do os grupos mantidos nas águas do Rio Negro ($12,7 \pm 0,7$ Pi/mg proteína/h) (Figura 3).

Tabela III. Valores médios \pm E.P.M do número de células-cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase na lamela e no filamento branquial da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. N=3 para cada grupo.

Parâmetros	Rio Negro	Rio Branco
Lamela	$1,4 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,4$
Filamento	$3,7 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,5$

A análise regressão linear sugere que as atividades da NKA branquial e renal atuam de forma integrada. A correlação entre a atividade da NKA renal e branquial foi fortemente negativa ($r^2 = -0,73$; $P < 0,05$), i.é, nos exemplares cuja atividade da NKA branquial encontrava-se elevada, a NKA renal encontrava-se reduzida (Figura 4).

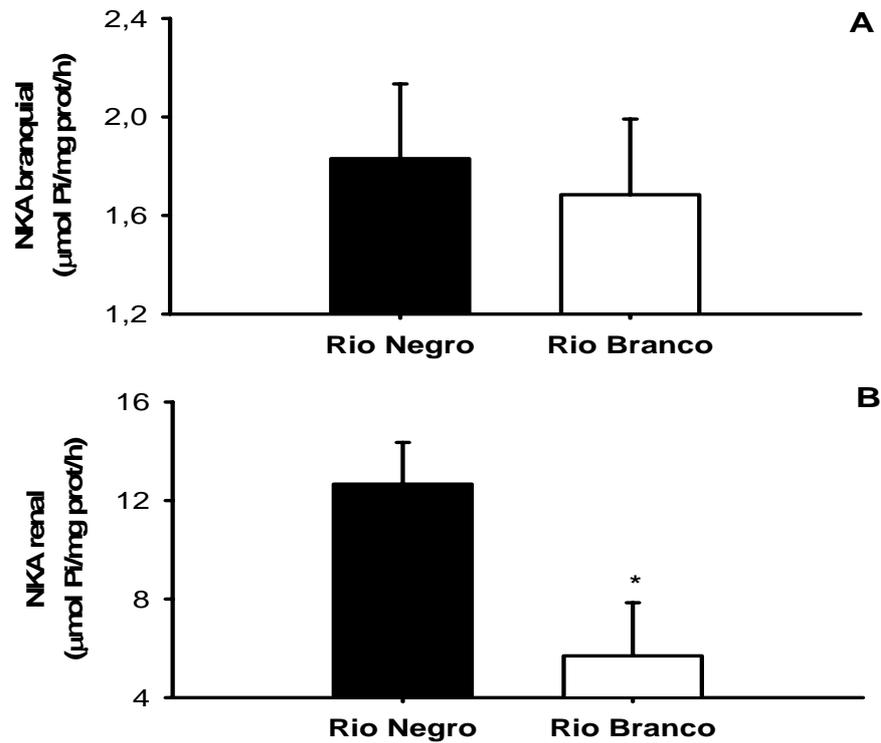


Figura 3. Valores médios \pm e.p.m (\pm erro padrão da média) da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) das brânquias (A) e dos rins (B) de *Potamotrygon* sp. mantido na água nativa do Rio Negro e exposto à água do Rio Branco. O asterístico indica diferença estatística ($P < 0,05$). $N=6$ para ambos os grupos.

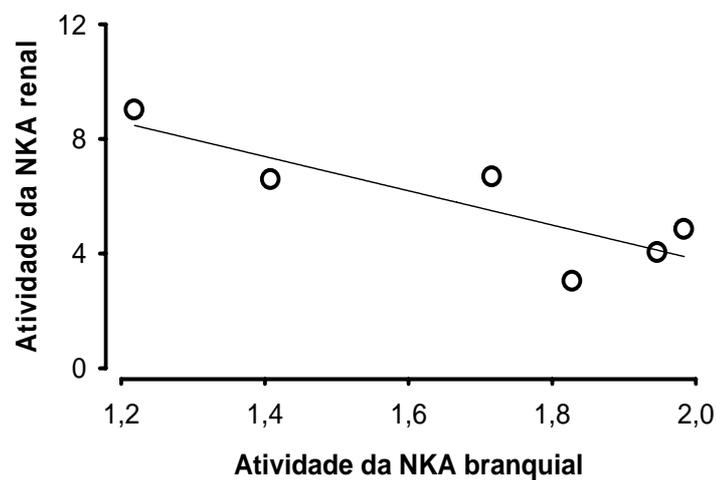


Figura 4. Correlação entre as atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) branquial e renal de *Potamotrygon* sp. exposto à água do Rio Branco. A equação da regressão é $\text{NKA renal} = 15,76 - (5,98 \times \text{NKA branquial})$, onde $r^2 = -0,73$ ($P = 0,03$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Mecanismos de ajuste osmo-ionorregulatório

Quando *Potamotrygon* sp. foi exposto em curto espaço de tempo à água do Rio Branco, não se observou diferença significativa na capacidade para regular o balanço de K^+ e Ca^{+2} dos fluidos corporais. Provavelmente, os mecanismos de transporte que regulam as concentrações desses eletrólitos nos compartimentos corporais são extremamente conservadores nos elasmobrânquios. Por exemplo, a concentração de K^+ e Ca^{+2} plasmáticos em 7 espécies de Potamotrygonidae, sendo 5 coletadas no Rio Negro e 2 capturadas no estuário amazônico são similares. Mesmo nos elasmobrânquios euri-halinos expostos à salinidade reduzida, a $[K^+]$ e $[Ca^{+2}]$ não se alteram. Isto foi observado em *Urolophus jamaicensis* Curvier 1816 (SULIKOWSKI & MAGINNIS, 2001) e *Leucoraja ocellata* Mitchill 1815 (SULIKOWSKI et al., 2003).

No entanto, *Potamotrygon* sp. demonstrou incapacidade para regular o balanço dos íons Na^+ e Cl^- nos fluidos corporais após exposição à água do Rio Branco. Os níveis desses eletrólitos no plasma tornam-se reduzidos quando comparados às arraias mantidas na água nativa do Rio Negro. Como consequência da redução desses íons houve uma diminuição da osmolalidade plasmática. O desequilíbrio iônico foi ainda mais pronunciado para o $[Cl^-]$. A redução do íon Cl^- plasmático foi acompanhado de uma diminuição na concentração desse eletrólito no fluido perivisceral. Estes resultados contrastam com os dados normalmente encontrados para elasmobrânquios euri-halinos. Os níveis de Na^+ e Cl^- plasmáticos de elasmobrânquios euri-halinos variam positivamente conforme aumento da salinidade ambiental. A redução na $[Na^+]$, $[Cl^-]$ e da osmolalidade plasmáticos sob tais condições foram observados em *Carcharhinus leucas* Müller & Henle 1839 (PILLANS & FRANKLIN, 2004), *Urolophus jamaicensis* (SULIKOWSKI & MAGINNIS, 2001) e *Leucoraja ocellata* (SULIKOWSKI et al., 2003). Portanto, como a água do Rio Branco é mais rica em íons que

a água do Rio Negro esperava-se um aumento das concentrações dos eletrólitos, principalmente Na^+ e Cl^- , nos fluidos corporais de *Potamotrygon* sp. Porém, estes dados parecem estar coerentes com as análises de fluxo iônico observados por Wood et al. (2002) para esta espécie. Estes autores observaram que a curva cinética para o influxo de Na^+ ou Cl^- de *Potamotrygon* sp. não foi alterada após aclimação à água enriquecida ionicamente. Uma explicação sugerida por Wood et al. (2002), é que o sistema de tomada de íons pelos potamotrigonídeos, o qual foi originariamente desenvolvido para operar no ambiente marinho, modificou-se ao longo da historia evolutiva para explorar o ambiente de água doce, entretanto, durante este período perdeu a capacidade para diferenciar água “normal” e “extremamente diluída”.

Então, se a aclimação a uma água enriquecida ionicamente não altera a cinética de influxo dos íons Na^+ e Cl^- , a redução na concentração desses íons nos fluidos corporais de *Potamorygon* sp. expostos à água do Rio Branco pode estar relacionado aos seguintes processos osmo-ionorregulatórios: (i) o aumento da taxa de efluxo branquial; (ii) a perda por meio da excreção renal; (iii) e, além disso, é provável que o efluxo desses eletrólitos seja o resultado de um ajuste entre todos estes processos, e controlado por sistemas de transporte iônicos diferentes, além de possivelmente, protegido pela ação dos ácidos húmicos sobre o epitélio branquial (WOOD et al., 2003).

Wood et al. (2002) relataram que o efluxo de Na^+ ($J_{\text{out}} \text{Na}^+$) em *Potamotrygon* sp. aclimatado à água do Rio Negro não varia com a mudança na concentração externa de Na^+ , enquanto o $J_{\text{out}} \text{Cl}^-$ aumenta significativamente com o aumento na concentração de Cl^- na água. Assim sendo, provavelmente esta arraia tende a perder mais Cl^- que Na^+ para o meio externo. Isto explica, pelo menos superficialmente, a redução significativa de Cl^- no plasma e no fluido perivisceral, diminuindo a osmolalidade total de *Potamotrygon* sp. exposto à água do Rio Branco. Outro aspecto importante sugerido por Wood et al. (2002), é que o perfil cinético do

fluxo iônico dessas arraiais (i.é, alto K_m e baixo J_{max}) parece desfavorecer as características do transporte de Na^+ e Cl^- . Por isso, tem-se sugerido que o carbono orgânico dissolvido (DOC), em baixo pH possa atuar diretamente sobre as brânquias protegendo estas arraiais (WOOD et al., 2003), e outros teleósteos do Rio Negro, como o cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz 1956 (MATSUO & VAL, 2007) da perda de íons, e evitando possíveis distúrbios ionorregulatórios. Como a concentração de DOC no Rio Negro (11,4 mg/L) é cerca de 4 vezes maior que a do Rio Branco (2,7 mg/L) (KÜCHLER et al., 2000), a baixa concentração de DOC no Rio Branco pode ter contribuído para potencializar a perda de íons por meio das brânquias para o meio. Muito embora, os dados deste estudo parecem demonstrar que a excreção urinária possa ter desempenhado um papel primordial nesse processo.

As diferenças nas características físico-químicas da água entre os rios não alteram os níveis de atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) branquial de *Potamotrygon* sp. O fato de não haver diferenças na atividade da NKA branquial entre o grupo exposto à água do Rio Branco ($1,7 \pm 0,1$) e o grupo mantido na água do Rio Negro ($1,8 \pm 0,1$ $\mu\text{mol Pi mg}$ proteína/h), pode ser explicado pelo fato de que, em *Potamotrygon* sp. as alterações nos teores de íons da água não influenciam na cinética de $J_{in} \text{Na}^+$ e $J_{in} \text{Cl}^-$ (WOOD et al., 2002), e provavelmente também não afetam os mecanismos eletrogênicos que impulsionam os sistemas de transportes de íons pelas brânquias dessas arraiais. Outra explicação alternativa é que as possíveis mudanças na atividade da NKA branquial dessas arraiais só ocorram na fase regulatória, i.é, após 24 horas de exposição à água do Rio Branco. Por exemplo, peixes eurihalinos, como *Chanos chanos* Forsskål 1775 apresentam uma brusca redução na $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$ e osmolalidade plasmática entre 3-6h após choque hipo-osmótico (fase de ajuste), porém, a expressão, a atividade da NKA e o número de CC-imuno-positiva para NKA (CC-NKA) só aumentam no início da fase regulatória, ou seja, entre 12 - 96 h (LIN et al., 2006). Os dados

sobre o número de CC-NKA branquial de *Potamotrygon* sp. também suportam esta evidência. Não há alteração no número de CC-NKA nas arraias após 12h de exposição à água do Rio Branco. Em peixes euri-halinos, como *Fundulus heteroclitus* Linnaeus 1766, o número total de CC-NKA também não se altera após transferência da água salgada para a água doce; porém, sua morfologia apical modifica-se bruscamente em menos de 12 h tornando-se mais expostas e apresentando numerosas microvilosidades apicais (KANEKO & KATOH, 2004). Provavelmente, estas alterações façam parte de uma fase mais tardia chamada de fase regulatória. No entanto, não se pode assumir que estes mecanismos osmo-ionorregulatórios possam, por si só, assegurar que a arraia *Potamotrygon* sp. se aventure nas águas do Rio Branco. Uma vez que os processos osmorregulatórios envolvem o compromisso direto e/ou indireto de outros órgãos extra-branquiais, tais como os rins.

A aparente ausência de regulação iônica pelas brânquias sugere que os rins tenham sido pelo menos parcialmente, responsáveis pela redução dos eletrólitos plasmáticos e do fluido perivisceral de *Potamotrygon* sp. após exposição à água do Rio Branco. A maioria dos peixes quando submetidos em ambientes pobres em íons tendem a aumentar a atividade da NKA renal, como uma forma de minimizar a perda de sais, produzindo uma urina diluída (MIYAZAKI et al., 2002; HAZON et al., 2003; PERRY et al., 2003; LIN et al., 2004). Porém, *Potamotrygon* sp. pode ter adotado um mecanismo contrário. A redução na atividade da NKA renal ($5,7 \pm 0,9$) quando comparada ao grupo do Rio Negro ($12,7 \pm 0,7$ $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/h) das arraias expostas à água do Rio Branco pode representar uma tentativa para ajustar os mecanismos compensatórios relacionados à manutenção da homeostase iônica. Isto se torna evidente quando se correlaciona os níveis de atividade dessa enzima nos dois importantes órgãos osmorregulatórios. A forte correlação negativa entre a NKA renal e branquial ressalta o compromisso entre estes tecidos na manutenção da regulação iônica. Porém, a aparente inabilidade para regular os mecanismos de reabsorção de íons pelos rins

dos exemplares expostos à água do Rio Branco pode ter contribuído para a perda excessiva de íon $[Na^+]$ plasmático e $[Cl^-]$ tanto do plasma quanto do fluido perivisceral. Principalmente para o íon Cl^- , onde a perda excessiva desse íon pode ser crucial para a homeostase hidromineral. A perda excessiva de íons Cl^- em *Myoxocephalus octodecimspinosus* Mitchill 1814 (CLAIBORNE et al., 1994) e *Fundulus heteroclitus* (SCOTT et al., 2004) após exposição ao ambiente hipo-osmótico tem sido apontada como a principal causa de mortalidade nessas espécies.

6.2. Evidências de barreira hidrográfica

O Rio Branco deságua na margem esquerda do Rio Negro, na altura das coordenadas S01°23'248" W61°50'887. As diferenças não se limitam apenas à aparência física (na qual os rios recebem seus nomes). Na confluência dos rios, as características físico-químicas do Rio Branco, tais como pH >6,5; condutividade elétrica $\approx 27,5 \mu S/cm$; sólidos totais dissolvidos $\approx 14,7 mg/L$ contrastam fortemente com os baixos valores desses parâmetros no Rio Negro (pH <4,5; condutividade elétrica $\approx 9,3 \mu S/cm$; sólidos totais dissolvidos, $\approx 5,2 mg/L$). Ainda assim, não é improvável que *Potamotrygon* sp. se aventure nas águas do Rio Branco. Uma vez que, esta arraia é a espécie mais comum e endêmica do Médio Rio Negro. Afinal, a barreira, se ela existe de fato, pode ser puramente físico-química, e não física. Porém, a estrutura das comunidade de algumas famílias de peixes na confluência do rios Negro e Branco reforçam a hipótese de que rios com características limnológicas distintas (juntamente com fatores ecológicos, como nicho, predação, competição, etc.) possam atuar como barreiras hidrográficas. Por exemplo, apenas 3 das 17 espécies de Gymnotiformes da família Apterontidae que ocorrem naquela área do Rio Negro também foram capturadas próximo à boca do Rio Branco (THOMÉ-SOUZA & CHAO, 2004). Por isso, a hipótese da barreira hidrográfica em *Potamotrygon* sp. é especulada como sendo um distúrbio no balanço

eletrolítico após exposição à água do Rio Branco, mesmo em curto espaço de tempo. No entanto, não se pode descartar que fatores ecológicos, como nicho, predação e competição possam atuar como os mais importantes fatores determinantes da distribuição geográfica dessa espécie. Porém, o papel destes fatores não foram objetivos deste estudo.

Em resumo, os mecanismos osmo-ionorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. estão adaptados à sobrevivência às águas extremamente diluídas e ácidas do Rio Negro. A rápida exposição às águas do Rio Branco provoca desequilíbrio iônico, com perda de sais, os quais, possivelmente, estão relacionados às falhas nos mecanismos osmorregulatórios das brânquias e dos rins. Portanto, a mistura das águas dos rios Branco e Negro na altura das coordenadas S01°23'25" W61°50'89" pode atuar como um dos fatores (além do substrato de fundo rochoso e fatores ecológicos) que delimitam a distribuição geográfica da arraia *Potamotrygon* sp., uma espécie endêmica do Médio Rio Negro.

7. CONCLUSÕES

- As concentrações dos íons K^+ , Ca^{2+} e da uréia plasmáticos e fluido perivisceral da arraia cururu, *Potamotrygon* sp., não foram significativamente afetadas pela exposição à água do Rio Branco;
- As concentrações da osmolalidade plasmática e dos íons Na^+ plasmático e Cl^- plasmático e do fluido perivisceral foram mais baixas nos animais expostos à água do Rio Branco.
- Os níveis da atividade da NKA branquial não foram significativamente diferentes nos dois ambientes, por outro lado a atividade da NKA renal nos animais expostos à água do Rio Branco foi menor.
- Não houve diferenças significativas no número de células-cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (lamela ou filamento) branquial entre os dois ambientes.
- As diferenças físicas e químicas da água juntamente com outros fatores (predação, substrato de fundo rochoso, entre outros) podem atuar como uma barreira para a distribuição geográfica de *Potamotrygon* sp;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M.L.G. **Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) no Médio Rio Negro, Amazonas.** Manaus, 164p. Dissertação (mestrado)-PPG-BTRN-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas (INPA/FUA), 1998.
- AUCOUR, A. M., TAO, F. X., MOREIRA-TURCQ, P., SEYLER, P., SHEPPARD, S. & BENEDETTI, M. F. The Amazon river: behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. *Chem. Geology*, v. 197, p. 271-285, 2003.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G. & ALMEIDA, M.P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, v. 34, p. 165-171, 2005.
- CLAIBORNE, J.B.; WALTON, J.S. & COMPTON-McCULLOUGH, D. Acid-base regulation, branchial transfers and renal output in a marine teleost fish (the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*) during exposure to low salinity. *Journal Experimental Biology*, v. 193, p. 79-95, 1994.
- 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 Review*. v. 85, p. 97–177, 2005.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M. & CHOE, K.P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation and nitrogen excretion. In *Biology of sharks and their relatives* (Carrier, J. C., Musick, J. A. & Heithaus, M. R., eds.), p. 247-268. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, p. 375-388, 1925.
- FREDERICO, R. G. **Filogenia e conservação de *Paratrygon aiereba* Dumeril (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica.** Dissertação de Mestrado, PPG-BTRN, Manaus, INPA/UFAM. 2006.
- GONZALEZ, R. J., PREEST, M. Mechanisms for exceptional tolerance of ion-poor, acidic waters in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). *Physiol. Biochem. Zool.*, v. 72, p. 156–163, 1999.
- GONZALEZ, R. J., WILSON, R. W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acid Rio Negro. *J. Fish Biol.*, v. 58, p. 1680-1690, 2001.
- GONZALEZ, R.J.; WILSON, R.W.; WOOD, C.M.; PATRICK, M.L. & VAL, A.L. Diverse strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 75, p. 37-47, 2002.
- HAZON, N.; WELLS, A.; PILLANS, R.D.; GOOD, J.P.; ANDERSON, W.G. & FRANKLIN, C.E. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch

fish with special reference to euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 136, p. 685-700, 2003.

- KANEKO, T. & KATOH, F. Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost with seawater preference. *Fisheries Science*, v. 70, p. 723-733, 2004.
- KONHAUSER, K.O.; FYFE, W.S.; KRONBERG, B.I. Multi-element chemistry of some Amazonian water and soils. *Chem. Geol.*, v. 111, p. 155-175, 1994.
- KÜCHLER, I.L.; MIEKELY, N. & FORSBERG, B.R. A Contribution to the Chemical Characterization of Rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 11, p. 286-292, 2000.
- LIN, C.H., TSAI, R.S. & LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138A, p. 287-295, 2004.
- LIN, Y.M.; CHEN, C.N. & LEE, T.H. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 135, p. 489-497, 2003.
- LIN, Y.M.; CHEN, C.N.; YOSHINAGA, T.; TSAI, S.C.; SHEN, I.D. & LEE, T.H. Short-term effects of hyposmotic shock on Na⁺/K⁺ -ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 135, p. 489-497, 2003. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 143, p. 406-415, 2006.
- MARTIN, R.A. Evolution and Zoogeography of freshwater elasmobranchs with notes on their conservation. In: *Biology of conservation of freshwater elasmobranchs* (Eds. MARTIN, A., MacKINLEY, D.). *Int. Cong. Biol. Fish. Manaus*, 2004.
- MATSUO, A. & VAL, A.L. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 989-1000, 2007.
- MYAZAKI, H.; KANEKO, T.; UCHIDA, S.; SASAKI, S. & TAKEI, Y. Kidney-specific chloride channel, OmCIC-K, predominantly expressed in the diluting segment of freshwater-adapted tilapia kidney. *Proceeding National Academy of Science*, v. 99, p. 15782-15787, 2002.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gill of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiology*, v. 59, p. 325-344, 1997.
- PERRY, S.F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYA, T.; FURIMSKY, M. & THOMAS, L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *Journal Experimental Zoology*, v. 300A, p. 53-62, 2003.

- 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*). *J. Exp. Biology*, v. 203, p. 2957-2966, 2000.
- PILLANS, R.D. & FRANKLIN, C.E. Plasma osmolyte concentration and rectal gland mass of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 138, p. 363-371, 2004.
- PISAM, M., BOEUF, G., PRUNET, P. & RAMBOURG, A. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *Am. J. Anat.*, v. 187, p. 21-31, 1990.
- RAMIREZ-GIL, H.; FELDBERG, E.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. & VAL, A.L. Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophysus macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1449-1458, 1998.
- SCOOT, G.R.; ROGERS, J.T.; RICHARDS, J.G.; WOOD, C.M. & SCHULTE, P.M. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *Journal Experimental Biology*, v. 207, p. 3399-3410, 2004.
- SULIKOWSKI, J.A. & MAGINNISS, L.A. Effects of environmental dilution on body fluid regulation in the yellow stingray, *Urolophus jamaicensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 128, p. 223-232, 2001.
- SULIKOWSKI, J.A.; TREBERG, J.R. & HOWELL, W.H. Fluid regulation and physiological adjustments in the winter skates, *Leucoraja ocellata*, following exposure to reduce environmental salinities. *Environmental Biology of Fishes*, v. 66, p. 339-348, 2003.
- THOMÉ-SOUZA, M.J.F. & CHAO, N.L. Spatial and temporal variation of benthic fish assemblages during the extreme drought of 1997-98 (El Niño) in the middle rio Negro, Amazonia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 2, p. 127-136, 2004.
- TOFOLLI, D. T. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado. PPG-BTRN, INPA/UFAM, Manaus, 2006.
- 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 blackwater of the Rio Negro. *J. Exp. Biology*, v. 205, p. 3039-3054, 2002.
- WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y.O.; WILSON, R.W.; GONZALEZ, R.J.; PATRICK, M.L.; PLAYLE, R.C. & VAL, A.L. Protection by natural blackwater against disturbances in ions fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 12-27, 2003.

9. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Adequação das metodologias dos ensaios enzimáticos (ATPases)	R	R	R									
2	Captura dos animais na natureza			R	R	R	R						
3	Análise das características físicas e químicas da água na natureza.			R	R	R	R	R					
4	Implementação dos protocolos experimentais.					R	R	R					
5	Laboratório: análise das características químicas da água.					R	R	R					
6	Laboratório: análise das características químicas do plasma.					R	R	R					
7	Relatório Parcial				R	R							
8	Laboratório: análise das enzimas.						R	R	R				
9	Manipulação dos dados estatísticos.								R	R	R		
10	Divulgação dos resultados em eventos científicos (congressos nacionais)											R	R
11	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	R

R: Realizados