



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

---



**Efeitos da salinidade sobre a osmorregulação da arraia cururu,  
*Potamotrygon* sp. (Potamotrygonidae: Elasmobranchii)**

Bolsista: Thaís de Almeida Corrêa Nogueira, 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/0053/2010-2011**

**Efeitos da salinidade sobre a osmorregulação da arraia cururu,**  
***Potamotrygon* sp. (Potamotrygonidae: Elasmobranchii)**

---

Bolsista: Thaís de Almeida Corrêa Nogueira

---

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

---

Co-Orientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira Costa

**Manaus**  
**2011**

## RESUMO

Os elasmobrânquios não são exclusivamente marinhos. Embora de origem marinha, os potamotrigonídeos estão adaptados ao ambiente estenohalino de água doce. Portanto, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da exposição da arraia cururu por 24h, 48h, 96h e 168h à água marinha artificial com salinidade de 10 psu sobre os parâmetros osmo-iorregulatórios. Após exposição nos intervalos 0, 24, 48, 96 e 168 horas analisou-se as concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , uréia e osmolalidade plasmáticos, além das atividades das bombas eletrogênicas ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível v-  $\text{H}^+$ ATPase) nas brânquias e nos rins. A exposição ao ambiente salino provocou um aumento nos teores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  plasmáticos, sem profundas alterações nas atividades das bombas iônicas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível v-  $\text{H}^+$ ATPase branquiais e renais. Embora a salinidade ambiental tenha afetado o balanço iônico, o teor de uréia não foi alterado no plasma. Apesar do ambiente externo, a arraia cururu se mantém amoniotélica e osmorregula, principalmente por meio dos eletrólitos  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . A ausência de efeito da salinidade ambiental sobre as bombas iônicas pode ser o resultado dos ajustes osmo-iorregulatórios para evitar um acúmulo ainda maior de eletrólitos. O conjunto destes dados sugere um sistema de ajuste gradativo nos mecanismos de transporte iônico para que estes possam operar tanto em ambiente de água doce quanto no ambiente salino.

**Palavras chave:** Potamotrygonidae, osmorregulação, arraia de água doce, salinidade

## ABSTRACTS

Elasmobranchs are not exclusively marine species. In spite of marine origin, potamotrygonids inhabit stenohaline environment, which are completely adapted. Therefore, this study consist in analyze the effects of exposure to artificial seawater (salinity 10 psu) for 24h, 48h, 96h and 168h on osmoregulation of cururu ray (*Potamotrygon* sp.). After exposure in the periods 0, 24, 48, 96 and 168 hours was analyzed the concentration of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , urea and osmolality on the plasma of stingrays, and the electrogenic pumps activity ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and NEM-sensitive v- $\text{H}^+$ ATPase) in gills and kidney of animals. The exposure to salt water cause an increases levels of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  in the plasma, without affect on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and NEM-sensitive v- $\text{H}^+$ ATPase in the gills and kidneys. Although the environment salinity has affected the ion balance, the level of urea has not changed in the plasma. Despite the external environment, cururu ray remains ammoniotelic and osmoregulates primarily through electrolytes  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . The absence effects on ion pumps may be due to the adjustment to avoid accumulation of electrolytes. This data suggests the existence of a gradual adjustment on the ion transport mechanism which can operate both in the freshwater and marine environments.

**Key-words:** Potamotrygonidae, osmoregulation, freshwater stingray, salinity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplar da espécie <i>Potamotrygon</i> sp. ....	8
Figura 2.	Variações nos teores de $\text{Na}^+$ e $\text{Cl}^-$ plasmáticos.....	14
Figura 3.	Contribuição total dos osmólitos $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ e uréia plasmáticos .....	15
Figura 4.	Variações nos teores de $\text{K}^+$ e $\text{Mg}^{+2}$ .....	16
Figura 5.	Variações nos teores de $\text{Ca}^{+2}$ .....	17
Figura 6.	Variações nos teores de uréia e osmolalidade.....	18
Figura 7.	Atividades de $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível $\nu\text{-H}^+$ -ATPase branquiais e renais....	19
Figura 8.	Relações entre as atividades da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível $\nu\text{-H}^+$ -ATPase branquiais e renais.....	21
Figura 9.	Modelo teórico proposto para o efeito da salinidade ambiental sobre as proteínas do sistema de transporte iônico nas brânquias da arraia cururu .....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média±desvio padrão do peso(g) e largura de disco(cm) dos animais .....	8
Tabela 2.	Média±desvio padrão das variáveis físico-químicas da água.....	12
Tabela 3.	Média±desvio padrão nas variações nos teores de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e Ca <sup>+2</sup> .....	12
Tabela 4.	Variações na razão Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> do plasma dos animais.....	15

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivo Específico.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Delineamento experimental .....	7
3.2 Coleta das amostras de tecidos .....	8
3.3 Análises dos íons .....	9
3.4 Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e NEM-sensível $\text{v-H}^+$ -ATPase	10
3.5 Análise estatística .....	11
4. RESULTADOS .....	11
4.1 Variáveis físicas e químicas da água .....	11
4.2 Efeitos da salinidade sobre a composição do plasma.....	13
4.3 Efeitos da salinidade sobre as bombas iônicas.....	19
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES.....	30
7. PERSPECTIVAS.....	30
8. REFERÊNCIAS .....	31
9. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES .....	35
10. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS REALIZADAS.....	36

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa de Microscopia Qualitativa/UFAM/CNPq 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 Nº 575369/2008-6) “Investigação sobre a mortalidade das arraias 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).



## 1. INTRODUÇÃO

A família Potamotrygonidae é considerada monofilética. Este grupo possui 22 espécies válidas em quatro gêneros: *Paratrygon*, *Heliotrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*. Os três primeiros gêneros são considerados basais dentro da família. O gênero *Paratrygon* ainda é monotípico (*P. aiereba*). *Heliotrygon* e *Plesiotrygon* possuem duas espécies cada. O gênero *Heliotrygon* foi recentemente descrito por Carvalho & Lovejoy, 2011 com duas novas espécies (*H. rosai* e *H. gomesi*). Uma nova espécie de *Plesiotrygon* foi recentemente descrita por Carvalho & Ragno (2011), portanto, este gênero inclui agora duas espécies (*P. iwamae* e *P. nana*). O gênero *Potamotrygon* é o mais especioso.

Sugere-se que os potamotrigonídeos descendem uma antiga linhagem de arraias marinhas e/ou eurihalinas. Vários autores têm discutido a possibilidade de que as invasões marinhas podem ter ocorrido a partir do mar do Caribe para o interior do continente sulamericano entre o Paleoceno-Mioceno, há aproximadamente 65-23 milhões de anos (LOVEJOY et al., 2006). As transgressões marinhas podem ter criado condições apropriadas para que uma fauna marinha/estuarina pudesse tolerar uma gradual dessalinização da água (HOORN, 1994). Este mesmo autor sugeriu que no final do Mioceno (15 m.a) o Alto Amazonas drenava pelo Paleo-rio Orinoco para um delta na região do Lago Maracaíbo. Esta sugestão é interessante, pois, atualmente duas espécies de arraias ocorrem tanto na bacia Amazônica quanto na do Orinoco (*Potamotrygon orbignyi* Castelnau 1855 e *Potamotrygon schroederi* Fernández-Yépez 1958). A presença de várias espécies basais da família Potamotrygonidae como *Paratrygon aiereba* Muller & Henle 1841, *P. schroederi* e *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) na bacia do Rio Negro sugere que uma fauna de potamotrigonídeos ancestral ficou bem estabelecida nesta bacia. Portanto, alguns autores sugerem que alguns habitats do Rio

Negro podem ser considerados relíquias hidrográficas remanescentes do Paleo-Rio Amazonas-Orinoco onde o ancestral dos potamotrigonídeos se desenvolveu durante o Mioceno (DUNCAN & FERNANDES, no prelo).

Alguns autores citam diferentes processos morfofisiológicos relacionados à evolução da tolerância dos potamotrigonídeos no ambiente de água doce, tais como inabilidade para acumular uréia nos tecidos como soluto osmorregulador (TAM et al., 2003; DUNCAN et al., 2009), presença de albumina no plasma (GRIFFITH et al., 1973), modificação nos órgãos eletrosensoriais (SHIBUYA et al., 2010) e glândula rectal não-funcional (THORSON et al., 1978). Vários estudos têm demonstrado que a osmorregulação dos potamotrigonídeos ocorre de maneira similar aos teleósteos de água doce e é caracterizada pela baixa concentração de eletrólitos (GRIFFITH et al., 1973).

Segundo a hipótese de Lovejoy et al. (1998), o ancestral dos Potamotrygonidae pode ter sido um grupo próximo do gênero *Himantura* Muller & Henle 1837 (Dasyatidae), uma vez que vários membros desse gênero são encontrados tanto em águas salobras, quanto em ambiente de água doce. Um trabalho proposto por Dunn et al. (2003) sustenta a hipótese de Lovejoy et al. (1998) e sugere que o ancestral *Potamotrygon* pode ter seguido um caminho: marinho → eurihalino → água doce.

Uma distinção fisiológica entre arraias de água doce estenohalinas e eurihalinas pode ser descrita pelas suas diferenças osmorregulatórias. Nas arraias marinhas e/ou eurihalinas a osmolalidade do plasma é quase sempre <600 mosmol/kg (EVANS et al., 2005), enquanto nos potamotrigonídeos estes valores são geralmente <350 mosmol/kg (WOOD et al., 2002; DUNCAN et al., 2009). Além disso, elasmobrânquios marinhos osmorregulam por meio da uréia (>300 mmoles/l), enquanto as arraias de água doce possuem baixos valores para este osmólito (<5 mmoles/l) e osmorregulam por meio de

eletrólitos, especialmente pelos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (EVANS et al., 2004; DUNCAN et al., 2009).

Desde que Thorson et al. (1967) relatou que os potamotrigonídeos possuem baixos valores de uréia quando comparados aos condríctios marinhos, autores como Griffith et al. (1973) demonstraram que *Potamotrygon* sp. quando exposta a um ambiente salino de 20,6 psu apresenta um ligeiro aumento da osmolaridade e íons plasmáticos, porém sem alterar substancialmente os níveis de uréia em seus tecidos. Por outro lado, quando a arraia eurialina *Himantura signifer* Copagno & Robert 1982 é transferida da água doce para a água do mar, este animal aumenta significativamente a osmolaridade, principalmente acumulando uréia como principal osmólito (TAM et al., 2003). Além disso, quando os elasmobrânquios eurialinos marinhos *Carcharhinus leucas* Muller & Henle 1839, *Urolophus jamaicensis* Cuvier 1816 e *Leucoraja ocellata* Mitchill 1815 são mantidos em ambiente de água doce estes animais apresentam uma redução significativa na osmolalidade,  $[\text{Na}^+]$  e  $[\text{Cl}^-]$ . Embora a [uréia] seja baixa, ainda assim os valores estão  $>150$  mmol/l (PILLANS & FRANKLIN, 2004). Ainda que as condições de salinidade ambiental mudem substancialmente, os elasmobrânquios eurialinos continuam ureogênicos e ureotélicos, enquanto os potamotrigonídeos permanecem amoniotélicos (WOOD et al., 2002).

No ambiente de água doce, os potamotrigonídeos estenohalinos são hiperosmóticos em relação ao meio. Como a osmorregulação depende da relação entre soluto-solvente entre os dois compartimentos (animal *versus* ambiente), as arraias precisam resolver dois grandes desafios osmorregulatórios: o imenso influxo de água e a perda excessiva de íons. O aumento da excreção urinária é bem documentado em elasmobrânquios eurialinos expostos à água doce (ANDERSON et al., 2007). Porém, o aumento do fluxo urinário pode potencializar a perda iônica para a água. Para

compensar a perda difusional (e aquela excretada pela urina), os eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{+2}$ ) são absorvidos ativamente pelas brânquias e reabsorvidos ativamente pelos túbulos renais (EVANS et al., 2005). Porém, nada se sabe como este mecanismo pode funcionar nos potamotrigonídeos expostos a uma condição adversa como no ambiente salino.

Para que os peixes de água doce possam tolerar o aumento gradual na salinidade ambiental são necessários ajustes nas vias de secreção dos íons pelas células do epitélio branquial (WOOD & MARSHALL, 1994). As células cloreto são os principais sítios para excreção e tomada de íons em peixes adultos, inclusive para elasmobrânquios (WILSON et al., 2002). Nestas células, as bombas iônicas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPases localizam-se em vasta área tubular contínua à região basolateral (PIERMARINI & EVANS, 2000; DUNCAN et al., 2011). A identificação de células ricas em mitocôndrias ricas em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase (NKA-MRC) no epitélio branquial de diversas espécies de potamotrigonídeos tem sido recentemente descrito (DUNCAN et al., 2010). Curiosamente, as NKA-MRCs da arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) organizam-se no filamento branquial formando um sistema folicular até então não observado em outros animais (DUNCAN et al., 2011). Um dos primeiros modelos propostos para o transporte de íons no epitélio branquial envolvendo a bomba eletrogênica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase foi elaborado por Silva et al. (1977), sendo revisto por Hirose et al., 2003. Conforme este modelo, em teleósteo de água doce o papel da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase é criar um gradiente eletroquímico para que o  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  possam tomados pela região apical das células cloreto. Enquanto que, para teleósteos marinhos a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase favorece a excreção de  $\text{Cl}^-$ , enquanto o excesso de  $\text{Na}^+$  é eliminado por uma via paracelular. A existência de uma bomba prótons ( $\text{H}^+$ -ATPase) do tipo vacuolar (ATPase tipo v) tem sido proposta como um modelo alternativo para a

absorção de  $\text{Na}^+$ . As propriedades farmacológicas (LIN & RANDALL, 1993) e a imunolocalização celular (LIN et al., 1994) de uma bomba  $\text{H}^+$  sensível ao N-etilmaleimida (NEM) foram descritas para truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). A NEM seinsível-v- $\text{H}^+$ -ATPase é um heteroligômero com 300-700 kDa já identificado nas brânquias dos teleósteos (LIN et al., 1994), em elasmobrânquios marinhos e eurialinos (EVANS et al., 2005). Porém, a relação funcional entre a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase e a NEM seinsível-v- $\text{H}^+$ -ATPase nos órgãos osmorreguladores (brânquias e rins) nunca foi estabelecida.

Piermarini & Evans (2000; 2001) realizaram um elegante experimento para demonstrar que na arraia eurihalina, *Dasyatis sabina* Leseuer 1824, tanto a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase quanto a bomba de prótons v- $\text{H}^+$ -ATPase são induzidas à medida que a salinidade da água diminui. Usando métodos imunoquímicos, Piermarini & Evans (2001) notaram que a densidade de células ricas em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase aumentou além de apresentar localização predominantemente sobre a superfície lamelar. Por outro lado, as células ricas em v- $\text{H}^+$ -ATPase localizam-se sobretudo na região interlamelar nas brânquias das arraias aclimatadas na água doce. Baseando-se nestes resultados, os autores propuseram um modelo não usual para a troca iônica no epitélio branquial das arraias eurihalinas; as brânquias de elasmobrânquios existem dois tipos de ionócitos: o tipo rico em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase fornece energia para a tomada de  $\text{Na}^+$  via excreção de  $\text{H}^+$ , enquanto o tipo rico em v- $\text{H}^+$  - ATPase favorece a tomada de cloreto eliminando  $\text{HCO}_3^-$  via co-transporte antiporte. Portanto, a localização topográfica destas células no epitélio branquial é distinta.

Wood et al. (2002) demonstraram que os mecanismos de regulação iônica na arraia cururu (*Potamotrygon* sp., espécie ainda não descrita) são concordantes com o modelo proposto por Piermarini & Evans (2001). A arraia cururu é uma arraia

estenohalina, endêmica das águas pobres em íons do Médio Rio Negro. De acordo com Wood et al. (2002), ao longo da história evolutiva do grupo, o sistema de troca iônica originalmente desenhado para as funções no ambiente marinho foi moldado de maneira que adotasse uma estratégia de adaptação osmorregulatória similar às dos ciclídeos (WILSON et al., 1999) que habitam estas águas, ou seja, um sistema de transporte iônico de afinidade baixa em águas ácidas, porém apresenta uma reduzida taxa de perda iônica.

A despeito das informações citadas anteriormente e dos modelos vigentes para elasmobrânquios eurialinos, este trabalho visa propor um novo modelo para os mecanismos do sistema de transporte iônico baseando-se nos estudos com a arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) exposta à salinidade ambiental. Este modelo pode auxiliar no entendimento dos prováveis efeitos da salinidade ambiental sobre a fauna aquática nos estudos de modelagem dos futuros cenários que prevêm uma elevação do nível do mar como uma consequência do efeito do aquecimento global.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar os efeitos da salinidade (10 psu) da água sobre os processos osmorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar as alterações na concentração química (íons, uréia e osmolalidade) do plasma de *Potamotrygon* sp. após exposição por 0, 24, 48, 96 e 168 horas à salinidade de 10 psu;

- Analisar os efeitos das atividades das bombas eletrogênicas ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  e NEM sensível v- $\text{H}^+\text{ATPase}$ ) nas brânquias e rins de arraiais *Potamotrygon* sp. após exposição 0, 24, 48, 96 e 168 horas à salinidade de 10 psu;

- Propor um modelo para os mecanismos e processos fisiológicos afetados ou não pela exposição crônica da arraia *Potamotrygon* sp. à salinidade de 10 psu.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

Cinquenta e quatro exemplares da arraia cururu (*Potramotrygon* sp., figura 1, tabela 1) pesando  $38,4\text{g}\pm 10,15$  e comprimento total  $7,9\text{cm}\pm 5,4$  foram capturados no Médio Rio Negro (região de Barcelos,  $\text{S}00^{\circ}35.765' \text{ W}063^{\circ}01.729'$ ). Os animais foram transportados até as dependências do Laboratório de Morfologia Funcional do Departamento de Morfologia da UFAM e aclimatados em piscinas de 1000 litros durante 14 dias. As arraias foram alimentadas diariamente com minhocas durante todo período de aclimação. A alimentação foi suspensa 24 horas antes dos experimentos. As arraias foram divididas em 18 unidades experimentais. Cada unidade experimental consistia de três arraias mantidas num monobloco plástico (basqueta) medindo  $60\times 40\times 20$  cm com 10 litros de água. Os grupos controles e experimentais (salinidade 10 psu) foram inteiramente casualizados. Os animais foram mantidos nestes grupos experimentais nos seguintes intervalos de tempo: 0, 24, 48, 96 e 168 horas (grupos controles e experimentais). A necessidade de vários grupos controles temporais deve-se ao fato de eliminar possíveis efeitos decorrentes do confinamento nas unidades experimentais. A adição de sal marinho artificial (produtos do Mar Vermelho, Herzilia Pituäch, Israel, Red Sea – Coral Pro Salt foi gradual  $2,5$  psu/hora até a salinidade final

de 10 psu. Os valores de salinidade foram mantidos constantes com renovação (1/2 do volume) diária da água e controlados com auxílio de um analisador multiparâmetro CONSORT® C535. De maneira similar, a água dos grupos controles foi renovada diariamente em 1/2 do volume para evitar acúmulo de material nitrogenado de excreção como a amônia.



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

Tabela 1. Média±desvio padrão do peso(g) e largura de disco(cm) dos animais utilizados nos grupos controles e experimentais (salinidade 10 psu).

<b>Condição</b>		<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>96h</b>	<b>168h</b>
	Peso (g)	33,7±8,8	30,2±2,2	31,9±3,8	51,9±17,9	30,5±8,3
<b>Controle</b>	Larg. disco (cm)	8,9±1,4	8,8±1	9,4±0,2	11,2±1,4	9,4±0,9
	Peso (g)	-	31,6±4,3	38,4±5,8	62,1±16,7	35,5±3,5
<b>Salinidade</b>	Larg. disco (cm)	-	9,4±1,6	9,7±0,5	11,6±1,2	9,6±0,7

### 3.2 Coleta das amostras de tecido

Ao final de cada tempo de exposição, os animais foram anestesiados com triclaína metanosulfonada, MS 222 (0,5 g/l), pesados e medidos. Após a perda do



equilíbrio, o sangue foi imediatamente retirado por meio de punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação e armazenado para posterior análise da composição química e osmolalidade. As brânquias e rins de cada arraia foram retirados após incisão cirúrgica na região ventral e imediatamente congelados para análise das  $Mg^{+2}$  - ATPases.

### 3.3 Análises dos íons

A concentração dos íons  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{+2}$  presentes na água utilizada nos experimentos foi analisada por fotometria de chama (Digimed® DM-61). Os teores de  $Na^+$  e  $K^+$  do plasma foram analisados pelo mesmo método. As concentrações de  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{+2}$  e uréia plasmáticos foram analisados por meio de “kits” comerciais. O kit Labest® foi utilizado para as análises de  $Cl^-$  e  $Mg^{+2}$ . O sistema de determinação colorimétrica de cloretos consiste na reação dos íons cloreto presentes na amostra com tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrico e íons tiocianato. Os íons tiocianato combinados com íons férricos presentes no reagente de cor formam tiocianato férrico com coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloreto. O sistema de determinação do magnésio consiste na reação de íons magnésio com magon sulfonado que formam um complexo róseo em meio alcalino. A intensidade de cor é proporcional à quantidade de íons magnésio presente no plasma. Para análise de  $Ca^{+2}$  foi utilizado o kit Doles®. O sistema de determinação colorimétrico para o cálcio ocorre através de um complexo corado com Cresolftaleína em meio alcalino. Na determinação de uréia foi utilizado o kit Human® do Brasil. O sistema de determinação da uréia realizado foi o teste enzimático-colorimétrico. A hidrólise da uréia na presença da urease produz amônia e  $CO_2$ . Na reação de Berthelot, o íon amônio reage com o salicilato e hipoclorito de sódio formando uma coloração verde proporcional à

concentração de uréia. A osmolalidade plasmática foi analisada por meio de osmômetro da marca  $\mu$ -Osmette Precision®. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

### **3.4 Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e NEM-sensível $\text{v-H}^+$ -ATPase**

As amostras de brânquias e rins foram homogeneizadas manualmente em tampão SEI (sacarose 300 mM, EDTA 1 mM, imidazol 30 mM, em pH 7,3) na presença de inibidores de proteases (phenylmethylsulfonylfluoride, PMSF 1 mM e pepstatine 1 mM) e centrifugados durante 5 minutos (centrífuga SIGMA® 30K). O sobrenadante foi retirado e usado para a análise da concentração de proteínas totais e atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e NEM-sensível  $\text{v-H}^+$ -ATPase.

Para determinação da atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, os extratos crus foram incubados (1:20 v:v) em tampão contendo:  $\text{Na}^+$  100 mM,  $\text{Mg}^{+2}$  25 mM, EDTA 1 mM, ATP 5mM, imizadol 25 mM, em pH 7,4. Após a incubação de 60 minutos foi analisada a diferença de concentração de fosfato inorgânico (Pi) formado nas amostras sem o inibidor, porém com  $\text{K}^+$  30mM e com o inibidor da enzima (ouabaína 3 mM para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e N-Ethyl maleimide, NEM 2 mM) na ausência de  $\text{K}^+$ .

As leituras de absorbância do Pi foram feitas no espectrofotômetro (SPECTRUM® UV-2000) em comprimento de onda  $\lambda$ 620nm utilizado uma solução ácida (ácido sulfúrico 675,3 mM) de molibdato de amônia (9,2 mM) e sulfato ferroso (345,3 mM). As atividades das bombas iônicas estão expressas em  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg proteína/h.

As análises de proteínas totais foram realizadas pelo método do biureto com utilização do “kit” In Vitro Diagnóstica®. As proteínas reagem com o sal de cobre em solução alcalina formando um complexo azul. A intensidade de cor é proporcional à

concentração de proteínas presentes nos extratos crus. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### **3.4 Análise estatística**

Todos os dados estão apresentados como média±desvio padrão. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Kolmogorov-Smirnov. Nos casos de rejeição da  $H_0$ , os dados foram  $\log_{10}$ -transformados e resubmetidos ao teste de homogeneidade. O teste t de Student foi usado para comparar as médias dos dados do grupo controle *versus* tratamento dentro de cada intervalo de tempo. O teste ANOVA foi utilizado para comparações entre as médias dos intervalos de tempo dentro do mesmo grupo experimental. O teste *post-hoc* de Dunnett foi utilizado para identificar quais intervalos de tempo foram diferentes do grupo controle (tempo 0 h). Análises de regressão e/ou correlação foram feitas entre as variáveis (fisiológicas e bioquímicas) como forma de encontrar explicações e/ou relações entre tais variáveis. Em todos os casos o nível de significância aceito foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Variáveis físicas e químicas da água**

Os perfis das variáveis físicas e químicas da água nas unidades experimentais estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Comparando os grupos controles *versus* grupos experimentais, apenas o pH não sofreu alteração significativa após 168 horas de exposição salina. Nos grupos controles o pH variou de 5,2 a 7,6, enquanto nos grupos experimentais esta variação foi de pH 4,8 a 8,8 (Tabela 2). Nas unidades do grupo controle a salinidade da água foi mantida em 0 psu durante todos os intervalos de tempo. A adição de sal marinho artificial na água provocou um incremento na média de

condutividade da água de  $33,1 \pm 12,9$  para  $17.287,5 \pm 1316,3$   $\mu\text{S/cm}$  e nos teores de sólidos totais de  $17,4 \pm 6,6$  para  $9.737,5 \pm 805,23$   $\text{mg/l}$ .

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão das variáveis físico-químicas da água (pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos, TDS) nos grupos controles e experimentais. Os animais foram submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24h, 48h, 96h e 168h.

Condição	pH		Condutividade		TDS	
	Controle	Sal	Controle	Sal	Controle	Sal
0 h	5,9 $\pm$ 0,01	-	33,3 $\pm$ 0,6	-	17,7 $\pm$ 0,2	-
24 h	5,2 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 1,1	29,7 $\pm$ 2,3	16.400 $\pm$ 0	15,8 $\pm$ 1,3	9.150 $\pm$ 71
48 h	6,1 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,6	24,9 $\pm$ 5,6	16.850 $\pm$ 354	13,2 $\pm$ 3,0	9.450 $\pm$ 212
96 h	7,6 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 1,1	54,0 $\pm$ 15,4	19.350 $\pm$ 212	28,2 $\pm$ 7,5	11.000 $\pm$ 141
168 h	6,1 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,03	23,5 $\pm$ 2,5	16.550 $\pm$ 636	12,4 $\pm$ 1,1	9.350 $\pm$ 354

Como esperado, os teores dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  aumentaram 2.701,19 x, 134,50 x e 637,21 x (Tabela 3), respectivamente após adição de sal marinho artificial para se obter uma água salina 10 psu. Onde  $[\text{Na}^+] > [\text{Ca}^{+2}] > [\text{K}^+]$  na água com salinidade de 10 psu.

Tabela 3. Média±desvio padrão nas variações nos teores de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> nos grupos controles e experimentais. Os animais foram submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24h, 48h, 96h e 168h.

Condição	Na <sup>+</sup> (ppm)		K <sup>+</sup> (ppm)		Ca <sup>+2</sup> (ppm)	
	Controle	Sal	Controle	Sal	Controle	Sal
0 h	1,5±0	-	1,6±0	-	1,1±0	-
24 h	4,3±7,3	5.270±339	1,9±0,3	275±14	1,1±0,04	730±14
48 h	1,0±0,1	5.310±35	1,6±0,1	270±14	1,1±0,01	732,5±4
96 h	1,2±0,1	4.593±60	2,4±0,2	155±7	0,8±0	430±14
168 h	1,3±0,7	4.730±375	1,4±0,1	255±0	1,1±0	715±7

#### 4.2 Efeitos da salinidade sobre a composição química do plasma

As variações nas concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> plasmáticos estão apresentados na figura 2. Os exemplares dos grupos controles não apresentaram alterações aparentemente nos níveis de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> em nenhum dos intervalos de tempo estudados. Os animais mantidos na água com salinidade 10 psu apresentaram níveis de Na<sup>+</sup> significativamente mais elevados no plasma dos animais expostos 24h e 48h (p<0,05), que naqueles do grupo controle (tempo 0, salinidade 0 psu). Após este período, os teores deste íon retornaram aos valores do grupo controle. Os níveis de Cl<sup>-</sup> permaneceram elevados durante todos os intervalos de exposição à salinidade (p<0,05). A razão Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> não variou entre os intervalos dos grupos controles, bem como entre os grupos experimentais ao longo do tempo de exposição (Tabela 4). Os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> foram os eletrólitos mais importantes que contribuíram para a osmolalidade total no plasma das arraias estudadas (figura 3). Porém a osmolalidade medida foi na maioria dos casos inferior àquela estimada a partir do somatório dos osmólitos presentes no plasma.

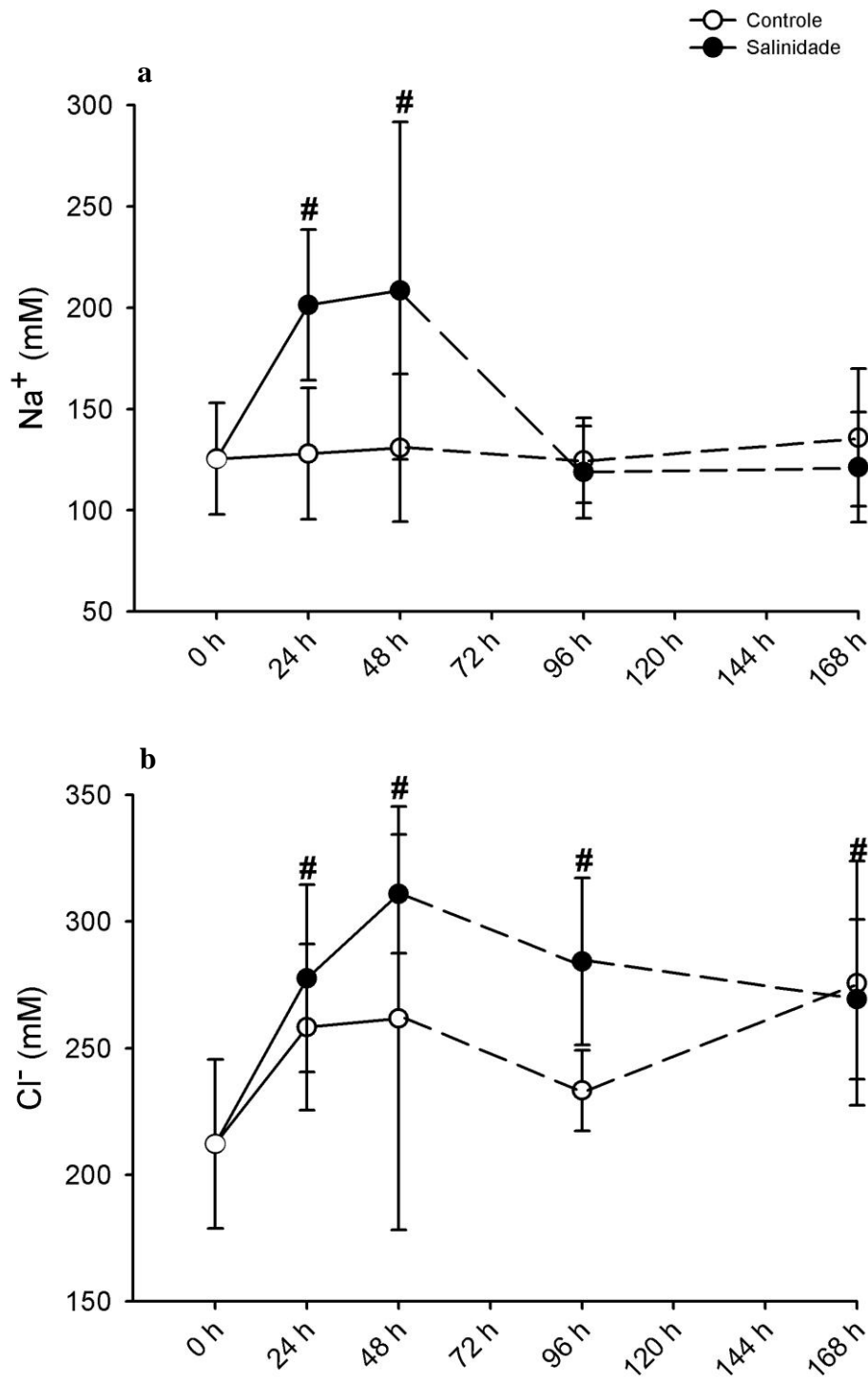


Figura 2. Variações nos teores de Na<sup>+</sup> (a) e Cl<sup>-</sup> (b) plasmáticos nos grupos controles (○) e experimentais (●). Os animais dos grupos experimentais foram submetidos à água salina de 10 psu durante os seguintes intervalos de tempo: 24 h, 48 h, 96 h e 168 h. (#) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (tempo 0 e salinidade 0 psu)

Tabela 4. Variações na razão  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  do plasma de animais nos grupos controle e experimentais. Os animais do grupo experimental foram expostos à água salina de 10 psu durante os seguintes intervalos de tempo: 0h, 24h, 48h, 96h e 168h.

Condição	0h	24h	48h	96h	168h
Controle	$0, \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$
Salinidade	-	$0,7 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$

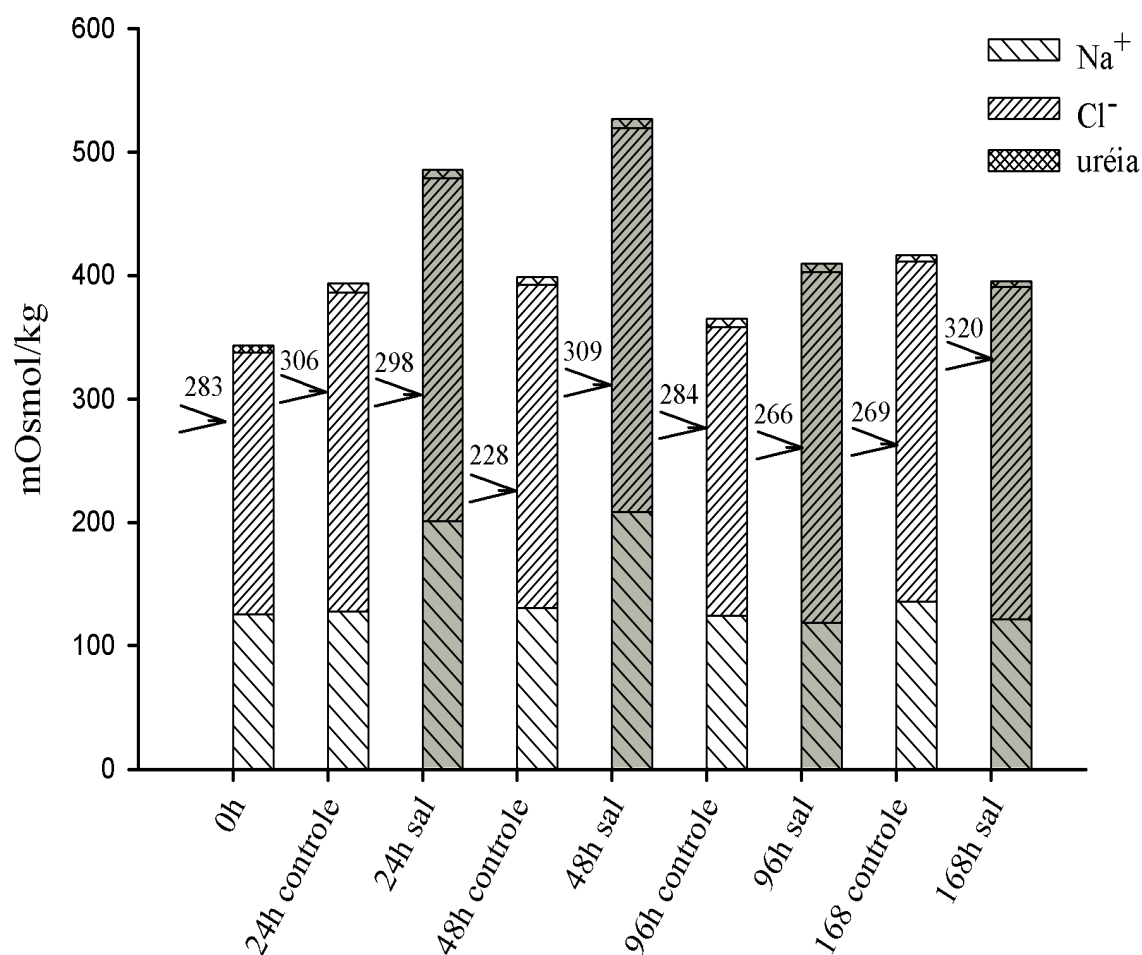


Figura 3. Contribuição total dos osmólitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e uréia plasmáticos nos grupos controles e experimentais. Os animais submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24 h, 48 h, 96 h e 168 h. Os valores indicados na seta representam os dados de osmolaridade medida no plasma.

As variações na concentração de  $K^+$  e  $Mg^{+2}$  plasmáticos estão representadas na figura 4 (**a** e **b** respectivamente). A concentração de  $K^+$  não variou no plasma dos animais expostos ao sal. Porém, observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo controle de 48 h. A  $[Mg^{+2}]$  plasmática aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos exemplares mantidos no grupo controle de 168 h, bem como nas arraias expostas à salinidade de 10 psu durante os intervalos de 96 h e 168 h.



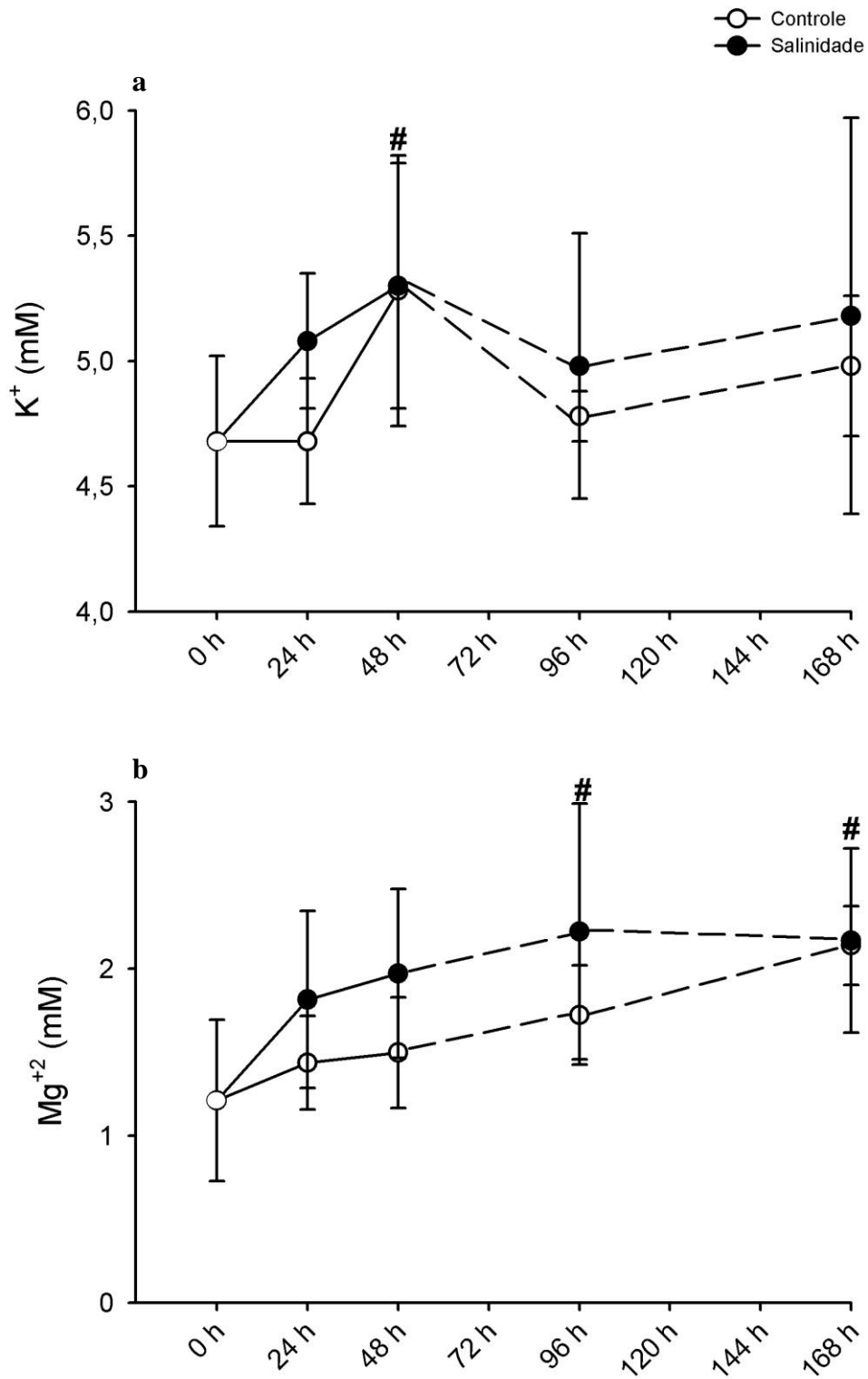


Figura 4. Variações nos teores de  $K^+$  (a) e  $Mg^{+2}$  (b) nos grupos controles (○) e experimentais (●). Os animais dos grupos experimentais foram submetidos à água salina de 10 psu durante os seguintes intervalos de tempo: 24 h, 48 h, 96 h e 168 h. (#) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (tempo 0 e salinidade 0 psu).

Os teores de  $\text{Ca}^{+2}$  plasmáticos não variaram ao longo do tempo dos animais dos grupos controles. A adição de sal provocou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na  $[\text{Ca}^{+2}]$  das arraias mantidas apenas no grupo 24 h. No entanto, comparando-se o grupo controle e salino no intervalo de 96 h, observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ; teste *t* Student) nos teores deste íon (figura 5).

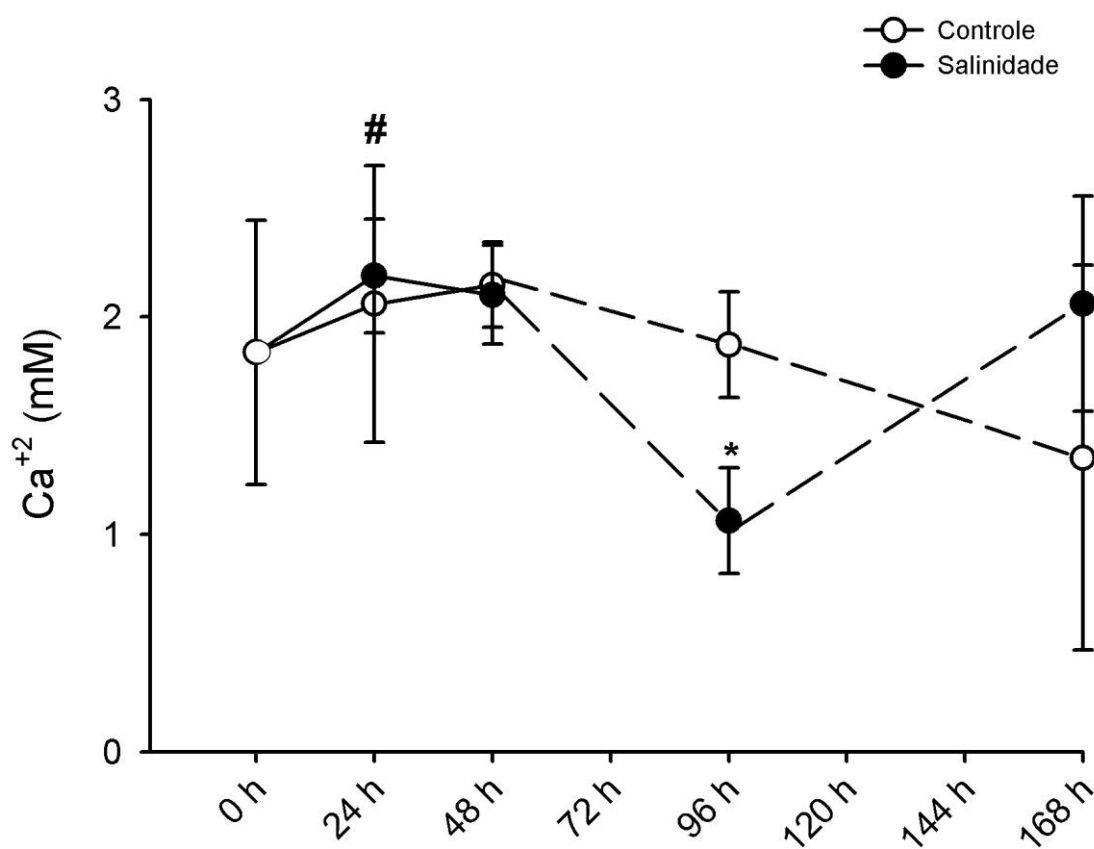


Figura 5. Variações nos teores de  $\text{Ca}^{+2}$  nos grupos controles (○) e experimentais (●). Os animais submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24 h, 48 h, 96 h e 168 h. (#) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (tempo 0 e salinidade 0 psu), ANOVA (post hoc, teste de Dunnett). (\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (teste *t* Student).

A variação na concentração de uréia e osmolalidade plasmáticas estão apresentadas na figura 6. Não houve diferenças significativas dos grupos controle e experimentais para estas variáveis.

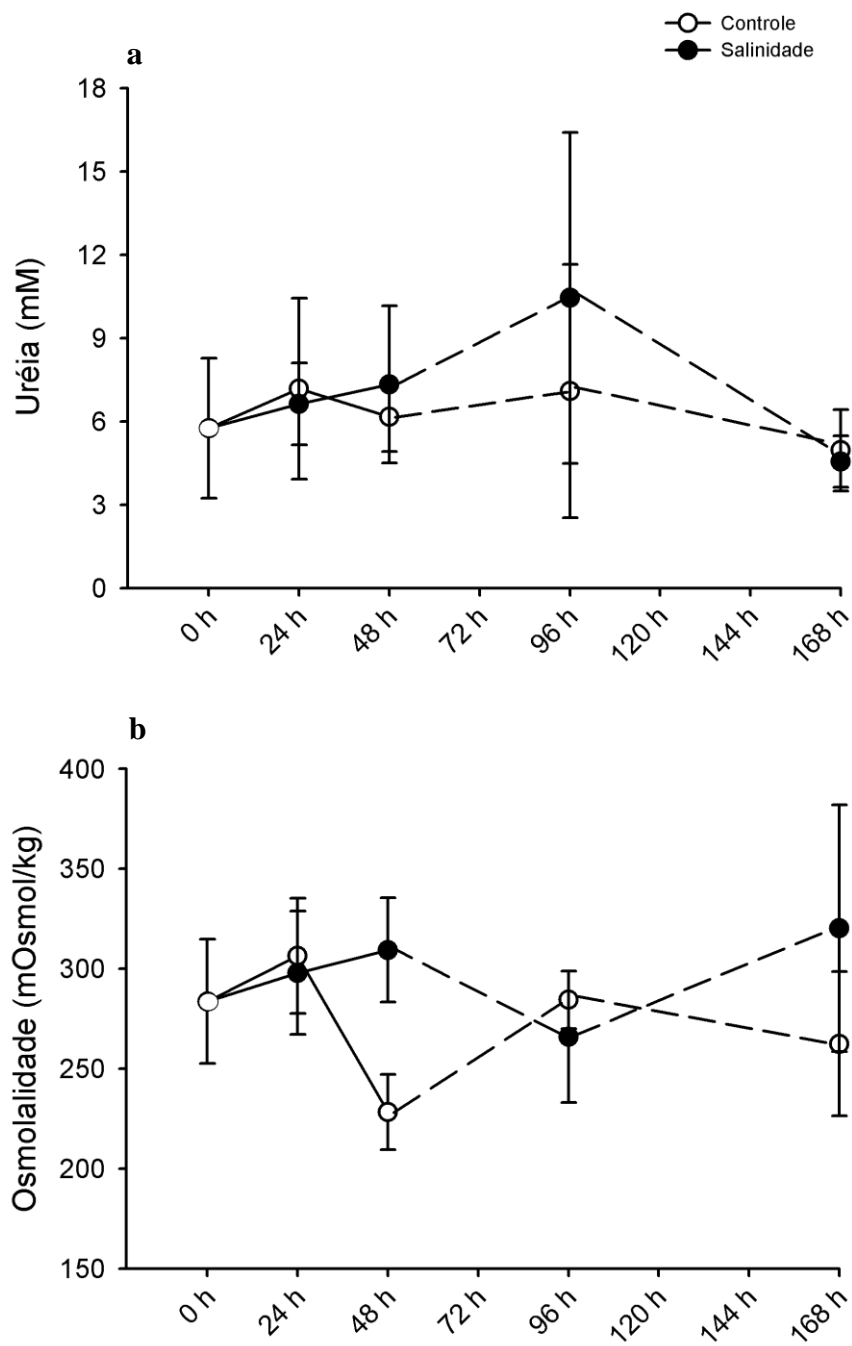


Figura 6. Variações nos teores de uréia (a) e osmolalidade (b) nos grupos controles (○) e experimentais (●). Os animais submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24h, 48h, 96h e 168h.

### 4.3 Efeitos da salinidade sobre atividade das bombas iônicas

Na figura 7 estão apresentadas as variações nas atividades das  $Mg^{+2}$ -ATPase ( $Na^+/K^+$ -ATPase e NEM-sensível  $v$ - $H^+$ -ATPase) branquiais e renais. Não houve diferenças significativas (ANOVA, teste de Dunnett) ao longo dos tratamentos (controle e salinidade). Porém, comparando-se os grupos controle e salinidade no intervalo de 48 h, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ; teste  $t$  Student) nos níveis de atividade dessas bombas iônicas nos rins dos animais expostos ao sal (figura 7b).

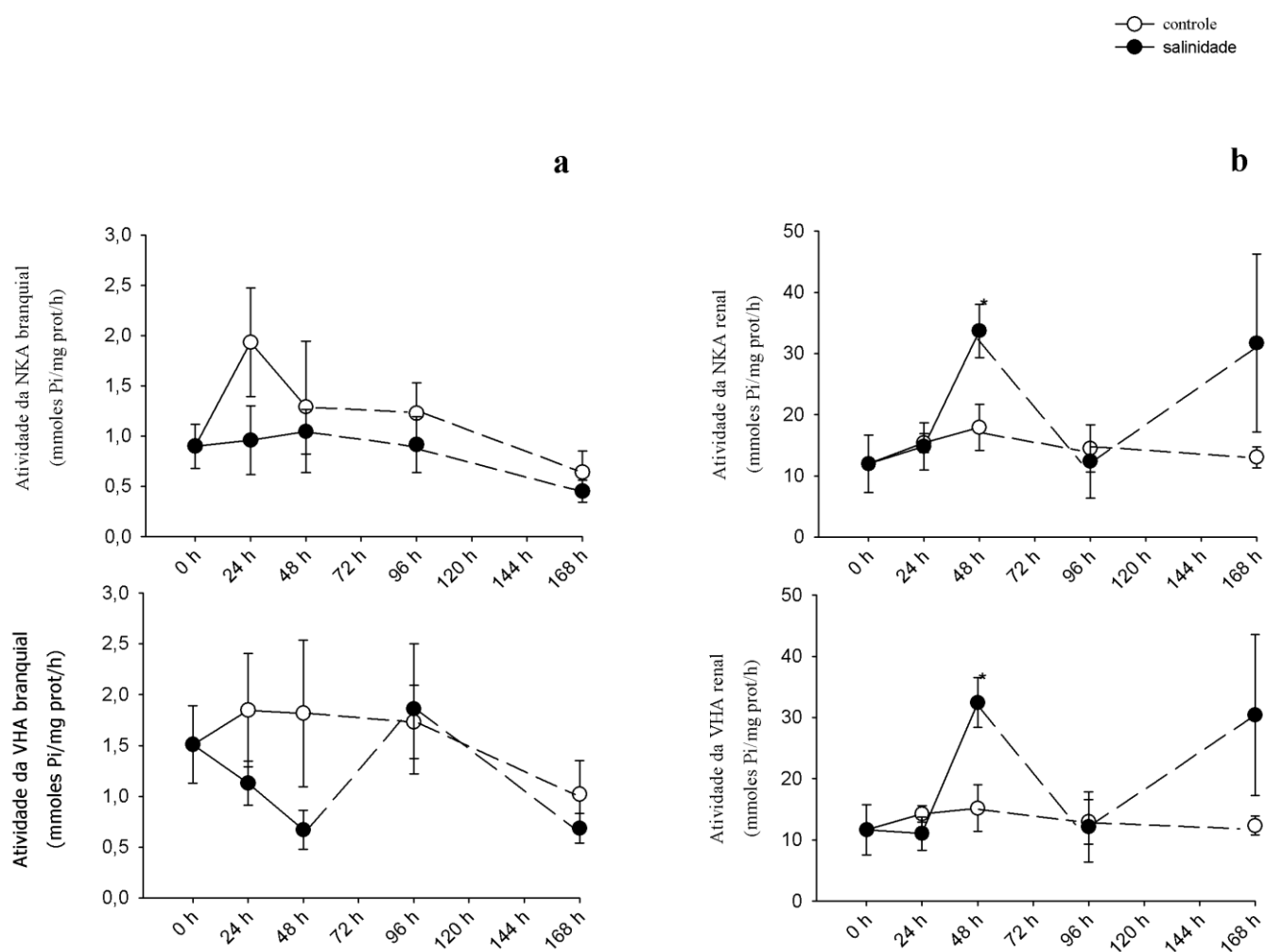


Figura 7. Variações nas atividades de  $Na^+/K^+$ ATPase e NEM-sensível  $v$ - $H^+$ -ATPase branquiais (a) e renais (b) nos grupos controles (○) e experimentais (●). Os animais submetidos à água salina de 10 psu durante os intervalos de tempo de: 24 h, 48 h, 96 h e 168 h. (\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (teste  $t$  Student).

Nos rins das araias, tanto dos grupos controles quanto do grupo experimental, observa-se uma relação significativa diretamente proporcional entre os níveis de atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e NEM-sensível  $v\text{-H}^+$ -ATPase (figura 8a). Para os grupos controles a equação da regressão foi:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase =  $0,68 + \text{NEM-sensível } v\text{-H}^+$ -ATPase  $\times (0,91)$ ;  $r^2=0,98$ ;  $p<0,05$ . Enquanto que para os grupos experimentais a equação foi dada como:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase =  $0,25 + \text{NEM-sensível } v\text{-H}^+$ -ATPase  $\times (0,92)$ ;  $r^2=0,99$ ;  $p<0,05$ .

Nas brânquias dos animais observou-se apenas uma relação significativa entre os níveis de atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e NEM-sensível  $v\text{-H}^+$ -ATPase do grupos controles (figura 8b). Para estes grupos, a equação da regressão foi:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase =  $0,52 + \text{NEM-sensível } v\text{-H}^+$ -ATPase  $\times (0,89)$ ;  $r^2=0,66$ ;  $p<0,05$ . Entretanto para os grupos expostos à salinidade a equação foi dada como:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase =  $0,99 + \text{NEM-sensível } v\text{-H}^+$ -ATPase  $\times (0,21)$ ;  $r^2=0,017$ ;  $p>0,05$ .

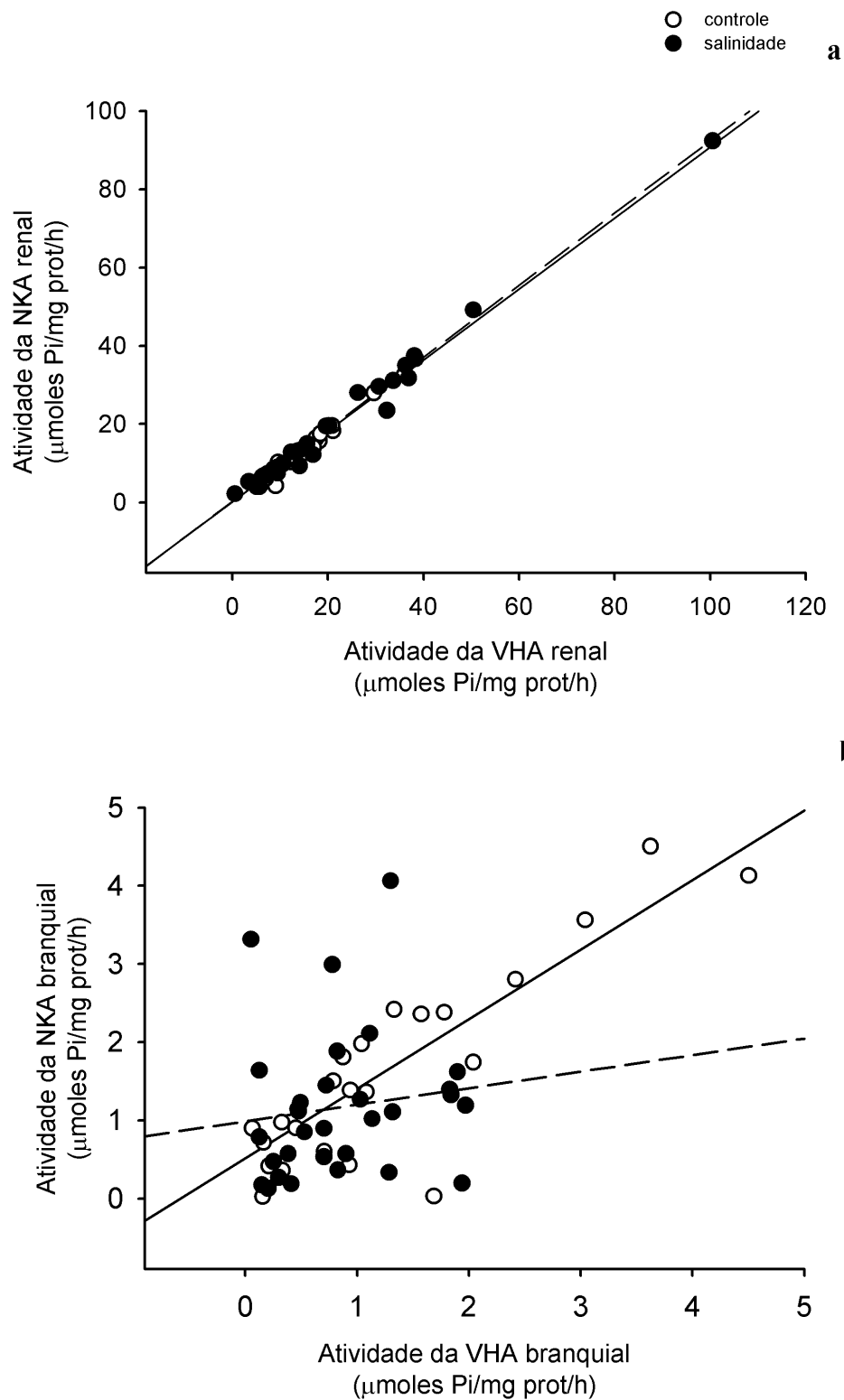


Figura 8. Relações entre as atividades da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível  $\text{v-H}^+$ -ATPase renais (a) e branquiais (b) nos grupos controles (○) e experimentais (●). As análises de regressão foram feitas com os dados agrupados dos animais de um mesmo tratamento, e de diferentes intervalos de tempo.

## 5. DISCUSSÃO

A exposição à água marinha artificial (10 psu) após 48 h provocou um desequilíbrio iônico sobre os teores dos principais eletrólitos plasmáticos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ), porém sem alterações nas atividades específicas das bombas eletrogênicas ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível v- $\text{H}^+$ -ATPase) nos rins e nas brânquias da arraia cururu (*Potamotrygon* sp.). Esta arraia foi capaz de osmorregular por meio destes eletrólitos e não acumulou uréia no plasma como fazem as arraias e outros elasmobrânquios marinhos (PILLANS & FLANKIN, 2004).

As alterações que ocorreram na  $[\text{K}^+]$  do plasma (no grupo controle em 48h) e  $[\text{Mg}^{+2}]$  (no controle 168h) estão mais associadas ao estresse pelo confinamento dos peixes que pelo aumento da salinidade ambiental. O aumento na concentração dos íons potássio, magnésio e cálcio no confinamento podem estar diretamente relacionados à perda da integridade da plasmalema dos miócitos liberando estes íons para o plasma, tal como ocorre em *Carcharhinus obscurus* Lesueur 1818 (CLIFF & THURMAN, 1984) e *Chacharhinus leucas* Muller & Henle 1839 (THORSON et al. 1973) durante o manuseio e transporte.

Por outro lado, o aumento nas concentrações dos íons sódio e cloreto plasmático das arraias expostas ao ambiente salino ocorreram devido ao influxo de íons originada da elevada concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  da água do mar artificial para o corpo do animal. Isto é um efeito aparentemente comum. Em elasmobrânquios eurihalinos como a espécie de tubarão *Carcharhinus leucas* (tubarão cabeça-chata) o deslocamento deste animal da água doce para o ambiente salino é caracterizado pelo aumento da osmolalidade e na concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmáticos (PILLANS & FLANKLIN, 2004).

Elasmobrânquios marinhos são ureotélicos e reguladores hiperosmóticos com uma pressão osmótica interna ligeiramente superior da água do mar

(SHUTTLEWORTH, 1988). A adaptação osmótica dos Chondrichthyes ao ambiente marinho envolve o acúmulo de uréia e óxido de trimetilamina (TMAO) plasmáticos (YANCEY, 2001), além da ativa secreção do excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pela glândula retal (SHUTTLEWORTH, 1988). Como a glândula retal das arraias da família Potamotrygonidae é atrofiada (THORSON et al., 1978), o excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no plasma das arraias cururu expostas ao sal acumulou-se no plasma por difusão simples. A redução destes eletrólitos somente após 96 horas de exposição está associado ao influxo de  $\text{Mg}^{+2}$  e efluxo de  $\text{Ca}^{+2}$ .

A redução do  $\text{Na}^+$  estava associada ao aumento nos teores do íon magnésio livre no plasma das arraias mantidas na água salgada. Em condições normais, a concentração  $\text{Mg}^{+2}$  plasmático ( $1,2 \pm 0,5$  mmol/l) foi similar aos valores descritos na literatura para peixes de água doce e marinhos. Segundo Bijvelds et al. (1998), os valores  $\text{Mg}^{+2}$  plasmático dos peixes não excede 2 mmol/l. Porém, quando a arraia cururu foi mantida na água salina (10 psu, com  $>160$  mmol/l de  $\text{Mg}^{+2}$ ) observou-se um acúmulo deste íons ( $2,2 \pm 0,6$  mmol). De maneira geral, a concentração do  $\text{Mg}^{+2}$  livre deve ser mantido relativamente estável e em baixos valores, pois este íon participa de inúmeras funções celulares importantes, tais como na atividade catalítica de várias enzimas  $\text{Mg}^{+2}$ -dependentes, além de regular a atividade de transportadores iônicos ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ) e canais de cátions (FLATMAN, 1993).

O mecanismo de transporte de  $\text{Mg}^{+2}$  pelo epitélio é pobremente conhecido. Os peixes possuem um balanço iônico negativo para o magnésio. Como a concentração de  $\text{Mg}^{+2}$  na água doce é baixa (0,5 mmol/l) a perda difusiva deve ser compensada pela ingestão de  $\text{Mg}^{+2}$  através da alimentação e reabsorção renal (BIJVELDS et al., 1998). Nos casos onde a  $[\text{Mg}^{+2}]$  do meio externo for mais elevada que o no meio interno, o íon magnésio pode acumular no plasma. Além disso, o efluxo deste íon pelo epitélio é



usualmente muito lento (OIKARI & RANKIN, 1985). Segundo Van Der Velden et al. (1990), o influxo de  $Mg^{+2}$  pode estar acoplado ao transporte de  $Na^{+}$ . Isto pode explicar que a elevada concentração de  $Mg^{+2}$  plasmático na arraia cururu mantida na água marinha após 96h pôde estar acoplada à eliminação do excesso de  $Na^{+}$  que se acumulou no plasma das arraias nos períodos iniciais da exposição ao ambiente salino. Além disso, é importante observar que nos peixes de água doce os túbulos renais reabsorvem íons magnésio, enquanto que nos peixes marinhos estes são responsáveis pela eliminação do excesso de  $Mg^{+2}$  (RENFRO & SHUSTOCK, 1985). Como os mecanismos de transporte iônico não podem ser revertidos (em função dos processos evolutivos), a reabsorção de  $Mg^{+2}$  renal pode ter contribuído com a elevação deste íon no plasma das animais expostos ao ambiente salino.

Adicionalmente, observou-se um acúmulo de  $Ca^{+2}$  no plasma das arraias expostas. Este íon move-se transcelularmente pelo epitélio branquial por meio por meio de dois importantes sistemas de transporte:  $Ca^{+2}$ -ATPase e trocador  $Na^{+}/Ca^{+2}$ . Para autores como Flik et al, 1990, a eliminação de branquial de  $Ca^{+2}$  pela atividade do trocador  $Na^{+}/Ca^{+2}$  é maior do que pela  $Ca^{+2}$ -ATPase. A atividade do trocador  $Na^{+}/Ca^{+2}$  é dependente do gradiente de  $Na^{+}$ . Ainda segundo estes autores, experimentos realizados no epitélio da tilápia têm demonstrado que o transporte de  $Ca^{+2}$  não ocorre quando o gradiente de  $Na^{+}$  foi eliminado (por exemplo, após a adição de N-metil D-glicamina). Sob tais condições, o íon  $Ca^{+2}$  pode acumular-se. Este mecanismo pode explicar o aumento da concentração de  $Ca^{+2}$  plasmático nas arraias mantidas na água salina no intervalo de 24h. Com a redução dos teores de  $Na^{+}$  plasmáticos, o gradiente é retomado. O restabelecimento do gradiente de  $Na^{+}$  reativa a eliminação do  $Ca^{+2}$  acumulado inicialmente.

A eliminação do excesso de  $\text{Na}^+$  após 168h de exposição salina de 10 psu (figura 2) também pode ter sido favorecido pelo excesso de muco que recobre o tegumento e o epitélio branquial das arraias mantida no ambiente salino. As cargas elétricas negativas dos mucopolissacarídeos e os carboidratos complexos presentes no muco podem atrair cátions como  $\text{Na}^+$  para o meio externo. Recentemente, Duncan et al. (2010) descreveram em detalhes o epitélio branquial das arraias de água doce da família Potamotrygonidae. Segundo estes autores, o epitélio é formado por multicamadas de células (4-6 camadas) com os mesmos tipos celulares encontrados nos demais peixes: célula pavimentosa (CPV), célula cloreto (CC) e célula mucosa (CM). Tanto as CPVs quanto as CMs sintetizam e secretam mucopolissarídeos. Benze & Gabriel (2009) observaram que a arraia motoro (*Potamotrygon motoro* Muller & Henle 1841) da bacia do Paraná quando exposta ao ambiente salino (10 psu) apresentaram um aumento na densidade de CMs AB e PAS-positivas (ricas em mucopolissacarídeos ácidos e neutros, respectivamente). Segundo estes autores, a proliferação de CMs no epitélio branquial foi uma resposta ao estresse provocado pelo excesso de sal na água. O muco sintetizado pelas CMs age como agente lubrificante, microbicida e protetor (MITTAL et al., 1994). No entanto, a proliferação de CMs e a hipersecreção de muco podem alterar o compromisso osmo-respiratório, pois o aumento da barreira água sangue (pela proliferação celular e pelo muco excessivo) dificulta o transporte por difusão de oxigênio da água para o sangue. Por outro lado, as cargas elétricas negativas presentes nos mucopolissarídeos e carboidratos complexos do muco podem ter favorecido o transporte paracelular de  $\text{Na}^+$  para o meio externo, ainda que o gradiente (cerca de 3.000 x) tenha sido desfavorável para eliminação deste íon (figura 9).

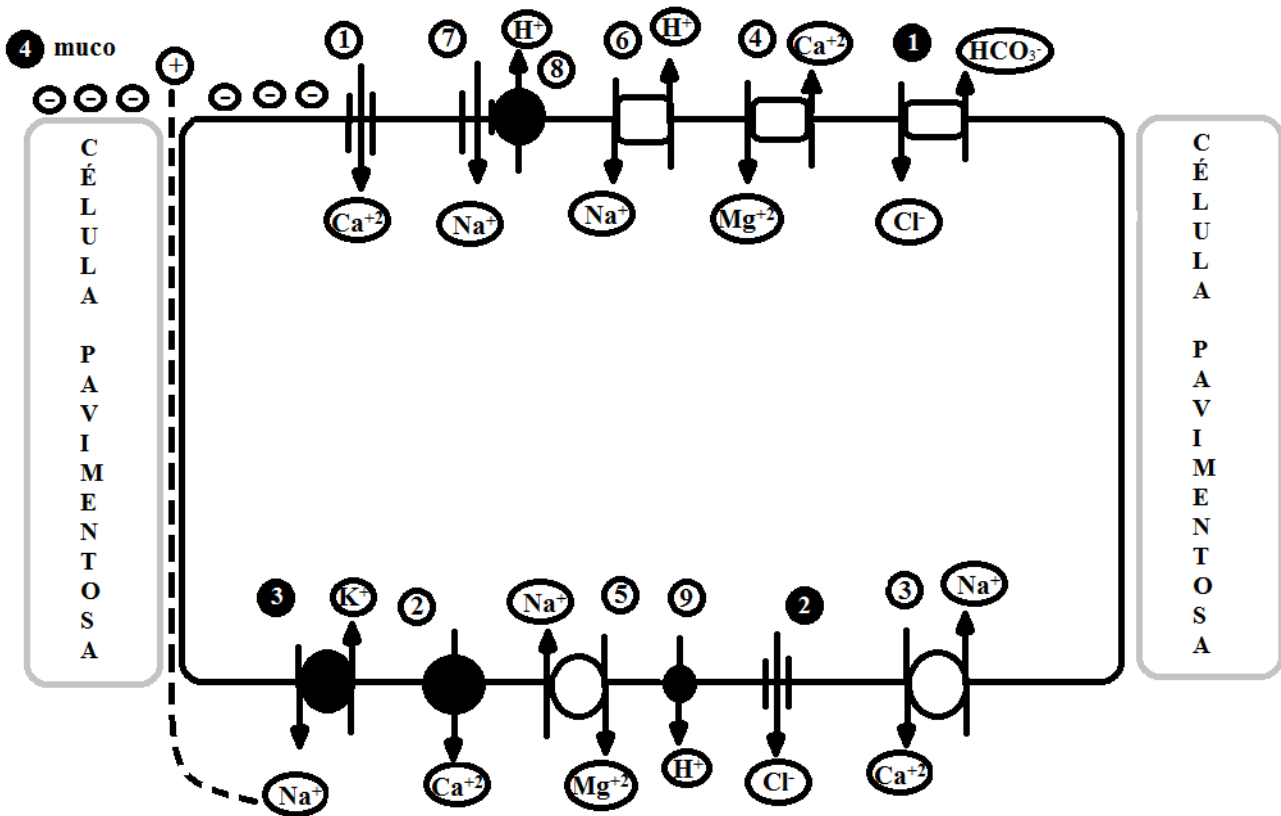


Figura 9. Modelo teórico proposto para o efeito da salinidade ambiental sobre as proteínas do sistema de transporte iônico nas brânquias da arraia cururu (*Potamotrygon* sp.). O fluxo de  $\text{Ca}^{+2}$  transcelular ocorre inicialmente a partir do canal ①ECaC apical. O  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é bombeado para o interstício por meio de dois transportadores da membrana basolateral: uma bomba de  $\text{Ca}^{+2}$ , ②PMCA e pelo trocador ③ $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ . Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  também podem estimular a atividade de um trocador apical eletroneuro ④ $\text{Mg}^{+2}/\text{Ca}^{+2}$ . Este trocador antiporte bombeia  $\text{Ca}^{+2}$  para o meio externo e absorve  $\text{Mg}^{+2}$ . O  $\text{Mg}^{+2}$  intracelular é transportado para o interstício por meio de um sistema de transporte antiporte (⑤ $\text{Na}^{+}/\text{Mg}^{+2}$ ) que utiliza o gradiente eletroquímico do  $\text{Na}^{+}$ . A concentração intracelular de íon  $\text{Na}^{+}$  aumenta devido a entrada pelo trocador eletroneuro apical ⑥ $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  e pelo canal apical ⑦ENaC acoplado à uma bomba de  $\text{H}^{+}$  apical (possivelmente uma ⑧NEM-sensível  $\text{H}^{+}$ -ATPase). Uma bomba de próton basolateralmente posicionada ⑨ $\text{H}^{+}$ -ATPase cria um ambiente eletrogênico para absorção de  $\text{Cl}^{-}$  externo pelo trocador antiporte pendrina (① $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ ). O  $\text{Cl}^{-}$  e o  $\text{Na}^{+}$  intracelulares são transportados para o interstício pelo ②CFTR (um canal de  $\text{Cl}^{-}$  basolateral) e pela ③ $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase, respectivamente. O  $\text{Na}^{+}$  intersticial é eliminado paracelularmente devido à atração eletrostática das cargas elétricas negativas presentes nos ④mucopolissacarídeos que constituem o muco que recobre o epitélio branquial.

Embora o ambiente salino tenha afetado o balanço iônico da arraia cururu, não se observou alteração expressiva nas atividades das bombas iônicas branquiais e renais. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a  $\text{v-H}^+$ -ATPase são bombas eletrogênicas que impulsionam outros sistemas de transporte iônicos (MARSHAL & BRYSON, 1998). Como nos demais peixes, estas enzimas exercem papéis cruciais nos processos osmo-ionorregulatórios dos elasmobrânquios. Estudos realizados em *Dasyatis sabina* (uma arraia eurihalina) têm demonstrado que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) e a  $\text{v-H}^+$ -ATPase (VHA) são expressas distintamente em dois tipos de células ricas em mitocôndrias (NKA-MRC e VHA-MRC, respectivamente) (EVANS et al., 2004). Ambas localizam-se na região basolateral destas células (EVANS et al., 2005). Recentemente Duncan et al. (2011) observaram uma relação direta entre atividade específica da NKA e número de NKA-MRC branquial do potamotrigonídeo *Paratrygon aiereba* Muller & Henle 1841. Estes autores concluíram que os níveis desta enzima pode ser o reflexo da quantidade de células ricas em mitocôndrias presentes no tecido branquial.

Uma observação interessante é a estreita relação entre a NKA e VHA nos rins e nas brânquias (do grupo controle) da arraia cururu. A expressão de grande quantidade de NKA (e NKA-MRC) e VHA (VHA-MRC) na lamela branquial tem sido descrita para a *D. sabina* encontrada na água doce, porém com menor expressão (e densidade de MRC) quando esta arraia foi mantida na água do mar (PIERMARINI & EVANS, 1998; PIERMARINI & EVANS, 2000). De acordo com estes autores, a redução do número de NKA-MRC, VHA-MRC e da expressão de NKA e VHA nas brânquias da arraia eurihalina *D. sabina* quando expostas ao ambiente salino possivelmente representa um mecanismo de regulação iônica para reduzir a absorção de íons a partir do ambiente salino. Como a família Dasyatidae é um grupo-irmão dos potamotrigonídeos é provável

que estas arraia adotem estratégias fisiológicas semelhantes para os mesmos desafios ambientais.

Em geral, os mecanismos adaptativos para reduzir a perda de íons em elasmobrânquios de água doce incluem o aumento da reabsorção tubular renal (LACY & REALE, 1995). Estudos têm demonstrado que os rins dos potamotrigonídeos têm um elevado potencial eletrogênico criado pelas bombas iônicas para reabsorver íons e evitar perdas excessivas para o meio externo. A atividade da NKA renal da arraia *Paratrygon aiereba* que vivem nas águas ácidas e diluídas do Rio Negro é relativamente elevada que aqueles que vivem nas águas do Rio Solimões (DUNCAN et al., 2009). Em várias espécies euri-halinas, a atividade da NKA renal está mais elevada nos indivíduos de água doce do que naqueles da água do mar (LIN et al., 2004). A aparente ausência de efeito sobre as bombas iônicas pode ser uma estratégia vantajosa para o animal, pois diminui o potencial eletrogênico celular, reduz a tomada iônica branquial, além de permitir a formação de uma urina mais concentrada. Como resultado, estas estratégias evita o acúmulo de solutos no plasma dos animais expostos ao ambiente salino.

Os elasmobrânquios marinhos são ureotélicos e iso- ou ligeiramente hiperosmóticos. Além disso, 70-90% da uréia filtrada nos rins é reabsorvida (HAMMERSCHLAG, 2006). Por outro lado, os potamotrigonídeos são amoniotélicos e hiperosmóticos em relação ao meio externo (WOOD et al., 2002). Esta incapacidade para acumular uréia nos tecidos pode ter sido uma estratégia vantajosa para a tolerância das arraia de água doce no ambiente diluído (THORSON et al., 1967). A reduzida capacidade para sintetizar uréia representa uma importante economia energética para os potamotrigonídeos, uma vez que a síntese de 1 mol de uréia requer a hidrólise de 5 moles de ATP (IP et al., 2003). Ainda que estas arraia sejam expostas ao ambiente

salino elas são incapazes de acumular uréia em seus tecidos (GRIFFITH et al., 1973; TAM et al., 2003). O mesmo resultado foi observado neste estudo.

Em resumo, diferentemente da espécie *D. sabina*, a arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) não acumula uréia no plasma e não tem suas bombas iônicas afetadas pela salinidade ambiental. Além disso, esta espécie osmorregula por meio de seus principais eletrólitos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ). Este trabalho vem contribuir com informações relevantes sobre a trajetória evolutiva do grupo, bem como auxilia na compreensão das estratégias osmorreguladoras dos grupos de condrictios estenohalinos que eventualmente estão expostos às variações extremas de salinidade ambiental, tais como aqueles que vivem nas regiões estuarinas.

## 6. CONCLUSÕES

- A arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) quando mantida na água salgada foi incapaz de acumular uréia no plasma;
- A osmorregulação foi realizada principalmente por meio dos íons sódio e cloreto, porém esta arraia acumula  $\text{Na}^+$  (48 h),  $\text{Cl}^-$  (24 h),  $\text{Ca}^{+2}$  (168 h) e  $\text{Mg}^{+2}$  (96 h) no plasma devido à elevada concentração destes íons no meio externo;
- O elevado gradiente salino não afeta a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e NEM-sensível v- $\text{H}^+$ -ATPase.

## 8. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.G., GOOD, J.P., HAZON, N., GROSELL, M. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology* v. 148, p. 3-13, 2007.
- BENZE, T.P. & GABRIEL, P.T. **Efeitos da salinidade sobre a osmorregulação da arraia de água doce, *Potamotrygon motoro* (Potamotrygonidae: Elasmobranchii) da bacia Rio do Paraná.** TCC/Ciências Biológicas. Centro Universitário de Araraquara, pp. 1-47, 2009.
- BIJVELDS, M.J., VAN DER VELDEN, J.A., KOLAR, Z.I. & FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. *The Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1981-1990, 1998.
- CARVALHO, M.R. & LOVEJOY, N.R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2776, p. 13-48, 2011.
- CARVALHO, M.R. & RAGNO, M.P. An unusual, dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the second species of *Plesiotrygon* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis avulso, São Paulo*, v. 51, p. 101-138, 2011.
- CLIFF, G. & THURMAN, G.D. Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 78A, p.167-173, 1984.
- DUNCAN, W.P. & FERNANDES, M. N. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin during the rainy period and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 53, n. 5 (no prelo).
- DUNCAN, W.P., COSTA, O.T.F., ARAÚJO, M.L.G, FERNANDES, M.N. Ionic regulation and  $Na^+ - K^+ - ATPase$  activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aireba* living in the white and blackwaters in the Amazon basin. *Journal of Fish Biology*, v. 74, p. 956-970, 2009.
- DUNCAN, W.P., COSTA, O.T.F., SAKURAGUI, M.M.M FERNANDES, M.N. Functional Morphology of the Gill in Amazonian Freshwater Stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): Implications for Adaptation to Freshwater. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 83, p. 19-32, 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*, DOI 10.1007/s10695-010-9454-z, 2011.
- DUNN, K.D., 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, p. 259-270, 2003.
- EVANS, D.H. PIERMARINI, P.M. & CHLOE, K.P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation and nitrogen excretion. **Biology of sharks and their relatives** (CARRIER, J.C., MUSICK, J.A. & HEITHAUS, M.R., eds.), pp. 247-268, Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.



- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M. & CHLOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous wastes. *Physiology Review*, v. 85, p. 97-177, 2005.
- FLATMAN, P. W. The role of magnesium in regulating ion transport. In **Magnesium and the Cell** (ed. BIRCH, N.J.), London: Academic Press, pp.197–216, 1993.
- FLIK, G., SCHOENMAKERS, Th.J.M., GROOT, J.A., VAN OS, C.H. & WENDELAAR BONGA, S.E. Calcium absorption by fish intestine: the involvement of ATP- and sodium-dependent calcium extrusion mechanisms. *Journal Membrane Biology*, v. 113, p. 13–22, 1990.
- GRIFFITH, R.W., PANG, P.K.T., SRIVASTAVA, A.K. & PICKFORD, G.E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygidae) adapted to fresh and diluted sea water. *Biological Bulletin*, v. 144, p. 304-320, 1973.
- 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.
- HIROSE, S., KANEKO, T., NAITO, N., TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v.136, p. 593–620, 2003.
- HOORN, C. An environment reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle-Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeograph Palaeoclimatology and Palaeoecology*, v. 112, p. 187–238, 1994.
- IP, Y.K., TAM, W.L., WONG, W.P., LOONG, A.M., HIONG, K.C., BALLANTYNES, J.S. & CHEW, S.F. A comparison of the effects of environmental ammonia exposure on the Asian freshwater stingray *Himantura signifer* and the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 3625-3633, 2003.
- LACY, E.R. & REALY, E. Functional morphology of the elasmobranch nephron and retention of urea. In **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation** (WOOD, C.M. & SHUTTLEWORTH, T.J., eds.), pp. 107-146, San Diego: Academic Press 1995.
- LIN, C.H. & RANDALL, D. J. Proton-ATPase activity in the crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *Journal of Fish Biology*, v. 180, p. 163–174, 1993.
- LIN, C.H., PFEIFFER, D.C., VOGL, A.W., PAN, J. & RANDALL, D.J. Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPase in the gill epithelium of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, v. 195, p. 169–183, 1994.
- 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. 287-195, 2004.
- LOVEJOY, N.R., ALBERT, J.S. & CRAMPTON, W.G.R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 21, p. 5-13, 2006.
- LOVEJOY, N.R., BERMINGHAM, E. & MARTIN, A.P. Marine incursion into South America. *Nature*, v. 396, p. 421-422, 1998.
- MARSHALL, W.S. & BRYSON, S.E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cell: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comp. Biochem. Physiology*, v. 119A, p. 97-106, 1998.
- MITTAL, A.K., UEDA, T., FUJIMORI, O. & YAMADA, K. Histochemical analysis of glycoproteins in the epidermal mucous cells and sacciform cells of na Indian swamp

- eel *Monopterus albus* (Hamilton) (Synbranchiformes, Pisces). *Acta Histochemica et Cytochemica*, v. 27, p. 193-204, 1994.
- OIKARI, A. O. J. & RANKIN, J. C. Renal excretion of magnesium in a freshwater teleost, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Biology*, v. 117, p. 319–333, 1985.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Effects of environmental salinity on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *The Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 2957-2966, 2000.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase. *The Journal of Experimental Biology*, v. 204, p. 3251-3259, 2001.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater Lake Jesup of the St John River, Florida. *Physiological Zoology*, v. 71, p. 553–560, 1998.
- PILLANS, R.D. & FRANKLIN, C.E. Plasma osmolyte concentrations and rectal gland mass of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 138A, p. 363-371, 2004.
- RENFRO, J. L. & SHUSTOCK, E. Peritubular uptake and brush border transport of <sup>28</sup>Mg by flounder renal tubules. *American Journal of Physiology*, v. 249, p. 497–506, 1985.
- SHIBUYA, A., ZUANON, J., ARAÚJO, M.L.G. & TANAKA, S. Morphology of lateral line canals in Neotropical freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from Negro River, Brazilian Amazon, *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p. 867-876, 2010.
- SHUTTLEWORTH, T.J. Salt and water balance – extrarenal mechanisms. In: **Physiology of Elasmobranch Fishes** (SHUTTLEWORTH, T.J. Ed.), Berlin, Springer-Verlag, p. 171-199, 1988.
- SILVA, P., STOFF, J., FIELD, M., FINE, L., FORREST, J.N. & EPSTEIN, F.H. Mechanism of active chloride secretion by shark rectal gland: role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase in chloride transport. *American Journal of Physiology*, v. 233, p. 298-306, 1977.
- TAM, W.L., WONG, W.P., LOONG, A.M., HIONG, K.C., CHEW, S.F., BALLANTYNE, J.S. & IP, Y.K. The osmotic response of the Asian freshwater stingray (*Himantura signifer*) to increased salinity: a comparison with marine (*Taeniura lymma*) and Amazonian freshwater (*Potamotrygon motoro*) stingrays. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 2931-2940, 2003.
- THORSON, T.B., COWAN, C.M. & WATSON, D.E. Body fluid solutes of juveniles and adults of the euryhaline bull shark, *Carcharhinus leucas*, from freshwater and saline environments. *Physiological Zoology*, v. 46, p. 29-42, 1973.
- THORSON, T.B., COWAN, C.M. & WATSON, D.E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, v. 158, p. 375-377, 1967.
- THORSON, T.B., WOOTON, R.M., GEORGI, T.A. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biology Bulletin*, v. 154, p. 508-516, 1978.

- VAN DER VELDEN, J.A., GROOT, J.A., FLIK, G., POLAK, P. & KOLAR, Z.I. Magnesium transport in fish intestine. *The Journal of Experimental Biology*, v. 152, p. 587–592, 1990.
- WILSON, J.M., MORGAN, J.D, VOGL, A.W. & RANDALL, D.J. Branchial mitochondria- rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 132A, p. 365-374, 2002.
- WILSON, R.W., WOOD, C.M., GONZALEZ, R.J., PATRICK, M.L., BERGMAN, H.L., NARAHARA, A., VAL, A.L. Ion and acid–base balance in three species of Amazonian fish during gradual acidification of extremely soft water. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 72, p. 277–285, 1999.
- WOOD, C. M. & MARSHALL, W. S. Ion balance, chloride cell acid-base regulation, function in the and common killifish, *Fundulus heteroclitus* - A euryhaline estuarine teleost. *Estuaries* v. 17, p. 34-52, 1994.
- 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. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 3039-3054, 2002.
- YANCEY, P.H. Nitrogen compounds as osmolytes. In: WRIGHT, P.A.; ANDERSON, P.M. (Eds.) **Fish Physiology. Nitrogen Excretion**. New York, Academic Press, v. 20, p. 309-341, 2001.

## 9. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

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

**R:** Realizados

**X:** Por realizar

## 10. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS REALIZADAS PELA BOLSISTA DURANTE O PERÍODO DO PIBIC 2010-2011

- ALMEIDA-CORREA, T., COSTA, D.M., GONCHAROV, C., INOMATA, S.O., FERNANDES, M.N. & DUNCAN, W.P. Morfologia funcional das brânquias das arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Elasmobranchii). In: **XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia**, v. 597, p. 583, Manaus, 2011.
- ALMEIDA-CORREA, T., COSTA, D.M., GONCHAROV, C., INOMATA, S.O., KODRA, A., DUNCAN, W.P. & FERNANDES, M.N. Área superficial branquial de *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon orbignyi* (ELASMOBRANCHII:POTAMOTRYGONIDAE). In: **I Mostra Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão – MIEPEX**, v. 1, Manaus, 2010.
- COSTA, D.M., GONCHAROV, C., ALMEIDA-CORREA, T., INOMATA, S.O., COSTA, O.T.F., LAMEIRAS, J.L.V., FERNANDES, M.N. & DUNCAN, W.P. Remodelamento dos órgãos osmorreguladores das arraias de água doce (Potamotrygonidae) ao longo do desenvolvimento. In: **I Mostra Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão - MIEPEX**, Manaus, 2010.
- COSTA, D.M., TEXEIRA, T.R., INOMATA, S.O., ALMEIDA-CORREA, T., GONCHAROV, C., LAMEIRAS, J.L.V., FERNANDES, M.N. & DUNCAN, W.P. Estudo dos mecanismos osmorregulatórios da arraia de água doce, *Potamotrygon* sp. durante o transporte. In: **IV Congresso da Sociedade de Aquicultura e Biologia Aquática - AQUACIÊNCIA /AQUABIO**, v. 168, p. 23-23, Recife, 2010.
- DUNCAN, W.P., LAMEIRAS, J.L.V., ALMEIDA-CORREA, T., GONCHAROV, C., COSTA, D.M. & SOUZA, P.F. O mundo colorido das técnicas histológicas: da dissecação à montagem de lâminas permanentes. **I Mostra Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão – MIEPEX**, Manaus, 2010.
- GONCHAROV, C., ALMEIDA-CORREA, T., INOMATA, S.O., COSTA, D.M., SILVA, I.A., KODRA, A., LAMEIRAS, J.L.V., FERNANDES, M.N. & DUNCAN, W.P. Morfometria do ferrão caudal das arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Myliobatiformes). In: **IV Congresso da Sociedade de Aquicultura e Biologia Aquática – AQUACIÊNCIA /AQUABIO**, v. 167, Recife, 2010.
- GONCHAROV, C., COSTA, D.M., ALMEIDA-CORREA, T., INOMATA, S.O., COSTA, O.T.F., LAMEIRAS, J.L.V., FERNANDES, M.N. & DUNCAN, W.P. Mudanças morfofisiológicas dos órgãos osmorreguladores das arraias de água doce (Potamotrygonidae) ao longo do desenvolvimento. In: **XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia**, v. 597, p. 587, Manaus, 2011.
- LAMEIRAS, J.L.V., FERNANDES, M.N., INOMATA, S.O., TEXEIRA, T.R., ALMEIDA-CORREA, T. & DUNCAN, W.P. Estudo dos mecanismos osmorregulatórios da arraia de água doce, *Potamotrygon* sp. durante o transporte. In: **XIX CONIC/UFAM**, Manaus, 2010.