



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



Mecanismos de transporte iônico nos órgãos osmorregulatórios das arraias de água doce da família Potamotrygonidae

Bolsista: Rubia Neris Machado, CNPq.

Manaus
2016





UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIBIC: PIB-B/0075/2015-2016

Mecanismos de transporte iônico nos órgãos osmorregulatórios das
arraias de água doce da família Potamotrygonidae

Bolsista: Rubia Neris Machado

Orientador: Prof. Dr. Wallice Paxiúba Duncan

Manaus
2016

SUMÁRIO

1	INFORMAÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO	01
	1.1. Este documento é confidencial?	01
	1.2. Este trabalho ocasionará em registro de patente?	01
	1.3. Este trabalho pode ser liberado para reprodução?	01
2	INTRODUÇÃO	01
3	OBJETIVOS	03
	2.1. Objetivo Especifico	03
4	Materiais e Métodos.....	03
	4.1. Coleta de animais e procedimento de eutanásia.....	03
	4.2. Nota ética.....	04
	4.3. Amostras e processamento.....	04
	4.4. Procedimento de imunohistoquímica.....	05
	4.5. Análise estatística	05
5	RESULTADOS	06
6	DISCUSSÃO.....	13
7	REFERÊNCIAS	14
8	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	16

1. Informações de Acesso ao Documento

1.1 Este documento é confidencial?

☐

SIM

☐

NÃO

1.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

☐

SIM

☐

NÃO

1.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

☐

SIM

☐

NÃO

Resumo

As arraias de água doce distribuem-se por todas as grandes bacias hidrográficas da América do Sul. Ao longo dos ~50 milhões de anos de evolução nas águas continentais, os potamotrigonídeos colonizaram os diferentes tipos de águas, incluindo os padrões clássicos tais como pretas, clara e branca e suas variações. Os mecanismos fisiológicos para tolerar o ambiente de água convergiram para um padrão atualmente encontrado nos peixes teleósteos (por exemplo, nos ciclídeos) e diferente dos grupos de elasmobrânquios marinhos. Baseado nesses argumentos, nós investigamos a localização e distribuição das células cloreto branquiais imunopositivas para a bomba Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) em 13 espécies de arraias da família Potamotrygonidae (Chondrichthyes: Elasmobranchii), incluindo 3 novas espécies. Além disso, incluímos amostras de *Dasyatis guttata* (Elasmobranchii: Dasyatidae) como “outgroup” representante marinho/eurialino de maneira a compreender a morfofisiologia das CC-NKA. Foi utilizado o anticorpo contra a subunidade α da bomba Na^+/K^+ -ATPase para localizar as células cloreto ricas nessa enzima. As brânquias das arraias de água doce da família Potamotrygonidae não apresentam um complexo sistema labirinto-tubular como encontrado no dasiatídeo. Em *D. guttata* a densidade de bombas Na^+/K^+ -ATPase/célula é maior, no entanto, a densidade celular (CC-NKA) é menor que nas arraias potamotrigonídeos. As arraias de água doce não elevada densidade de bombas Na^+/K^+ -ATPase/célula, porém, apresentam numerosas CC-NKA no espaço interlamelar e na base da lamela, principalmente na região aferente (“trailing edge”) do filamento. Essas características morfológicas podem ajudar a entender os mecanismos fisiológicos da tolerância dos potamotrigonídeos ao longo da evolução no ambiente de água doce.

2. Introdução

A cerca de 23 a 15 milhões de anos atrás iniciou-se as incursões marinhas pela foz do rio paleoAmazonas-Orinoco, região que atualmente corresponde ao lago Maracaibo, Venezuela (Lovejoy *et al.* 1998, Marques 2000). Acredita-se que esse grande fluxo de água possibilitou a entrada dos ancestrais da família Potamotrygonidae e de muitos outros animais no continente. Essas incursões formaram grandes lagoas salinas interconectadas dando origem ao imenso Mar Pebasiano que após milhões de anos entrou em processo de dessalinização onde esses animais foram se adaptando/aclimatando ao ambiente à ponto de se tornarem espécies endêmicas e especializadas. Mesmo habitando diferentes tipos de águas tais como água preta, branca e clara (Duncan e Fernandes, 2010).

A família Potamotrygonidae pertence à ordem Myliobatiformes, classes dos Chondrichthyes a subclasse dos Elasmobranchii. Ela é formada por um clado monofilético constituído por quatro gêneros descritos: *Heliotrygon* considerado o mais basal seguidos de *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*, o mais especioso. São considerados validas 28 espécies (Rosa *et al.* 2008, Carvalho e Lovejoy 2011, Carvalho e Ragno 2011, Loboda e Carvalho 2013; Fontenelle *et al.* 2014; Silva e Carvalho 2015, Carvalho *et al.* 2016). Esses animais são restritamente de água doce e compreendem grande parte das bacias hidrográficas da América do Sul (Rosa *et al.* 2010); incluindo regiões estuarinas. (Almeida *et al.* 2009, Duncan e Fernandes 2010).

Os rios são classificados de acordo com a composição físicas, química e diferenças na coloração das águas. Sendo divididos em rios de água branca, preta e clara (Sioli 1968). Os rios de água branca são férteis, com pH neutro (6 e 7,5) e uma elevada condutividade elétrica devido à alta concentração de íons dissolvidos. Já os rios de água preta são pobres em íons e com pH relativamente ácido (4 e 5). Os rios de água clara possuem um pH próximo a neutralidade suas águas transparentes são pobres em nutrientes. Essas características físicas e químicas da água atuam como uma barreira seletiva de dispersão por exemplo a *Potamotrygon wallacei* (arraia cururu) recentemente descrita por Carvalho *et al.* (2016) é endêmica das águas ácidas e pobres em íons do Médio Rio Negro. No entanto a *Potamotrygon motoro* possui uma ampla plasticidade fenotípica nos seus mecanismos de interação organismo-ambiente isso lhes permite tolerar os mais variados habitats.

Filtro seletivo é resultado das limitações fisiológicas para todos os organismos por isso

os potamotrigonídeos representam um excelente modelo para estudos de adaptação ao ambiente de água doce. Apresentam características fisiológicas únicas que os diferem dos ancentrais marinhos/eurialinos: são hiperosmóticos em relação ao meio, ou seja, entrada de excessiva de água e perda de íons por difusão, osmorregulam por meio de eletrólitos já que não retém ureia em seus tecidos, não apresentam glândula de sal funcional e possuem mecanismos de regulação iônica semelhantes aos peixes teleósteos de água doce (Wood *et al.* 2002). Estudos sobre os mecanismos de regulação iônica na arraia *Potamotrygon wallacei* baseando-se apenas no uso de drogas farmacológicas (inibidores de canais e bombas iônicas). Os dados desses autores foram concordantes com o modelo proposto por Piermarini e Evans (2000, 2001); porém, é importante ressaltar que esses autores não localizaram imunohistoquimicamente os dois tipos de células cloreto. Acredita-se que ao longo da história evolutiva do grupo, o sistema de troca iônica originalmente moldado para funcionar no ambiente marinho se reorganizou de maneira que as estratégias osmorregulatórias se assemelhassem as encontradas nos ciclídeos do Médio Rio Negro (Wilson *et al.* 2002).

As brânquias são órgãos multifuncionais. Estão associadas à absorção de oxigênio, excreção/absorção de sais e equilíbrio de ácido-base (Evans *et al.* 2005). A barreira de troca é formada principalmente pelas células pavimentosas epiteliais e flange da célula pilar (Duncan *et al.* 2015). Enquanto as células pavimentosas estão associadas à absorção de O_2 , as células ricas em mitocôndrias (também conhecidas como células cloreto ou ionócitos) são os principais sítios para excreção e tomada de íons em elasmobrânquios (Wilson *et al.* 2002). O transporte iônico pelo epitélio branquial tem sido revisto (Evans *et al.* 2005). Um modelo não usual foi proposto para a arraia eurialina *Dasyatis sabina* (Piermarini e Evans 2000, 2001). Nesse animal, foi descrito dois tipos de células cloreto branquiais: o tipo rico em Na^+/K^+ -ATPase (CCs-NKA) fornece energia para a tomada de Na^+ via excreção de H^+ , enquanto o tipo rico em $V-H^+$ -ATPase (CCs-VHA) favorece a tomada de cloreto eliminando HCO_3^- via co-transporte antiporte. Quando essa arraia foi aclimatada em água doce, observou-se um aumento na densidade de células tipo CCs-VHA. Esse modelo é sugestivo, pois indica a necessidade de eficiente sistema de transporte ativo para operar na água doce.

Estudos sobre morfologia e funcionalidade das brânquias de teleósteos tem ajudado na compreensão quanto a adaptações aos diferentes tipos de água (Hughes 1984, Evans *et al.* 1999, Evans *et al.* 2005; Fernandes *et al.* 2007), estudos sobre a morfologia das brânquias das arraias de água doce podem ajudar a compreender como funcionam os mecanismos de

adaptação aos diferentes tipos de água das principais bacias da América do Sul. Portanto este estudo descreve a distribuição e densidade de células cloreto no epitélio branquial de dezesseis espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae e de duas espécies de arraias marinha da família da Dasyatidae.

3. Objetivos

Executar um estudo sobre a evolução da tolerância ao ambiente dulcícola das arraias Potamotrygonidae. Os dados serão baseados na identificação, descrição histológica das principais células do epitélio branquial, bem como na localização dos principais trocadores e transportadores iônicos relacionados ao sistema de transporte pela membrana das células cloreto.

3.1 Objetivos específicos

1. Descrever morfológicamente a organização celular do epitélio branquial, com ênfase nas células ricas em mitocôndrias e seus mecanismos de transporte iônicos;
2. Identificar e descrever a localização das células branquiais ricas em Na⁺ K⁺ ATPase e transportadores por meio de imunohistoquímica;
3. Caracterizar os ambientes aquáticos (por meios dos valores de pH, concentração de oxigênio, sólidos totais dissolvidos e a condutividade elétrica) e relacionar com os mecanismos de transporte iônicos
4. Propor um padrão evolutivo dos mecanismos de adaptação ao ambiente de água doce baseado na organização das células cloreto;

4. Materiais e métodos

4.1 Coleta de animais e os procedimentos de eutanásia

Dezesseis espécies de arraias da família Potamotrygonidae foram processadas: *Heliotrygon gomesi* (n=1), *Paratrygon aiereba* (n=4), *Plesitrygon iwamae* (n=5), *Potamotrygon yepezi* (n=3), *Potamotrygon schroederi* (n=3), *Potamotrygon brachyura* (n=3), , *Potamotrygon wallacei* (n=3), *Potamotrygon constellata* (n=1), *Potamotrygon falkneri*(n=1), *Potamotrygon*

amandae (n=6), *Potamotrygon motoro* (n=16), *Potamotrygon scobina* (n=2), *Potamotrygon orbignyi* (n=6), *Potamotrygon* sp. (“jabuti”) (n=2), *Potamotrygon* sp. (“jutaí”) (n=2) e *Potamotrygon* sp. (“nhamundá”) (n=3) e duas espécies de arraia marinha da família Dasyatidae: *Dasyatis guttata* (Oceano Atlântico, Recife-PE) (n=2) e *Dasyatis marianae* (Oceano Atlântico, Recife-PE) (n=1) como grupo externo. As arrias de água doce foram coletadas nas diferentes bacias hidrográficas da América do Sul (água preta, branca e clara): bacia Paraná-Paraguai (Rio Mutum e Ilha Solteira); bacia Amazônica: Rio Solimões (Lago Gamboa e Iranduba), Rio Jutáí, Rio Negro (Cidade de Barcelos, Arquipélago de Anavilhanas e Lago Catalão), Rio Manacapuru, Rio Nhamundá, Rio Tapajós, Estuário Amazônico (Ilha de Colares) e bacia do Orinoco (Lago Maracaibo)

Os exemplares foram capturados com auxílio de rapichés, espinhel, mergulho livre e redes de arrasto. Apenas animais adultos e subadultos foram considerados para esse trabalho. Após a coleta os animais foram mantidos em tanque redes na água do mesmo rio para aclimação por algumas horas para reduzir o estresse de captura e evitar bruscas alterações morfofisiológicas. Em todos os procedimentos, meios humanitários foram adotados para evitar o sofrimento físico nos animais. Para tanto, as arraias foram anestesiadas lentamente com hidrocloreto de benzocaina (0,5 g/l). Este anestésico é recomendado para peixes pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução Nº 714, de 20 de junho de 2002).

4.2 Nota ética

Todos os animais foram coletados com a permissão concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, Licença SISBIO número 32360). Além disso, o presente estudo foi submetido à análise do Comitê de ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas em 2015, porém, até o presente momento encontra-se sob análise.

4.3 Amostras e processamento

Brânquias e rins foram cuidadosamente removidos e imediatamente fixadas *in situ* por imersão em solução Bouin (ácido pícrico saturado, formaldeído e ácido acético) e processados para métodos imunohistoquímicos. As amostras foram desidratadas em concentrações

crescentes de etanol (70, 80, 95 e 100% por 1 hora cada) e diafanizadas em xilol (duas etapas de 45 min cada). Após foram inclusas em parafina. Foram confeccionadas laminas com cortes de 5µm obtidos por meio de um micrótomo (SLEE MAINZ, Alemanha).

4.4 Procedimentos de imunohistoquímica

A identificação das células cloreto ricas em ATPases foram realizadas conforme protocolos estabelecidos por Evans et al. (2005) e Duncan et al. (2010). Brevemente, as seções foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em álcool (100, 90, 80, 70, 50%) e em água destilada, e subsequentemente com lavagens em Tampão Buffer Tris Salino (TBS 10M, 1% Triton, pH 7,4). Uma solução de H₂O₂ (3%) foi usada para inibir a atividade da peroxidase endógena. As seções foram pré-incubadas com NGS (Normal Goat Serum, 20%) por 20 minutos em câmara úmida. Depois foram incubadas por 12 horas a 25º C com anticorpo primário antissubunidade α5 da Na⁺/K⁺ - ATPase (diluído 1:150 convenientemente em TBS). Após incubação, as lâminas foram lavadas com TBS e, novamente, incubadas com um segundo anticorpo (Goat Anti-Mouse) marcado com Peroxidase Anti-Peroxidase de camundongo durante 2 horas a 25º C. Depois, as seções foram lavadas com TBS por 10 min. Para visualização dos anticorpos ligados foi adicionado 3,3'-diaminobenzidina tetra-hidrocloreto e níquel ammonium a coloração começou a aparecer entre 15 a 20 minutos. Outros marcadores para as enzimas anidrase carbônica e V-H⁺-ATPase foram testados para tentar identificar e descrever a localização de ambas as enzimas, no entanto não obtivemos resultados satisfatórios.

A quantificação da CCs-NKA foi efetivada em três seções para cada indivíduo. A contagem das CCs-NKA foi realizada em 5 a 20 campos de forma que todas as lamelas e espaços interlamelares fossem quantificados e mensurados para evitar o efeito do comprimento sobre o número de CCs-NKA. O número de CCs-NKA é expresso em células/100µm de lamela ou espaço interlamelar. Todas as medidas foram realizadas em um microscópio Leica acoplado a uma câmera de vídeo e um computador com o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4.5 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média±desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado *a priori* para analisar a distribuição normal dos dados (número de CC-NKA). Uma análise de variância não paramétrica seguida do teste Kruskal-Wallis foi aplicado nos dados de células NKA do filamento ou da lamela entre os exemplares de arraiais da mesma espécie

coletados em diferentes rios ou bacias hidrográficas. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

5. Resultados

As brânquias dos potamotrigonídeos são divididas em cinco pares de arcos branquiais, sendo o primeiro arco hioídal por possuir apenas os filamentos posteriores (hemibrânquias posteriores), bem como para os dasiatídeos. Nos filamentos estão inseridas as lamelas. Os espaços entre as lamelas (espaço interlamelar) variam de 7 a 75 μm nos potamotrigonídeos sendo que em *Plesiotrygon iwamae* a média dos espaços interlamelares apresentou o espaço mais largo, $59,2 \pm 10,4 \mu\text{m}$ (média $\pm$ desvio padrão), isso pode indicar um menor fluxo (velocidade) de água entre as lamelas. O epitélio branquial é formado por uma fina camada de células pavimentosas responsáveis pelas trocas gasosas, sendo sustentadas pelas células flange da célula pilar. Além das células pavimentosas e flange da célula pilar podem ser encontradas no epitélio branquial células mucosas e células cloreto.

As células mucosas são responsáveis pela produção de muco para proteção contra abrasões e/ou produção de substâncias tóxicas contra patógenos ou predadores. Frequentemente são encontradas nas regiões aferente e eferente do filamento sendo pouco usual a presença de células mucosas nas lamelas e/ou espaço interlamelar, no entanto a *Potamotrygon yepesi* que habita o Lago Maracaibo na Venezuela possui uma alta densidade de células mucosas ácidas (Alcian Blue Positivas) (dados não apresentados) nas lamelas e espaços interlamelares. Essa alta densidade pode estar relacionada com os parâmetros físicos e químicos da água.

As células cloretos ou ionócitos são responsáveis pela absorção e excreção de sais pela brânquia, já que as arraias dulcícolas perderam a capacidade de excretar sais pela glândula retal a brânquia se tornou um órgão essencial para a osmorregulação desses animais. As células cloreto imunopositivas para a enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ podem ser encontradas tanto nas lamelas quanto nos espaços interlamelares dos potamotrigonídeos e dasiatídeos estudados (Tabelas 1 e 2). Porém são mais abundantes nos espaços interlamelares. A densidade de ionócitos para os potamotrigonídeos nas lamelas (LL) variam de 0,6 a 10 células/100 μm de LL e nos espaços interlamelar (IEL) variam de 3 a 40 células/100 μm de IEL, enquanto para os

dasiatídeos a densidade de ionócitos nas lamelas variam de 0,8 a 0,9 células/100µm de LL e de 4 a 8 células/100µm de IEL. Os dados de densidade de células cloreto o grupo externo, dasiatídeos, e potamotrigonídeos considerados basais estão apresentados na tabela 1, enquanto para aqueles considerados do grupo roseta-ocelados, grupo mais recente estão na tabela 2.

Em *Paratrygon aiereba* espécie que possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde as águas pobres em íons do Rio Negro as águas Brancas do Rio Solimões. No entanto, o exemplar coletado no Rio Nhamundá (área de confluência dos dois rios citados) as células cloreto se distribuem de uma forma não usual a partir da região medial/apical da lamela com tendo uma ou duas células cloreto imunopositivas para Na⁺/K⁺-ATPase e nos espaços interlamelares não foram encontradas CCs-NKA (Figura. 1-G).

Em *Potamotrygon wallacei*, espécie endêmica das águas pobres em íons do Médio Rio Negro, as CCs-NKA organizam-se em um complexo em forma folicular nos espaços interlamelares essa organização não foi encontrada em nem uma outra espécie estudada. Nas demais espécies a distribuição das CCs-NKA encontrada nas lamelas estão regularmente distribuídas.

Para todas as espécies estudadas a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase nas células cloreto do epitélio branquial é intensa na periferia do citosol isso sugere que as bombas de Na⁺/K⁺-ATPase estão localizadas basolateralmente na célula.

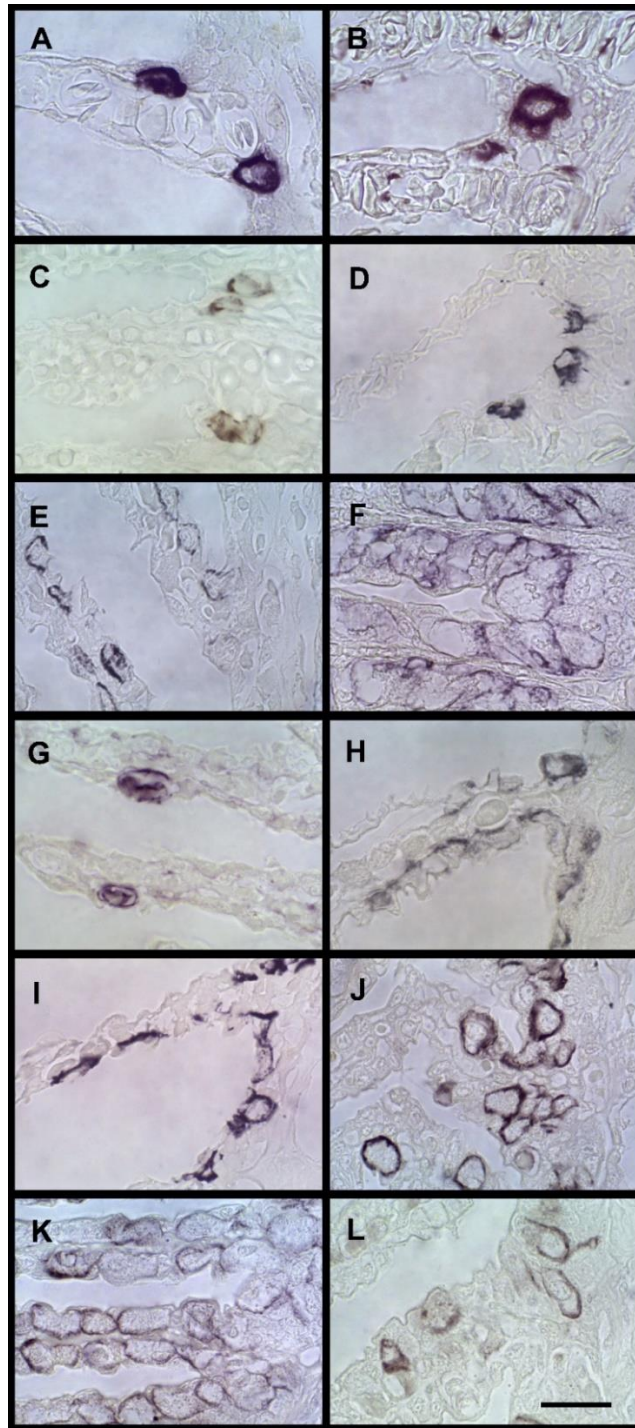


Figura 1. Localização e distribuição das células imunopositivas para a subunidade α da Na^+/K^+ -ATPase em dois Dasiatídeos A) *Dasyatis guttata* B) *Dasyatis marianae* e diferentes gêneros da família Potamotrygonidae. C) *Heliotrygon gomesi* (Rio Solimões) D) *Paratrygon aiereba* (Rio Negro) E) *Paratrygon aiereba* (Rio Solimões) F) *Paratrygon aiereba* (Anavilhanas) G) *Paratrygon aiereba* (Rio Nhamundá) H) *Plesiotrygon iwamae* (Rio Solimões) I) *Potamotrygon yepezi* (lago

Maracaibo) J) *Potamotrygon schroederi* (Rio Negro) K) *Potamotrygon schroederi* (Anavilhanas)
 L) *Potamotrygon brachyura* (Rio Mutum). Escala 20µm.

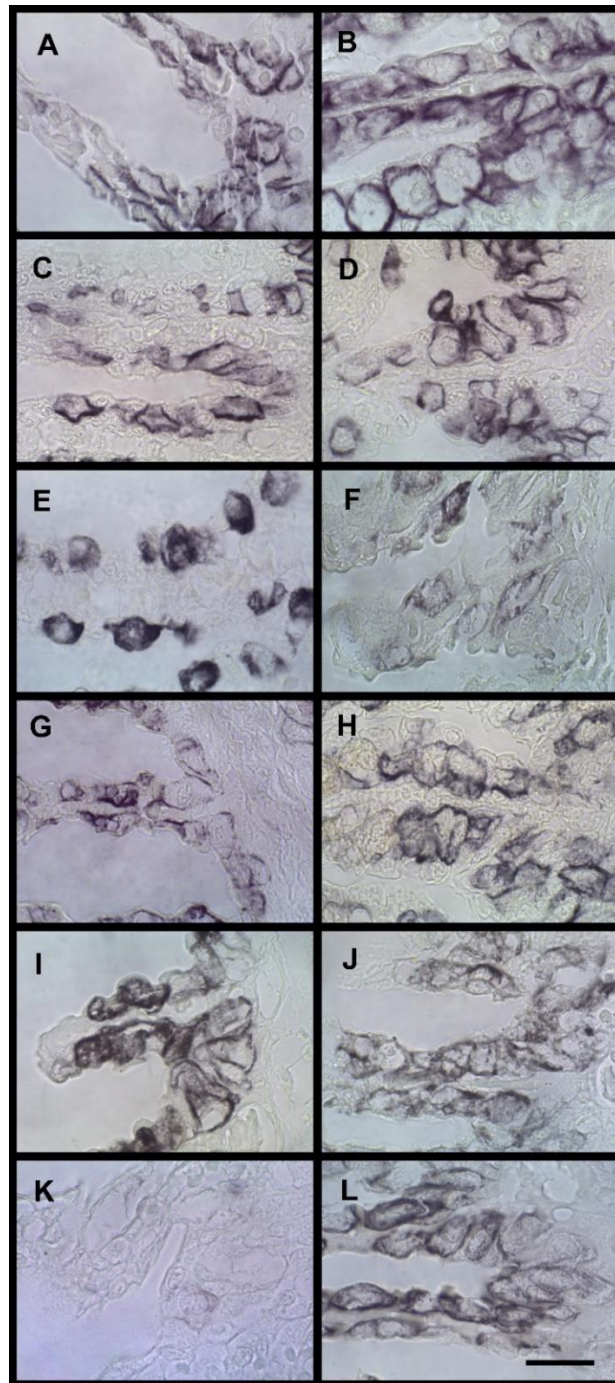


Figura 2. Distribuição das células cloreto nas brânquias de diferentes espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae. A) *Potamotrygon wallacei* (Rio Negro) B) *Potamotrygon constellata* (Rio Manacapuru) C) *Potamotrygon falkneri* (Rio Parana) D)

Potamotrygon amandae (Rio Paraná) E) *Potamotrygon scobina* (Rio Negro) F) *Potamotrygon scobina* (Rio Jutáí) G) *Potamotrygon orbignyi* (Rio Negro) H) *Potamotrygon orbignyi* (Rio Jutáí) I) *Potamotrygon orbignyi* (Rio Manacapuru) J) *Potamotrygon* sp. “jabuti” (Rio Tapajós) K) *Potamotrygon* sp. “jutáí” (Rio Jutáí) L) *Potamotrygon* sp. “nhamundá” (Rio Nhamundá). Escala 20 µm para todas as imagens.

Tabela 1. Densidade (número de células/100 µm) de células imunopositivas para a Na⁺/K⁺-ATPase na lamela e no espaço interlamelar das brânquias de duas espécies de dasiatídeos e dos potamotrygonídeos considerados filogeneticamente basais (Rosa et al., 2010). Os dados estão como média±desvio padrão.

Espécie	Rio/Lago	CC-NKA/µ de Lamela	CC-NKA/µ de espaço interlamelar
<i>Dasyatis guttata</i>	O. Atlântico	0,87±0,56	7,17±4,02
<i>Dasyatis marianae</i>	O. Atlântico	0,82±0,41	4,99±1,20
<i>Heliotrygon gomesi</i>	Solimões	0,80±0,23	6,95±2,34
<i>Paratrygon aiereba</i>	Negro	3,0±1,35	3,18±0,55
	Solimões	3,22±1,73	4,71±1,84
	Anavilhanas	9,53±1,74	32,29±7,22
	Nhamundá	0,66±0,5	-
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Solimões	2,19±1,39	4,23±2,78
<i>Potamotrygon yepezi</i>	Maracaibo	1,94±0,99	5,74±2,81
<i>Potamotrygon schroederi</i>	Negro	3,76±1,65	16,63±8,99
	Anavilhanas	2,28±1,25	7,09±2,20
<i>Potamotrygon brachyura</i>	Mutum	4,83±2,58	13,21±6,67
<i>Potamotrygon wallacei</i>	Negro	7,11±3,09	25,86±12,5

Tabela 2. Densidade (número de células/100 μm) de células imunopositivas para a Na^+/K^+ -ATPase na lamela e no espaço interlamelar das brânquias dos potamotrigonídeos considerados como grupo roseta-ocelado (Rosa et al., 2010). Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão.

Espécie	Rio/Lago	CC-NKA/ μ de Lamela	CC-NKA/ μ de espaço interlamelar
<i>Potamotrygon constellata</i>	Manacapuru	5,07 $\pm$ 2,16	18,61 $\pm$ 8,94
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Paraná	5,0 $\pm$ 2,99	21,91 $\pm$ 8,94
<i>Potamotrygon amandae</i>	Paraná	7,0 $\pm$ 3,07	33,95 $\pm$ 24,26
<i>Potamotrygon motoro</i>	Negro	5,37 $\pm$ 2,68	22,97 $\pm$ 10,94
	Solimões	6,12 $\pm$ 2,66	13,02 $\pm$ 9,31
	Jutaí	4,40 $\pm$ 1,59	18,67 $\pm$ 11,17
	Mutum	6,28 $\pm$ 2,78	17,93 $\pm$ 9,23
	Catalão	4,68 $\pm$ 2,89	9,59 $\pm$ 4,94
	Manacapuru	9,48 $\pm$ 1,70	37,64 $\pm$ 12,62
	Nhamundá	4,95 $\pm$ 1,32	7,55 $\pm$ 3,06
<i>Potamotrygon scobina</i>	Jutaí	3,54 $\pm$ 1,85	11,21 $\pm$ 5,59
	Colares	3,71 $\pm$ 1,59	13,76 $\pm$ 6,16
<i>Potamotrygon orbignyi</i>	Negro	5,45 $\pm$ 2,98	10,10 $\pm$ 4,76
	Jutaí	4,84 $\pm$ 2,69	14,85 $\pm$ 9,39
	Manacapuru	8,05 $\pm$ 4,35	22,91 $\pm$ 10,84
<i>Potamotrygon</i> sp. ("jabuti")	Tapajós	8,34 $\pm$ 4,69	26,35 $\pm$ 9,45
<i>Potamotrygon</i> sp. ("jutaí")	Jutaí	3,16 $\pm$ 3,29	11,31 $\pm$ 4,54
<i>Potamotrygon</i> sp. (nhamundá")	Nhamundá	6,01 $\pm$ 2,94	13,76 $\pm$ 9,27

Potamotrygon motoro apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas principais bacias das América do Sul (Rios Amazonas, Orinoco e Paraná-Paraguai). Têm-se postulado que os mecanismos de interação organismo-ambiente podem explicar a ampla plasticidade fenotípica associada à tolerância aos diferentes tipos de habitats de ocorrência dessa espécie. As CCs-NKA da *Potamotrygon motoro* localizam-se preferencialmente na base e espaço interlamelar das lamelas branquiais. Nos exemplares dos rios Negro, Jutaí, Catalão e Manacapuru (Fig. 2-A, C, E e F) as CCs-NKA organizam-se como numerosos agregados de células. A densidade células cloretos na lamela foi maior nos espécimes provenientes do Rio Manacapuru seguidos dos rios Mutum, Solimões, Negro, Nhamundá, Catalão e Jutaí. No espaço interlamelar, a densidade de CCs-NKA foi maior para os espécimes coletados no rio

Manacapuru, comparados aos dos rios Negro, Jutai, Mutum, Solimões, Catalão e Nhamundá (ver tabela 1).

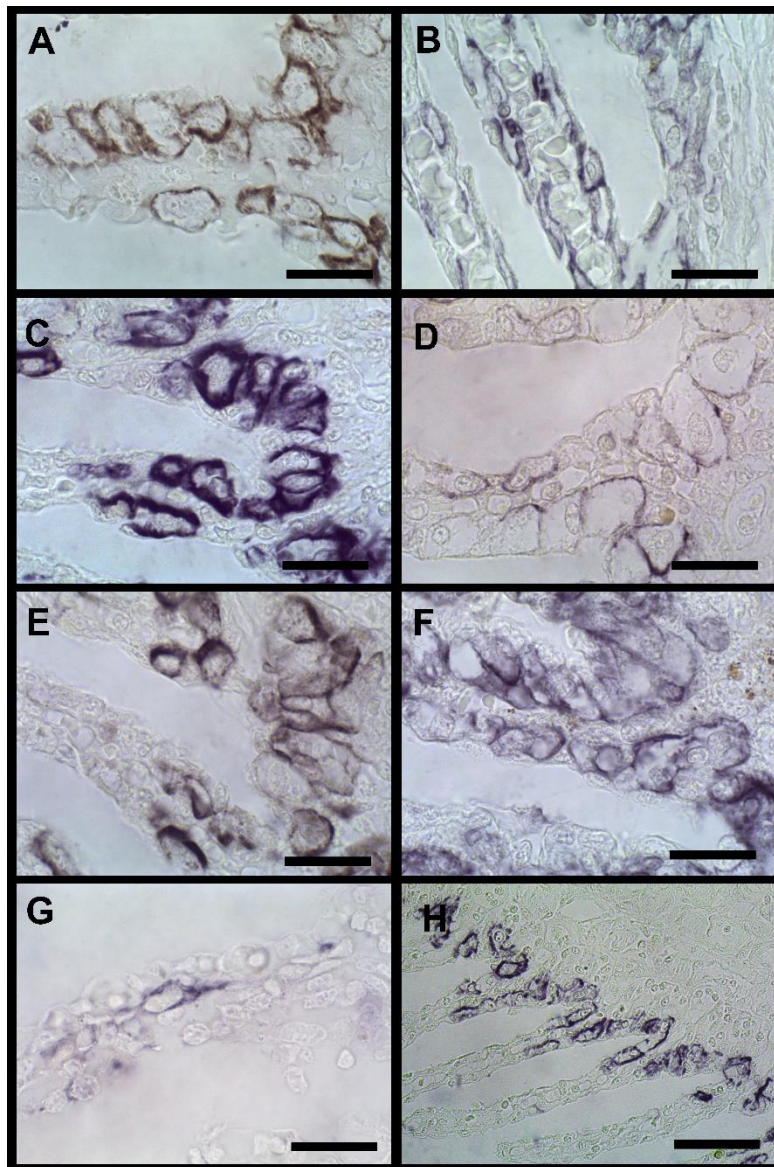


Figura 3. Fotomicroscopia das brânquias de *Potamotrygon motoro* coletada em diferentes rios: A) Rio Negro B) Solimões C) Jutai D) Mutum E) Catalão F) Manacapuru G) Nhamundá. Escala 20 μ m.

6. Discussão

As células cloreto são os principais sítios de absorção iônica em peixes teleósteos e elasmobrânquios (Evans et al. 2005, Duncan *et al.* 2011). Nestas células, a enzima Na^+/K^+ -ATPase localiza-se em uma vasta área tubular, a qual é contínua com a região basolateral (Piermarini e Evans 2000, Evans *et al.* 2005). Estudos ultraestruturais das CCs dos potamotrigonídeos indicam que estas células são semelhantes àsquelas observadas nos representantes marinhos (Duncan *et al.* 2010). Isto explica a forte marcação imunohistoquímica (anticorpo contra a Na^+/K^+ -ATPase) que se observou na periferia e, sobretudo, na região basolateral das CCs-NKA das arraias de água doce. Vários autores sugerem que estas invaginações na região basolateral são os prováveis sítios de localização da Na^+/K^+ -ATPase (Pisam *et al.* 1990, Piermarini e Evans 1998, Piermarini e Evans 2000) e da V-H^+ -ATPase (Piermarini e Evans 2001, Piermarini *et al.* 2002). Em todas as arraias da família Potamotrygonidae a distribuição das CCs imunopositivas para Na^+/K^+ -ATPase (CCs-NKA) ocorre preferencialmente nos espaços interlamelares na região aferente do filamento branquial, e podem ainda ser encontradas difusas no epitélio.

A presença de maior número de células ricas em mitocôndrias (CRM) nos órgãos osmorregulatórios sugere maior potencial para absorção de sais do meio aquático. Espécies como *Potamotrygon wallacei*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon schroederi* *Potamotrygon brachyura* que vivem em ambientes mais diluídos (com baixa concentração de sais com os rios de água preta) tendem a apresentar maior densidade de CRM-NKA branquial favorece os mecanismos de reabsorção de eletrólitos evitando perda de sais para a água. Em síntese, observa-se que a espécie *Potamotrygon motoro* possui uma ampla distribuição geográfica apresenta uma elevada plasticidade fenotípica na densidade e distribuição dos ionócitos (CRM-NKA), o que permite que essa arraia possa osmorregular nas águas com diferentes características físicas e químicas.

Em resumo, as brânquias das arraias de água doce da família Potamotrygonidae apresentam a mesma organização básica encontrada nos demais elasmobrânquios. As CCs-NKA são abundantes no espaço interlamelar e na base da lamela.

7. Referências

- Almeida, M. P.; Barthem, R.B.; Viana, A.S.; Charvet-Almeida, P. 2009. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4: 1-11.
- Carvalho, M .R.; Lovejoy, N.R. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, 2776: 13-48.
- Carvalho, M. R.; Ragno, M.P. 2011. 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 Avulsos de Zoologia*, 51: 101-138. São Paulo.
- Carvalho, M. R.; Rosa, R. S.; Araújo, M. L. G. 2016. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon. *Zootaxa* 4107(4): 566-586.
- Duncan, W. P.; Costa, O. T. F.; Araujo, M. L. G.; Fernandes M. N. 2009. Ionic regulation and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* living in white and blackwaters in the Amazon Basin. *Journal of Fish Biology*, 74: 956–960
- Duncan, W.P.; Fernandes, M.N. 2010. Physicochemical characterization of the white, black, and clear water 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*, 53: 454-464.
- Duncan, W.P.; Silva, N.F.; Fernandes, M.N. 2011. Mitochondrion-rich cells distribution, Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill morphometry of the amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 523-531.
- Evans, D.P.; Piermarini, P.M.; Potts, W.T.W. 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *The Journal Experimental Zoology*, 283: 641–652.
- Evans, D.P.; Piermarini, P.M.; Choe, k.P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological review*, 85: 97–177.

- Fernandes, M. N.; Moron, S. E.; Sakuragui, M. M. 2007. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. p. 93-120. Enfield: *Science Publishers*.
- Fontenelle, J.P.; Silva J. P. C. B.; Carvalho M. R. 2014. *Potamotrygon limai*, sp. nov., a new species of freshwater stingray from the upper Madeira River system, Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa* 3765:249–268.
- Hughes, G. M.; Hoar, W. S.; Randall, D. J. 1984. General anatomy of the gills. *Fish physiology* 1-72.
- Loboda, T. S.; Carvalho, M. R. 2013. Systematic revision of the *Potamotrygon motoro* (Muller e Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 11- 4
- Lovejoy, N.R.; Bermingham, E.; Martin, A.P. 1998. Marine incursion into South America. *Nature*, 396: 421-422.
- Marques, F. L. P. 2000. Evolution of Neotropical Freshwater Stingrays and Theirs Parasites: Taking into Account Space and Time. *Ph.D. Dissertation, University of Toronto*.
- Piermarini, P.M.; Evans, D.H. 2000. Effects of environmental salinity on Na^+/K^+ - ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal Experimental Biology*, 203: 2957-2966.
- Piermarini, P.M.; Evans, D.H. 2001. Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na^+/K^+ – ATPase. *Journal Experimental Biology*, 204: 3251-3259.
- Pisam, M.; Boeuf, G.; Prunet, P.; Rambourg, A. 1990. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *American Journal of Anatomy*, 187: 21-31.
- Rosa, R. S.; Carvalho, M. R.; Wanderley, C. A. 2008. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. *Neotropical Ichthyology* 6(1): 1-8.
- Rosa, R. S.; Charvet-Almeida P.; Quijada, C. C. D. 2010. Biology of the South American Potamotrygonid Stingrays. p. 241-286. En: Carrier, J. C., Musick, J. A., Heithaus, M. R. *Sharks and Their Relatives II: Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation*. Marine Biology Series 11. CRC Press, Boca Ranton, USA.

Silva, J.P.C.B. 2010. Revisão taxonômica e morfológica do complexo *Potamotrygon orbignyi* (Castelnau, 1855) (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). Dissertação de Mestrado, USP Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sioli, H. 1968. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana* 1(3): 267-277.

Wilson, J.M.; Morgan, J.D.; Vogl A.W.; Randall D.J. 2002. Branchial mitochondria-rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132A: 365-374.

Wood, C. M.; Matsuo, A. Y. O.; Gonzalez, R. J.; Wilson, R. W.; Patrick, M. L.; Val, A. L. 2002. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwater of the Rio Negro. *Jornou Experintal Biology*. 205: 3039-3054.

8. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 201 5	Set	Out	Nov	Dez	Jan 201 6	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Coleta de campo	R	R	R									
	Processamento Imunohistoquímica				R	R	R						
	Observação em Microscopia óptica				R	R	R	R					
	Obtenção das imagens					R	R	R	R	R			
	Análise dos resultados obtidos									R	R	R	
	Integração dos Resultados											R	R
	Redação do Relatório Final											R	R

R= realizado; X= a realizar