



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



Evolução dos mecanismos fisiológicos da adaptação ao ambiente de água doce dos peixes amazônicos de origem marinha

Bolsista: Tarcila de Araújo Alves, FAPEAM.

**Manaus
2013**



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/0096/2012-2013

Evolução dos mecanismos fisiológicos da adaptação ao ambiente de água doce dos peixes amazônicos de origem marinha

Bolsista: Tarcila de Araújo Alves

Orientador: Prof. Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan

Manaus
2013

RESUMO

A bacia Amazônica possui cerca de 15 famílias e mais de 60 espécies de peixes cujos principais representantes são principalmente marinhos. Sugere-se que as incursões/conexões marinhas tenham levado elementos da antiga fauna caribenha para os sistemas de lagos com diferentes graus de salinidade. Tem-se postulado que os ancestrais das arraias de água doce (Potamotrygonidae) e das pescadas (Sciaenidae) possam ter colonizado o ambiente de água doce durante uma longa incursão marinha que ocorreu no final do Oligoceno (~25 milhões de anos atrás, M.A). Por outro lado, os ancestrais dos sardinhões (Pristigasteridae) e dos peixes-agulhas (Belonidae) possam ter colonizado as águas continentais no final do Mioceno/início do Plioceno (~5 M.A). Para testar a hipótese da convergência evolutiva para os mecanismos fisiológicos da adaptação ao ambiente de água doce, exemplares das seguintes famílias foram estudados: Potamotrygonidae (*P. schroederi* e *Plesiotrygon iwamae*), Belonidae (*Belonion apodion* e *Potamorrhaphis guianensis*), Pristigasteridae (*Pellona castelnaeana* e *Pellona flavipinnis*) e Scianidae (*Plasgioscion squamosissimus*). Nessas espécies foram estudados os teores plasmáticos dos íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{+2} e Ca^{+2}), uréia, amônia e osmolalidade total. Além disso, analisou-se densidade de volume das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase, células mucosas e demais componentes branquiais. Todos os representantes das diferentes famílias de peixes de origem osmorregulam por meio de íons. Sendo que as variações nos níveis de íons plasmáticos estão associadas aos parâmetros físicos e químicos da água onde cada animal foi coletado. Em relação à densidade de células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase não existe um padrão estruturado em relação ao tempo em que o ancestral marinho colonizou o ambiente de água doce. As células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase dos peixes teleósteos de origem marinha são pequenas, enquanto a dos elasmobrânquios são maiores. Teleósteos e elasmobrânquios diferem em relação à distribuição da Na^+/K^+ -ATPase na região basolateral. Nos teleósteos a bomba iônica distribui-se ao longo de um sistema tubular enovelado no interior da célula cloreto, enquanto nos elasmobrânquios, a enzima apresenta distribuição periférica. Nos elasmobrânquios, as células mucosas armazenam mucinas ácidas (azul de Alcian-positivas) e neutras (PAS-positivas), enquanto nos teleósteos foi observado apenas mucinas ácidas. Exceto no peixe-agulha (Belonidae), onde foram observadas apenas células mucosas com mucinas neutras.

PALAVRAS-CHAVE: Peixes de água doce de origem marinha, osmorregulação, interação-organismo ambiente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso (g) e número de exemplares de peixes de diferentes famílias utilizados nesse estudo.....	3
Tabela 2. Características físicas e químicas dos rios Negro e Solimões onde os animais foram coletados.	6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplares representantes das diferentes famílias de peixes considerados invasores marinhos.	4
Figura 2. Concentração de íons Na^+ e Cl^- (A) e razão entre a quantidade Na^+/Cl^- no plasma (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.	7
Figura 3. Concentração de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} (A) e K^+ no plasma (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.	7
Figura 4. Concentração de uréia e amônia (A) e osmolalidade plasmática (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.	8
Figura 5. Densidade relativa (%) das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase, células pavimentosas, células pilares e espaço sangue.....	9
Figura 6. Distribuição das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase em diferentes representantes das 4 famílias de peixes de origem marinhas.....	10
Figura 7. Distribuição das células mucosas ácidas (azul de Alcian-positivas, pH 2,5) em diferentes representantes das 4 famílias de peixes de origem marinhas.....	11

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. METODOLOGIA.....	3
3.1. Análise das características físicas e químicas da água.....	3
3.2. Coleta dos espécimes e das amostras de tecido	3
3.3. Análise de eletrólitos plasmáticos.....	4
3.4. Microscopia de luz.....	4
3.4.1. Análise imunohistoquímica para identificação das células cloreto ricas em ATPases	5
3.4.2. Identificação de células mucosas.....	5
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	5
4.1. Variáveis físicas e químicas da água.....	5
4.2. Perfil dos íons, ureia e osmolalidade plasmáticos	6
4.3. Componentes estruturais das brânquias e distribuição das células cloreto.....	8
4.4. Células mucosas e tipos de mucinas armazenadas.....	10
5. CONCLUSÕES	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
7. CRONOGRAMA.....	14

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos autores sugere que as incursões marinhas durante o Mioceno tiveram um papel crucial na origem e evolução dos peixes de água doce de origem marinha e que a fauna ancestral caribenha pode ter sido a principal fonte de grupos marinhos para a evolução de espécies endêmicas na América do Sul (HOORN et al., 1994). Segundo LOVEJOY et al., 2006, os ancestrais dos principais grupos taxonômicos de peixes água doce de origem marinha podem surgido entre duas grandes incursões marinhas que ocorreram entre o final do Oligoceno e o início do Plioceno. Embora que, durante o Mioceno, a paleo-bacia Amazônica tenha sido afetada por inúmeras incursões marinhas separadas. Autores como Lovejoy et al. (2006) sugerem que os potamotrigonídeos e as pescadas (*Plasgioscion*) surgiram na primeira grande incursão marinha (~25 M.A), enquanto os demais grupos na segunda (~5 M.A) incursão. Considerando as informações citadas anteriormente e dos modelos vigentes para os mecanismos de troca iônica em peixes marinhos e água doce, algumas questões podem ser levantadas:

- Os mecanismos fisiológicos da tolerância ao ambiente de água doce estão estruturados em função do tempo de origem evolutiva do grupo?
- As estratégias fisiológicas nos diferentes grupos taxonômicos evoluíram por convergência durante a transição marinha-água doce?
- Os padrões de regulação iônica estão mais relacionados às variáveis físicas e químicas da água que do tempo e/ou período de origem evolutiva do grupo?

Para que estas questões possam ser analisadas, as famílias Pristigasteridae (sardinhão) e Belonidae (peixes-agulhas) serão aqui consideradas como membros do grupo A, que inclui espécies cujo ancestral pode ter surgido nas incursões marinhas no início do Plioceno (~5 M.A); enquanto as famílias Potamotrygonidae (arraias de água doce) e Sciaenidae (pescadas) serão incluídas no grupo B, espécies cujo ancestral pode ter surgido no final do Oligoceno (~25 M.A).

Em peixes, as brânquias representam um sítio para os mais importantes processos fisiológicos, tais como a troca de gases respiratórios e o equilíbrio iônico (HWANG & PERRY, 2010). O epitélio branquial dos peixes de água doce é caracterizado pela presença de três tipos de células diferenciadas: célula pavimentosa (CPV), célula mucosa (CM) e célula-cloreto (CC). As CPVs revestem a maior parte da superfície branquial, enquanto as CMs e as CCs representam <10% deste total. Em todas as espécies, as CCs normalmente são encontradas entre as lamelas na região aferente do filamento e, ocasionalmente no epitélio da lamela (EVANS et al., 2005). 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 Na^+/K^+ - ATPase e H^+ -ATPases localizam-se em vasta área tubular contínua à região basolateral (EVANS et al., 2005; DUNCAN et al., 2011). A identificação de células ricas em mitocôndrias ricas em Na^+/K^+ - ATPase (NKA-MRC) no epitélio branquial de diversas espécies de potamotrigonídeos tem sido recentemente descrito (DUNCAN et al., 2010; DUNCAN et al., 2011). Um dos primeiros modelos propostos para o transporte de íons no epitélio branquial envolvendo a bomba eletrogênica Na^+/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 Na^+/K^+ - ATPase é criar um gradiente eletroquímico para que o Na^+ e Cl^- possam tomados pela região apical das células cloreto. Enquanto que, para teleósteos marinhos a atividade da Na^+/K^+ -

ATPase favorece a excreção de Cl^- , enquanto o excesso de Na^+ é eliminado por uma via paracelular.

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). De acordo com Wood et al. (2002), ao longo da história evolutiva do grupo, o sistema de troca iônica originalmente moldado para as funções no ambiente marinho pode ter sido organizado de maneira que as estratégias osmorregulatórias fossem semelhantes às aquelas encontradas nos ciclídeos que vivem nas águas pobres em íons do Médio Rio Negro (WILSON et al., 1999). Porém, não se sabe se esses mecanismos evoluíram por convergência. Com essas hipóteses estabelecidas, torna-se interessante investigar os mecanismos fisiológicos da tolerância ao ambiente de água doce em diferentes famílias de peixes considerados de origem marinha.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho executou um estudo sobre a evolução dos mecanismos fisiológicos da tolerância ao ambiente dulciaquícola em grupos (Pristigasteridae, Belonidae, Sciaenidae e Potamotrygonidae) de peixes de água doce da Amazônia cujos ancestrais evoluíram nos sistemas de água doce da bacia Amazônica em momentos distintos durante o Oligoceno e Plioceno.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização dos ambientes aquáticos (através de valores de pH, concentração de oxigênio, sólidos totais dissolvidos, tipo de água, concentração de íons dissolvidos e condutividade elétrica) dos representantes das famílias citadas anteriormente;
- Análise de solutos osmorregulatórios (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , uréia e amônia) e osmolalidade plasmática destes animais;
- Propor um padrão evolutivo dos mecanismos de adaptação ao ambiente de água doce baseado no perfil da fisiologia osmótica e na organização das células do epitélio branquial e identificação das células-cloreto ricas em Na^+/K^+ - ATPase branquial, a principal bomba iônica envolvida no transporte de íons da água para o animal;
- Quantificação de células mucosas presentes nos filamentos branquiais;

3. METODOLOGIA

3.1. Análise das características físicas e químicas da água

As variáveis físicas e químicas como pH, temperatura (°C), condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e concentrações de oxigênio (mg/L) foram analisadas por meio de aparelho multiparametro da marca Consort/C535. Essas análises foram realizadas em dez medidas espacialmente separadas em 500 m entre si nas mesmas áreas de coleta das espécies utilizadas nesse estudo. As amostragens das características físicas e químicas da água, quanto as coletas dos exemplares de peixes foram georreferenciadas com um uso de um GPS Garmin Etrex Adventure.

3.2. Coleta dos espécimes e das amostras de tecido

Os dados de peso (g), número espécimes coletados e local (rio) de captura dos representantes de diferentes famílias de peixes de água doce de origem marinha (Fig.1) estão apresentados na tabela 1. O potamotrigonídeo *Potamotrygon schroederi* e o peixe-agulha (*Belonion apodium*) foram coletados por meio de rapiché na região de Barcelos no Médio Rio Negro (S00°41'881" W62°59'153"). Os representantes das demais famílias foram capturados utilizando malhadeiras nas margens do Rio Solimões, próximo ao município de Iranduba (3°20'S; 60°20'W). Após captura foram anestesiados (MS-222 tamponado) e sacrificados por contusão cefálica. Com uma agulha de insulina heparinizada foi retirada uma amostra de sangue da veia caudal. Uma das brânquias foi retirada e, imediatamente fixada in situ por imersão em solução Bouin (ácido pícrico saturado, formaldeído e ácido acético) e processadas para métodos imunohistoquímicos.

Tabela 1. Peso (g) e número de exemplares de peixes de diferentes famílias utilizados nesse estudo.

Espécies	Peso (g)	Local/rio
Peixe-agulha (<i>Belonion apodium</i>) Collette, 1966	19,5 $\pm$ 2,1 (N=7)	Rio Negro
Pescada (<i>Plagioscion squamosissimus</i>) Heckel, 1840	337,5 $\pm$ 22,9 (N=8)	Rio Solimões
Apapá (<i>Pellona casteunaeana</i>) Valenciennes, 1847	1515,6 $\pm$ 57,7 (N=6)	Rio Solimões
<i>Potamotrygon schroederi</i> Fernandez-Yepey, 1958	480 $\pm$ 58 (N=4)	Rio Negro
<i>Plesiomyxus iwamae</i> Rosa, Castello & Thorson, 1987	5333 $\pm$ 54 (N=4)	Rio Solimões

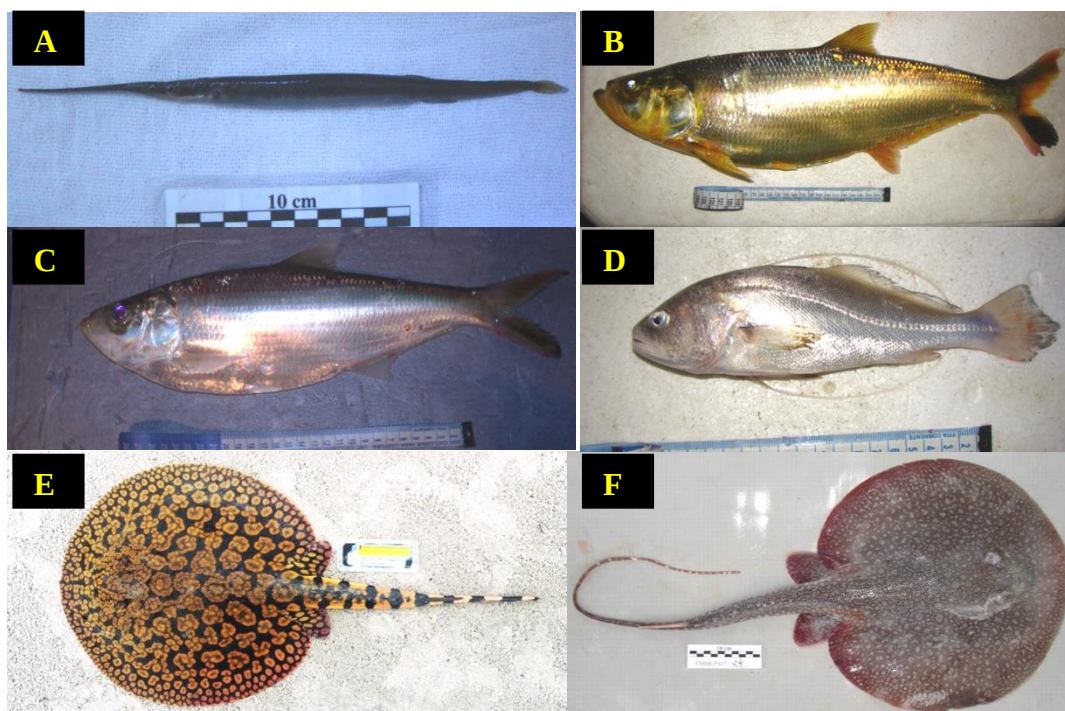


Figura 1. Exemplos representativos das diferentes famílias de peixes considerados invasores marinhos: A- peixe-agulha (Belonidae: *Belonion apodion*); B- apapá (Pristigasteridae: *Pellona castelnaeana*); C- sardinhão (Pristigasteridae: *Pellona flavipinnis*); D- pescada (Sciaenidae: *Plagioscion squamosissimus*); E – arraia (Potamotrygonidae: *Potamotrygon schroederi*); F- arraia (Potamotrygonidae: *Plesiotrygon iwamae*).

3.3. Análise de eletrólitos plasmáticos

O sangue retirado foi armazenado em tubo de polietileno e imediatamente centrifugado, em seguida o plasma foi separado e armazenado em gelo. Para as análises dos íons cloreto, cálcio, magnésio, uréia e amônia, as amostras foram diluídas (10 µl da amostra para 190 µl de reagente de cor) e coloração formada foi lida em leitora de microplacas em comprimento de onda que variavam de 450 a 595 nm. As concentrações de Na⁺ e K⁺ (mmol/l) no plasma foram analisadas por fotometria de chama.

3.4. Microscopia de luz

As brânquias fixadas em solução Bouin em baixa temperatura (~24 horas) foram preservadas em álcool 70%. Após isso, as brânquias 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). As amostras foram incluídas em parafina histológica nas posições longitudinais e sagitais ao filamento branquial. Os cortes através de microtomia com secções de 7 µm.

3.4.1. Análise imunohistoquímica para identificação das células cloreto ricas em ATPases

A identificação das células cloreto ricas em ATPases foram realizadas conforme protocolos estabelecidos por Piermarini & Evans (2001) e Duncan et al., 2010. Foram secções seriais de 8 µm paralelas ao eixo dos filamentos (de cada um dos arcos branquiais) foram montadas em lâminas cobertas com poli-L-lisina. As secções foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em álcool concentrações de 100%, 90%, 80%, 70%, 50%, e em água destilada, e subseqüentemente com duas lavagens em Tampão Tris Salino (TBS 10M, 1% Triton, pH 7,4) ou Tampão Fosfato Salino (PBS 10M, 1% Triton, pH 7,4). Uma solução de H₂O₂ (3%) foi usada para inibir a atividade da peroxidase endógena. As secções foram pré-incubadas com NGS (Normal GoatSerum, 20%) por 20 min em câmara úmida. Depois foram incubadas por 12 horas a 25° C com anticorpo primário anti subunidade α5 da Na⁺/K⁺ - ATPase (diluído 1:200). Após incubação, as lâminas foram lavadas com TBS/PBS e, novamente, incubadas com um segundo anticorpo GAMPO (GoatAnti-Mouse) conjugado à peroxidase durante 45 min a 25° C. Depois, as secções foram lavadas com PBS por 10 min. Para visualização dos anticorpos ligados será adicionado 3,3'-diaminobenzidina tetra-hidrocloreto (DAB) por 15 min e em seguida amostra foi novamente desidratada para montagem de lâmina permanente .

A quantificação foi realizada por meio da contagem de células imunopositivas Na⁺/K⁺ - ATPase (cloreto), células pavimentosas, células pilar, e espaço sangue através do software online Stepanizer (<http://www.stepanizer.com/>).

3.4.2. Identificação de células mucosas

Foram confeccionadas lâminas em parafina para quantificação das células mucosas presentes nos filamentos branquiais das espécies, após a retirada da parafina com xilol, as lâminas foram desidratadas em álcool com diferentes concentrações (100%, 900%, 80%, 70% e 50%) por 3 minutos. Para identificação das células mucosas ricas em mucossustâncias neutras foi utilizado o método da oxidação com ácido periódico e reagente de Schiff (PAS). Para identificação das células mucosas ricas em mucossustâncias ácidas utilizou-se o corante azul de Alcian (pH 2,5). As lâminas foram montadas e fotografadas. As células mucosas foram quantificadas por meio do software Estereológico Stepanizer (<http://www.stepanizer.com/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variáveis físicas e químicas da água

Os resultados das análises dos padrões físico-químico (variáveis como pH, temperatura (°C), condutividade elétrica (µS/cm), sólidos totais dissolvidos (TDS,mg/l) e concentrações de oxigênio (mg/L) da água onde os peixes foram coletados estão apresentados na Tabela 2. A água do Rio Solimões apresentou pH circumneutro, elevada condutividade elétrica e riqueza em sólidos totais dissolvidos. Por outro lado, o Rio Negro possui água preta, pH ácido e baixa condutividade. Esses valores são semelhantes aos já descritos para esses rios (DUNCAN & FERNANDES, 2010).

Tabela 2. Características físicas e químicas dos rios Negro e Solimões onde os animais foram coletados.

Rios/tributários	pH	Cond. ($\mu\text{S/cm}$)	[O ₂] (mg/l)	Temp (°C)
Rio Negro (N=10)	4,0 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 1	4,1 $\pm$ -,6	29 $\pm$ 1
Rio Solimões (N=10)	6,8 $\pm$ 0,4	110 $\pm$ 5	5,1 $\pm$ 0,6	28 $\pm$ 1

4.2. Perfil dos íons, ureia e osmolalidade plasmáticos

Foram analisados os íons (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg⁺² e Ca⁺²), ureia e amônia do plasma das espécies consideradas invasoras marinhas (Fig 2-4). Todos os exemplares das famílias de origem marinha possuem perfil de eletrólitos diferentes dos seus representantes marinhos. Peixes marinhos possuem elevados teores de Na⁺, Cl⁻ e Ca⁺² quando comparados aos peixes de água doce (EVANS et al., 2004). Estudos anteriores demonstraram que osmorregulação em potamotrigonídeos é semelhante ao de teleósteos de água doce sendo caracterizada por baixas concentrações de eletrólitos (WOOD et al., 2002). As arraias (potamotrigonídeos) apresentam teores de íons Na⁺ ligeiramente superior em relação às demais famílias. Contudo, há uma grande variação espécie-específica na concentração desses eletrólitos (Fig. 2 e 3). Além disso, tais variações podem estar associadas aos respectivos ambientes de captura do grupo taxonômico, portanto pode ser um padrão osmorregulador associado ao ambiente, conforme já observado em diferentes populações da arraia *Paratrygon aiereba* coletada em dois tipos de águas, preta e branca (DUNCAN et al., 2009). Apesar dos baixos teores de Na⁺ e Cl⁻ plasmáticos (Fig. 2A) nos belonídeos (peixes-agulhas), a relação Na⁺/Cl⁻ (Fig. 2B) é semelhante ao perfil observado nas arraias de água doce (mais especificamente em *P. schroederi*). Sugerimos que essa semelhança pode estar associada ao ambiente aquático, pois tanto *P. schroederi*, quanto *Belonion apodion* e *Potamorrhaphis guianensis* foram capturados no mesmo sistema de água preta (Rio Negro). O perfil dos teores de Na⁺ e Cl⁻, bem como a relação Na⁺/Cl⁻ nos Pristigasteridae e na pescada (Sciaenidae) são parecidos. Mais uma vez, sugerimos que essa semelhança também pode estar associada ao tipo de água, pois os apapás, os sardinhões e as pescadas foram coletados no mesmo rio (Rio Solimões). Em relação aos íons divalentes (Ca⁺² e Mg⁺²), observa-se que os teores plasmáticos são semelhantes entre todos as famílias estudadas (Fig. 3A e B). Tanto o Ca⁺², quanto o Mg⁺² são íons importantes, pois atuam como mensageiros intracelulares (Ca⁺²) e cofatores de várias enzimas e bombas iônicas (Mg⁺²) (HIROSE et al., 2003). Portanto, considerando o papel crucial dos íons Ca⁺² e Mg⁺² os níveis desses eletrólitos são extremamente regulados, independentemente do grupo taxonômico. A ureia é um soluto encontrado em elevadas concentrações no plasma de elasmobrânquios marinhos (EVANS et al., 2004), porém, sabe-se que tanto teleósteos marinhos quanto nos grupos de água doce (elasmobrânquios e teleósteos) a ureia não é um soluto utilizado para osmorregulação (DUNCAN et al., 2009). De fato, observou-se baixos valores plasmáticos de ureia em todos os representantes das 4 famílias estudadas (Fig. 4-A). Isso reforça a tese que

animais de água doce osmorregulam por meio de eletrólitos. Os valores de osmolalidade total no plasma foram semelhantes em todos os representantes das famílias estudadas (Fig. 4-B). Porém, observou-se que os valores de osmolalidade no plasma do peixe agulha *Belonion guianensis* (Belonidae) foram baixos quando comparados às demais famílias. Este baixo valor pode ser devido ao baixo teor de íons cloretos no plasma.

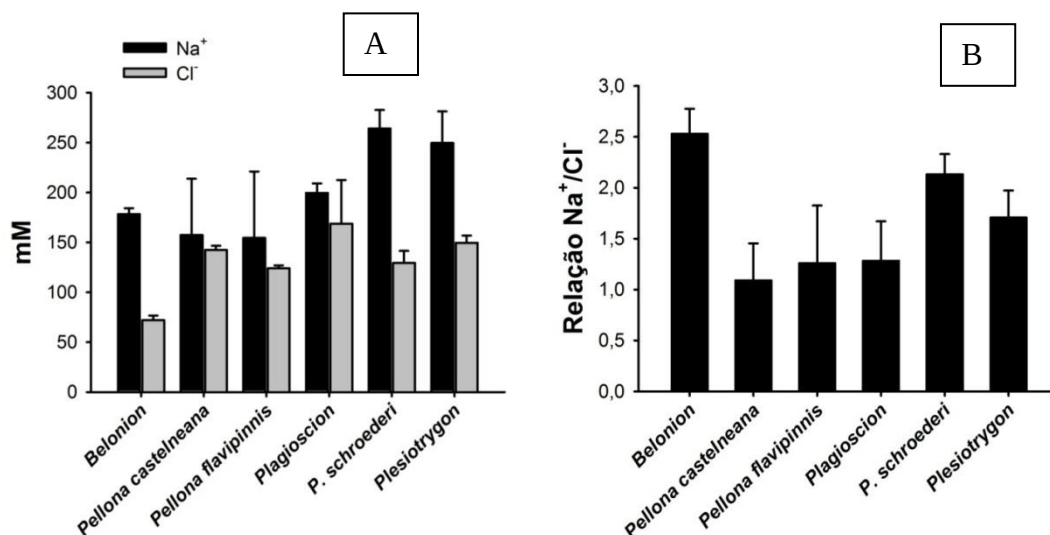


Figura 2. Concentração de íons Na^+ e Cl^- (A) e razão entre a quantidade Na^+/Cl^- no plasma (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.

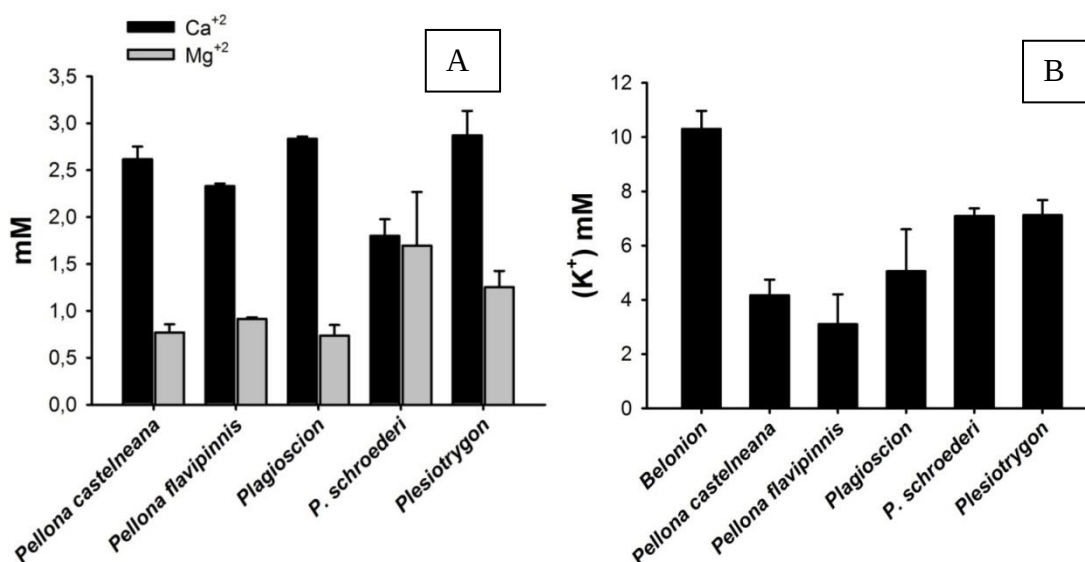


Figura 3. Concentração de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} (A) e K^+ no plasma (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.

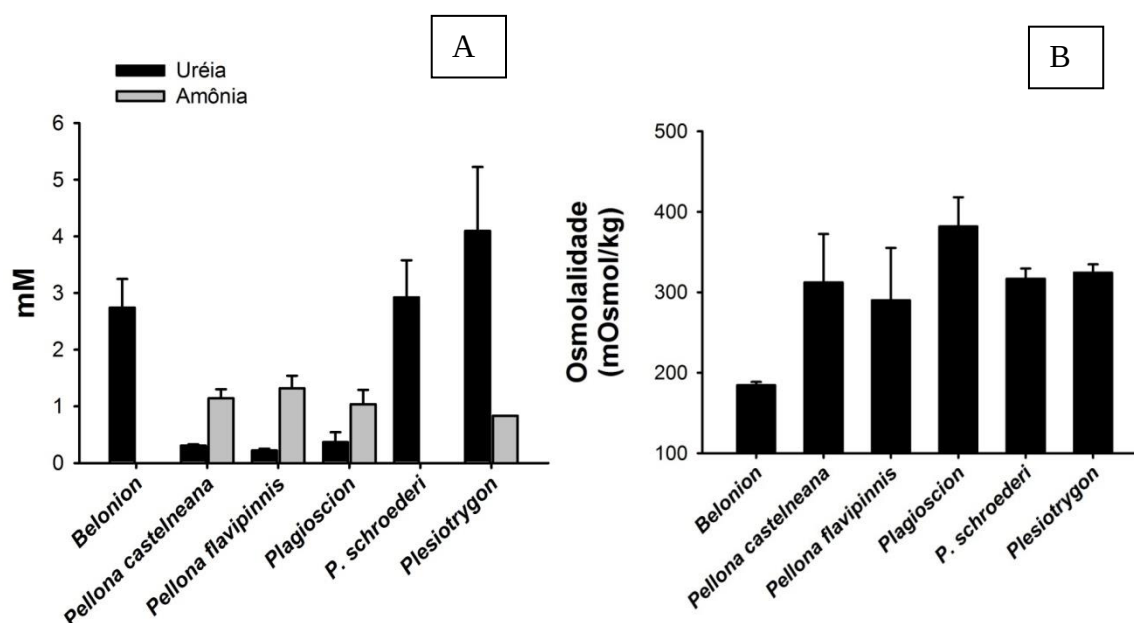


Figura 4. Concentração de uréia e amônia (A) e osmolalidade plasmática (B) dos peixes provenientes de linhagens marinhas.

4.3. Componentes estruturais das brânquias e distribuição das células cloreto

As densidades relativas dos componentes das lamelas brânquias entre as diferentes espécies de peixes de origem marinha estão apresentados na Figura 5. Observa-se que existe uma maior densidade de células cloreto (CCs) nas brânquias do peixe-agulha (*Belonion apodion*) e da pescada (*Plagioscion squamosissumus*). No entanto, há uma grande variabilidade observada entre as diferentes espécies estudadas. A arraia *Plesiotrygon iwamae* apresenta maior densidade de células pavimentosas, consequentemente, uma menor proporção de células cloreto em relação às demais espécies. Nas brânquias as principais células diferenciadas são: célula pavimentosa (CPV), célula mucosa (CM) e célula-cloreto (CC). As CPVs recobrem quase toda a superfície do filamento, incluindo o espaço interlamelar, e as lamelas secundárias. Em peixes de água doce, existem evidências que as CPVs têm papel importante na tomada de íons e equilíbrio ácido-base (EVANS et al., 2005). As células pilares constituem os componentes estruturais para o espaço onde o sangue flui dentro das lamelas (EVANS et al., 2004). Observa-se que no apapá (*Pellona castelneana*) há maior proporção de células pilares, sugerindo maior resistência sanguínea na parede do epitélio respiratório.

Em se tratando de mecanismos de transporte iônico, as CCs são consideradas as mais importantes células do epitélio branquial devido ao seu papel na regulação iônica (MARSHALL & BRYSON, 1998). Em peixes marinhos, a CC possui um complexo sistema labirinto-tubular no citoplasma. Morfologicamente, as células cloreto de todos os representantes de peixes teleósteos de origem marinha nesse estudo são relativamente menores que aquelas observadas nas arraias de água doce (Fig. 6A-D). Além disso, apresentam uma forte marcação escura na região central da célula. Isso sugere um intrincado sistema membranoso tubular enovelado. Nas arraias (Potamotrygonidae), as CCs são claramente maiores, porém, observa-se apenas uma membrana basolateral moderadamente invaginada (Fig. 6E-F), tal como já descrita para vários outros potamotrigonídeos (DUNCAN et al., 2010; DUNCAN et al., 2011). Isso explica a forte marcação imunohistoquímica (anticorpo contra a Na^+/K^+ -ATPase) na periférica e, sobretudo, na

região basolateral das CCs ricas em Na^+/K^+ -ATPase das arraias de água doce. As invaginações e/ou enovelamento na região basolateral são os prováveis sítios de localização da Na^+/K^+ -ATPase (PIERMARINI & EVANS, 2001) e da V-H^+ -ATPase (PIERMARINI et al., 2002).

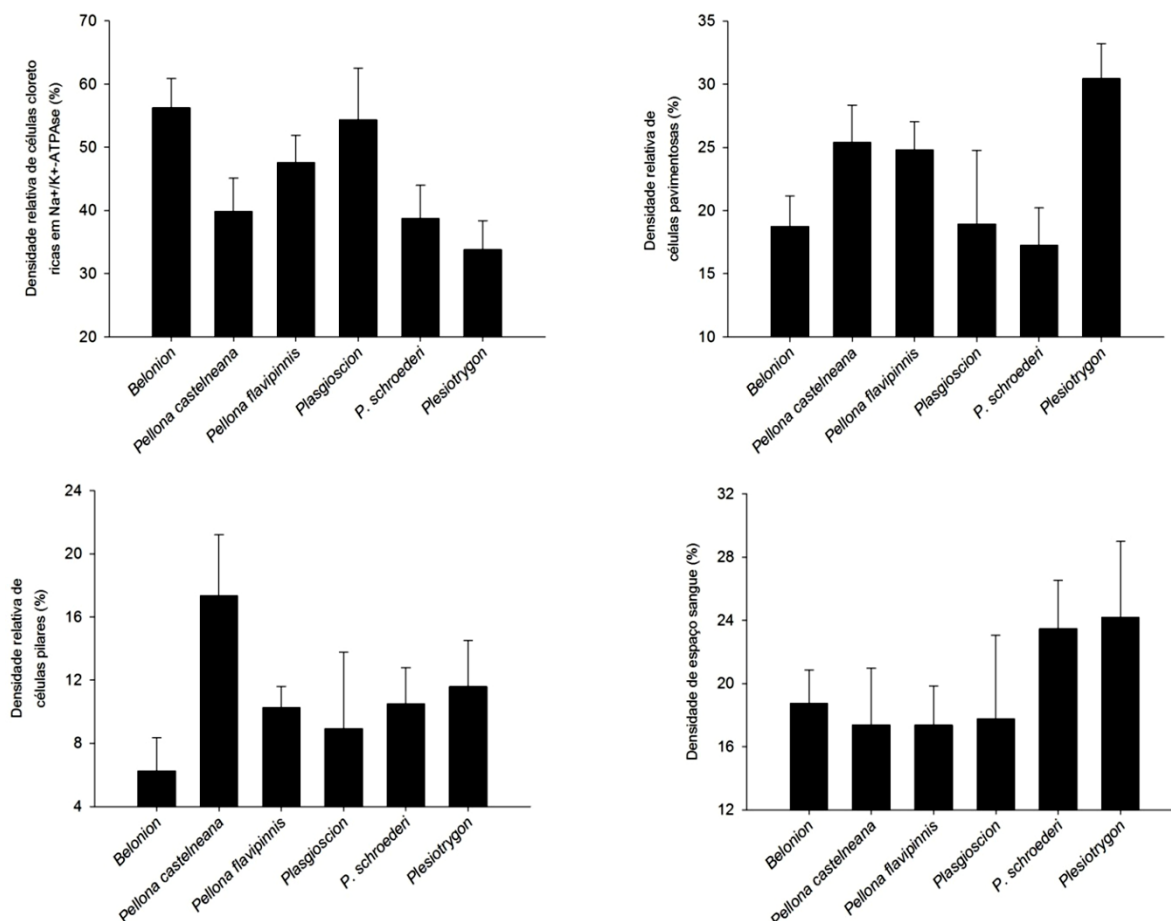


Figura 5. Densidade relativa (%) das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase, células pavimentosas, células pilares e espaço sangue nos diferentes exemplares das famílias de peixes de origem marinha.

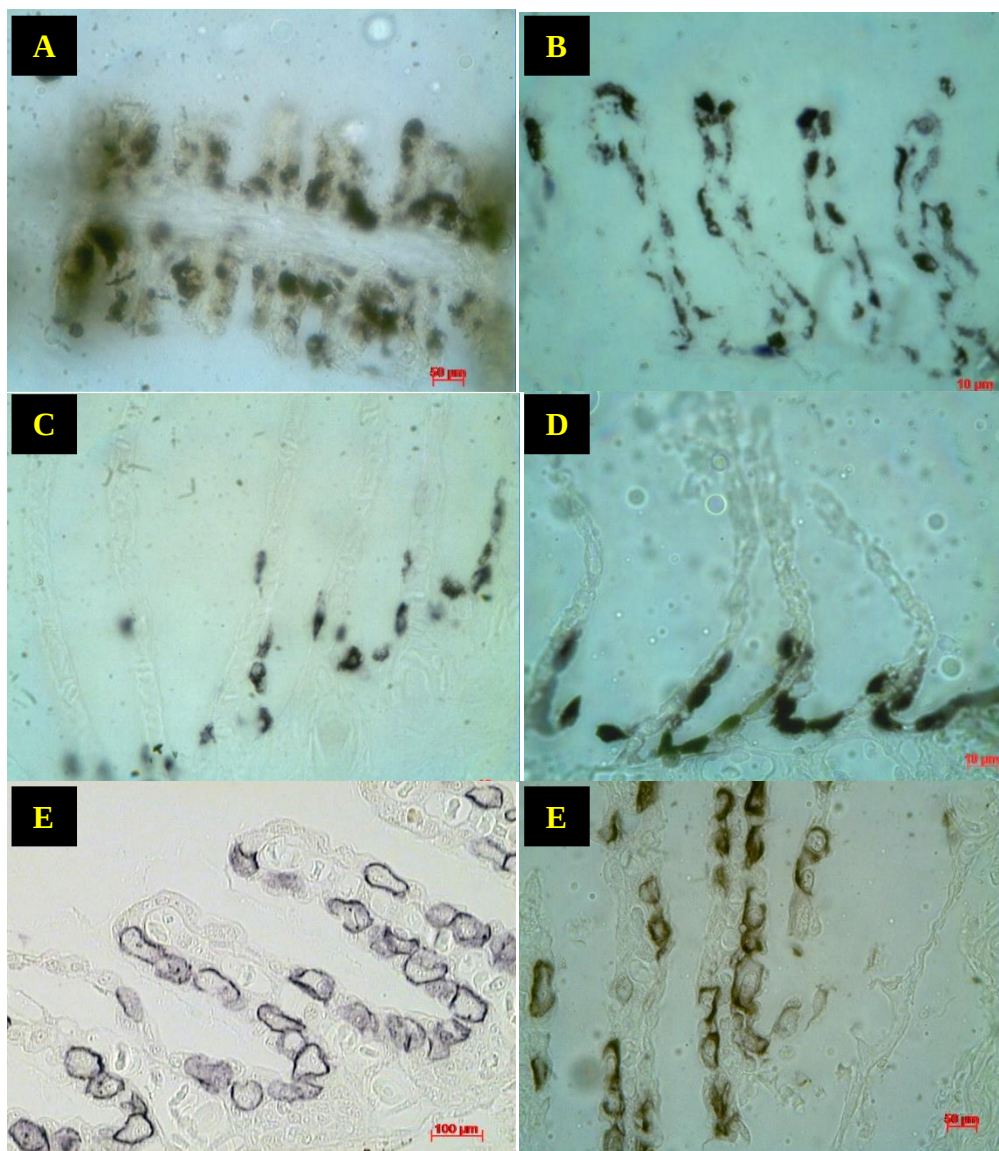


Figura 6. Distribuição das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase em diferentes representantes das 4 famílias de peixes de origem marinhas: A- peixe-agulha (*Belonion apodion*); B- apapá (*Pellona casteauneana*); C- sardinhão (*Pellona flavipinnis*); D- *Plagioscion squamosissimus*; E- arraia *Potamotrygon schroederi*; F- arraia *Plesiotrygon iwamae*.

4.4. Células mucosas e tipos de mucinas armazenadas

Em todas as espécies, as células mucosas estão distribuídas principalmente nas bordas externa e interna do filamento branquial e são raras nos espaços interlamelares e nas lamelas. Nos representantes da família Pristigasteridae (apapá e sardinhão) e na pescada (Sciaenidae), o principal tipo de mucossubstância (mucina) presentes nas células mucosas são do tipo ácido (Fig. 7A-D). Nos belonídeos (peixe-agulha), foi encontrado apenas células mucosas neutras nas pontas dos filamentos branquiais (Fig. 7A), enquanto nos potamotrigonídeos (arraias), observou-se os dois tipos: mucinas neutras e ácidas dentro da mesma célula (Fig. 7E-F). As mucinas ácidas são marcadas pelo método do azul de Alcian em pH 2,5 ou pH 1,0. O azul de Alcian em pH 2,5 cora tanto mucinas ácidas sulfatadas quanto as carboxiladas. Em pH 1,0, apenas as

mucinas carboxiladas são coradas em azul de Alcian. Observou-se que as células mucosas foram fracamente positivas para a técnica do PAS (ácido periódico de Schiff). Esse método marca especialmente as mucinas neutras presentes nas células mucosas.

As mucosubstâncias ácidas podem prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos na superfície epitelial (MITTAL et al., 1994); enquanto, mucosubstâncias neutras podem estar associadas à proteção e lubrificação do epitélio branquial contra o atrito (SIBBING & URIBE, 1985). Além disso, segundo Handy & Eddy (1989), o muco produzido pelos peixes de água doce apresenta maior concentração de Na^+ e Cl^- do que a água circundante. Portanto, isto pode ser de extrema importância para os mecanismos de transporte iônico no epitélio branquial das espécies que vivem nas águas pobres em íons do rio Negro, tais como o peixe-agulha (*Belonion guianensis*) e a arraia *P. schroederi*. Outra explicação é que as células mucosas que secretam mucinas neutras podem ajudar na proteção da mucosa branquial contra a acidez da água do Rio Negro.

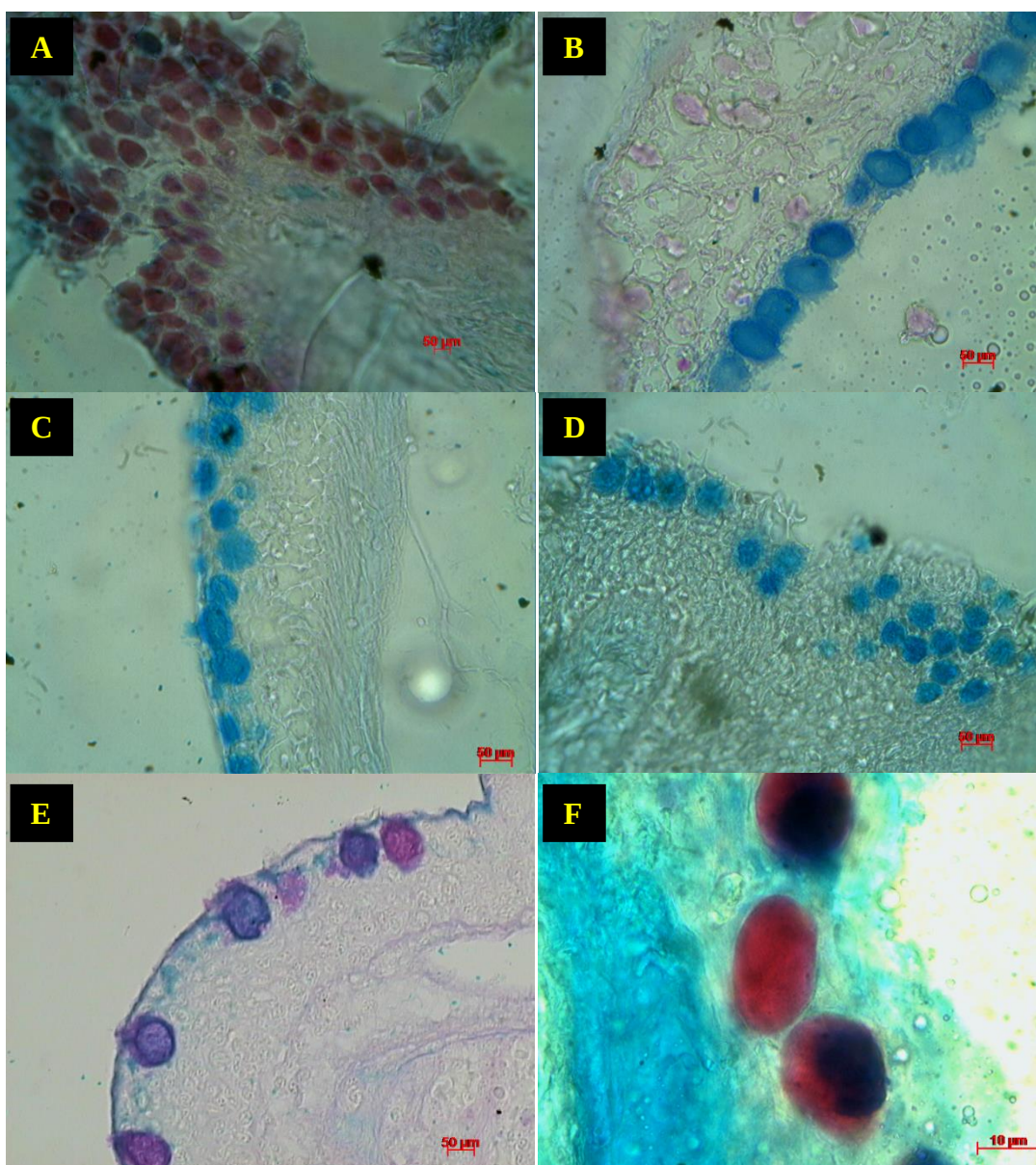


Figura 7. Distribuição das células mucosas ácidas (azul de Alcian-positivas, pH 2,5) em diferentes representantes das 4 famílias de peixes de origem marinhas: A- peixe-agulha (*Belonion apodion*); B- apapá (*Pellona casteauneana*); C- sardinhão (*Pellona flavipinnis*); D- *Plagioscion squamosissimus*; E- arraia *Potamotrygon schroederi*; F-arraia *Plesiotrygon iwamae*.

5. CONCLUSÕES

- Todos os representantes das diferentes famílias de peixes de origem osmorregulam por meio de eletrólitos (íons);
- As variações nos níveis de íons plasmáticos estão associadas aos parâmetros físicos e químicos da água onde cada animal foi coletado;
- Em relação à densidade de células cloreto ricas em Na⁺/K⁺-ATPase não existe um padrão estruturado em relação ao tempo em que o ancestral marinho colonizou o ambiente de água doce;
- Teleósteos e elasmobrânquios diferem em relação à distribuição da Na⁺/K⁺-ATPase na região basolateral. Nos teleósteos a bomba iônica distribui-se ao longo de um sistema tubular enovelado no interior da célula cloreto, enquanto nos elasmobrânquios, a enzima apresenta distribuição periférica;
- As células cloreto ricas em Na⁺/K⁺-ATPase dos peixes teleósteos de origem marinha são pequenas, enquanto a dos elasmobrânquios são maiores;
- Nos elasmobrânquios, as células mucosas armazenam mucinas ácidas (azul de Alcian-positivas) e neutras (PAS-positivas), enquanto nos teleósteos foi observado apenas mucinas ácidas. Exceto no peixe-agulha (Belonidae), onde foram observadas apenas células mucosas com mucinas neutras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. 3, p. 454-464, 2010.
- 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 *Paratrygonaireba* 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**, v. 37, p. 523-531, 2011.
- EVANS D.H.; PIERMARINI, P.M. & CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Review**, n. 85, p. 97-177, 2005.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M. & CHOE, K.P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation and nitrogen excretion. In **Biology of sharks and their relatives** (Carrier, J. C., Musick, J. A. & Heithaus, M. R., eds.), p. 247-268. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
- HANDY, R.D. & EDDY, F.B. The absence of mucus on the secondary lamellae of unstressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Biol.**, v. 38, p. 153-162, 1991.
- HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.B, n.136, p.593-620, 2003.
- HOORN, C. An environment reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle-Late Miocene, NW Amazonia). **PalaeogeographyPalaeoclimatology and Palaeoecology**, v. 112, p. 187-238, 1994.
- HWANG, P. P., PERRY, S. F. Ionic and acid-base regulation. In: PERRY, S. F.; EKKER, M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology**, Academic Press, v.29, p. 311-344, 2010.
- 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.
- 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 Histochem. Citochem.**, v. 27, p. 193-204, 1994.
- PIERMARINI, P.M.; EVANS, D.H. Effects of environmental salinity on Na^+/K^+ - ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis Sabina*). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 2957-2966, 2000.
- SIBBING, F.A. & URIBE, R. Regional specialization in the oro-pharyngeal wall and food processing in the carp *Cyprinus carpio*. **Neth. J. Zool. Leiden**, v. 35, p. 377-422, 1985.
- 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^+/K^+ - ATPase in chloride transport. **American Journal of Physiology**, v. 233, p. 298-306, 1977.
- WILSON, J.M., MORGAN, J.D., VOGL, A.W. & RANDALL, D.J. Branchial mitochondria- rich cells in the dogfish *Squalusacanthias*. **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., 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.

