

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



INFLUÊNCIA DAS ÁGUAS AMAZÔNICAS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES

Aluno: Cleverson Agner Ramos
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2012

Cleverson Agner Ramos

INFLUÊNCIA DAS ÁGUAS AMAZÔNICAS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R175ia Ramos, Cleverson Agner.
Influência das águas amazônicas no compromisso osmorrespiratório em osteoglossiformes / Cleverson Agner Ramos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
116 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Brânquias - anatomia. 2. Respiração aérea. 3. Morfologia (Biologia). I. Título.

CDD: 591.49 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Cleverson Agner Ramos

Dia 01/08/2012

Profª. Drª. Marisa Narciso Fernandes.....



Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini.....



Profª. Drª. Vera Lúcia de Campos Brites.....



Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.....



Profª. Drª. Odete Rocha.....



Dedico este trabalho,

À Daiane, minha amada esposa,

*meu presente de Deus sem a qual
nenhuma conquista valeria a pena.*

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à Prof^a Dra. Marisa Narciso Fernandes, um exemplo de profissional, pela orientação, apoio imprescindível, compreensão e amizade, principalmente diante de momentos difíceis durante a realização deste trabalho.

À Dr^a Elizabeth Gusmão Affonso do laboratório de fisiologia aplicada à piscicultura, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela confiança, pelo espaço cedido para a realização do experimento, pelo suporte fornecido para aquisição de exemplares de pirarucu e coleta de água nos rios amazônicos.

Aos colaboradores e funcionários do LAFAP e CPAq: Alcione, Dr. Alexandre, Dra. Ana Dias, Dona Ana, Seu Atílio, MSc. Cássia, Dr. Christian, Daniel, MSC. Elenice, Dr. Ezaú, Dr. Guto, MSc. Glauber, MSc. Iara, Dr. Manoel (*in memorian*), MSc. Marieta, Marquinhos, MSc. Renata, Rondon, Dona Suzana e todos que contribuíram para as análises e experimentos.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPG-CF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) os docentes e ao Alexandre sempre muito solícito. Agradeço especialmente à prof^a Heloísa pelo apoio, atenção, esclarecimentos e compreensão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, processo 143287/2008-7, pela bolsa concedida.

Ao apoio técnico de José Edivaldo Chaves e Orlando da Silva do laboratório temático de plantas e solos/INPA.

Ao Radson Rógerton dos Santos Alves / SEPROR, pelo auxílio na obtenção de exemplares de aruanã.

Ao Departamento de Geociências da Universidade Federal do Amazonas e Prof^a Dra. Carolina Michelin pelo auxílio nas análises em microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, em especial à Dra. Marise M. Sakuragui e ao MSc. Marcelo Gustavo Paulino pela amizade e pela ajuda mesmo à distância.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pela convivência e cordialidade.

Aos colegas e professores do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas em especial ao Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa e Prof. Dr. Wallice L. Paxiúba Duncan pela amizade e apoio.

Aos meus orientados, alunos da UFAM, Janilson, José e Lucas.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

A Deus, por todas as conquistas de minha vida.

*“Contos de Fada são a pura verdade.
Não porque nos contam que os dragões existem,
mas porque nos contam que eles podem ser vencidos.”*

Gilbert Keith Chesterton

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii

INTRODUÇÃO GERAL.....	01
AS HIPÓTESES DESTE ESTUDO.....	06
OBJETIVOS.....	07
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	08

Capítulo 1: Efeito das águas amazônicas nos fluxos iônicos de Arapaima gigas e Osteoglossum bicirrhossum, dois Osteoglossiformes Amazônicos

INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
Aquisição e aclimação dos animais.....	20
Delineamento experimental e exposição às águas amazônicas.....	20
Mensuração dos fluxos de íons.....	22
Análises estatísticas.....	23
RESULTADOS.....	25
Variáveis físico e químicas das amostras de água durante três horas de exposição dos peixes às águas amazônicas.....	25
Análises dos fluxos de íons.....	31

DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

Capítulo 2: Morfologia funcional das brânquias de Osteoglossiformes amazônicos em ambientes de água branca e preta

INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
Aquisição e aclimação dos animais.....	61
Delineamento experimental e exposição às águas amazônicas.....	61
Coleta de amostras e processamento para microscopia de luz e eletrônica de varredura.....	62
Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas.....	63
Análises imunohistoquímicas nas células ricas em mitocôndrias (CRMs).....	63
Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	64
Freqüência, área apical e área fracional das células-cloreto e células mucosas..._	65
Análises estatísticas.....	66
RESULTADOS.....	67
Morfologia geral das brânquias de <i>A. gigas</i> e <i>O. bicirrhosum</i>	67
Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas.....	67
Análises imunohistoquímicas nas células ricas em mitocôndrias.....	73
Morfologia da superfície do epitélio branquial.....	77
DISCUSSÃO.....	84
CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
ANEXOS.....	98
Licença Ambiental 17102-1.....	99
Licença Ambiental 17102-2.....	102
Licença Ambiental 17102-3.....	105

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 01 – A: câmaras de acondicionamento individual; B: Garrafas de 250 mL para coleta e acondicionamento das amostras.

Figura 02: Fluxos líquidos de Na^+ em *Arapaima gigas* [pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)] e em *Osteoglossum bicirrhossum*. Note que em *A. gigas* houve redução do efluxo de Na^+ em WW e aumento em BW, enquanto em *O. bicirrhossum* houve aumento do efluxo no grupo C seguido de influxo de Na^+ , após três horas, no grupo BW. * indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

Figura 03: Fluxos líquidos de K^+ em *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)] e *O. bicirrhossum*. Note redução do efluxo de K^+ nos exemplares menores de *A. gigas* no grupo C, influxo no grupo WW e aumento do efluxo em BW após 3 h; nos exemplares maiores note aumento de efluxo no grupo C, mudança de influxo (2 h) para efluxo (3 h) em WW e aumento de efluxo em BW. Em *O. bicirrhossum* note influxo (2 h) e efluxo (3 h) no grupo C e aumento de efluxo em BW e ausência de alterações significativas em WW. * indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

Figura 04: Fluxos líquidos de Ca^{++} em *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)] e *O. bicirrhossum*. Observa-se em exemplares menores de *A. gigas* redução do efluxo nos grupo C, WW e BW; exemplares maiores apresentaram redução de efluxo nos grupos C e WW. Em *O. bicirrhossum* houve diminuição de influxo no grupo C, redução do efluxo em WW e aumento de efluxo em BW. * indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

Figura 01: Morfologia branquial de *O. bicirrhosum* (A), *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) (B) e grandes (≈ 2000 g) (C). Note que os filamentos branquiais de *O. bicirrhosum* apresentam lamelas (L) bem evidentes, assim como exemplares pequenos de *A. gigas*. Nos exemplares grandes as lamelas estão inseridas no filamento branquial. Barra de escala: 40 μm

Figura 02: Celulas AB+ (pH 2,5) em azul e PAS+ em violeta (setas) As duas primeiras linhas correspondem à *A. gigas* ≈ 2000 g e ≈ 200 g, respectivamente e na última linha em *O. bicirrhosum*. Em A, C, E, G, I e K observa-se a região faríngea, que apresenta maior incidência de CMs AB+ e PAS+ e em B, D, F, H, J e L observam-se as lamelas (L), onde as CMs são raras. Barra de escala: 40 μm .

Figura 03: Células ricas em mitocôndrias (CRMs) imunomarcadas para a enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA), localizadas na borda aferente do filamento branquial de *A. gigas* grandes (≈ 2000 g) e pequenos (≈ 200 g) e de *O. bicirrhosum*. Observa-se CRMs claras (setas brancas) que apresentaram fraca reação de imunomarcção e CRMs escuras (setas pretas) que apresentaram forte reação de imunomarcção. Barra de escala: 40 μm

Figura 04: Células ricas em mitocôndrias (CRMs) imunomarcadas para a subunidade α -5 (*alfa five*) da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA). CRMs claras apresentam fraca imunoreatividade e células escuras têm forte reatividade marcação. * representa diferença significativa ($p \leq 0,5$) em relação ao grupo controle e a # representa diferenças significativas ($p \leq 0,5$) entre *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)

Figura 05: Morfologia do filamento branquial de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*. Em "A" filamentos branquiais um exemplar de *A. gigas* com aproximadamente 2000 g e em "B", de exemplar com aproximadamente 200 g. Em "C" filamentos branquiais de um exemplar de *O. bicirrhosum*. Note que no exemplar ≈ 200 g de *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* as lamelas (L) estão presentes, enquanto que em um exemplar ≈ 2000 g de *A. gigas* as lamelas são identificadas como dobras na superfície epitelial.

Figura 06: Detalhe da região aferente dos filamentos branquiais de *A. gigas* grandes (A), pequenos (B) e de *O. bicirrhosum*(C). Note indicado a presença de grande

quantidade de células mucosas (CMs) (setas brancas) e as células ricas em mitocôndrias (CRMs) (setas pretas) que em todas as espécies se apresentaram como criptas no epitélio branquial.

Figura 07: Epitélio branquial de exemplares de *A. gigas* ≈ 2000 g (A), ≈ 200 g (B) e de *O. bicirrhosum* (C). Note epitélio irregular e padrão de microssaliências aleatório em *A. gigas*. Em *O. bicirrhosum* o padrão de organização das microcriptas é concêntrico e a superfície apical das células é plano.

Figura 08: Área fracional das células ricas em mitocôndrias (AFCRMs) em *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* expostos à água branca (WW) e água preta (W). * indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) dos grupos WW e BW em relação ao grupo C e # indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) entre exemplares pequenos e grandes de *A. gigas*.

Figura 09: Densidade de células ricas em mitocôndrias em *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* expostos à água branca (WW) e água preta (W). * indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) dos grupos WW e BW em relação ao grupo C e # indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) ente exemplares pequenos e grandes de *A. gigas*.

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Parâmetros mensurados nos dois principais rios amazônicos de WW e BW.

Capítulo 1

TABELA I – Grupos controle e experimentais e respectivos números amostrais.
amostrais de cada grupo.

TABELA II – Valores médios (\pm SEM) dos parâmetros mensurados nos tanques de aclimação as águas amazônicas (Controle (C), água branca (WW) e água preta (BW) durante os sete dias de aclimação de *Arapaima gigas* e *Osteoglossum bicirrhossum* que antecederam aos experimentos de fluxo iônico.

TABELA III – Valores médios (\pm SEM) da massa corpórea de *Arapaima gigas* e *Osteoglossum bicirrhossum* e parâmetros físico e químicos mensurados durante o período de exposição às águas amazônicas: Controle (C), água branca (WW) e água preta (BW).

Capítulo 2

TABELA I – Incidência e Localização de Células Mucosas nas Brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*.

TABELA II – Densidade de células mucosas nas brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*, expostos à água branca e água preta.

RESUMO

Os rios da bacia amazônica apresentam diferentes características físico-químicas: de modo que rios de água preta podem atuar como uma barreira hidrográfica, contendo a dispersão das espécies. Nesta bacia, a ordem Osteoglossiforme, representada pelas espécies *Osteoglossum ferreirai*, *O. bicirrhosum* e *Arapaima gigas*, há modos de respiração distintos; *Osteoglossum* spp. é um respirador aquático obrigatório e *A. gigas* apresenta um remodelamento branquial ao longo de seu desenvolvimento, o que acarreta mudanças no compromisso osmorrespiratório com implicações para as funções branquiais, que se relacionam principalmente às trocas iônicas e a respiração. Na distribuição destas espécies *O. bicirrhosum* é uma espécie de água branca, enquanto que *A. gigas* pode ocupar rios de água preta e lagos de água branca. O presente estudo teve como objetivo avaliar alterações e características do compromisso osmorregulatório de duas espécies de Osteoglossiformes (*O. bicirrhosum* e *A. gigas*) expondo-as às diferentes águas amazônicas de forma a investigar o efeito da barreira hidrográfica por água preta. Exemplares de *A. gigas* foram divididos em dois grupos, considerando os estágios distintos de morfologia branquial; um grupo com peixes menores (≈ 200 g), nos quais a morfologia branquial é semelhante à de peixes respiradores aquáticos e outro grupo de peixes maiores (≈ 2000 g). Exemplares grandes de *A. gigas* ≈ 2000 g apresentam uma rápida recuperação das perdas iônicas em água preta de modo que infere-se que estes animais não devem sofrer influência da barreira hidrográfica de rios de água preta na dispersão da espécie. Comparativamente *A. gigas* e *O. bicirrhosum* apresentam uma capacidade íon-regulatória bem eficiente em ambientes de água branca, principalmente pela retomada de íons (influxo de íons). Dados imunohistoquímicos para marcação da enzima Na^+/K^+ -ATPase e os dados morfométricos de área fracional de células ricas em mitocôndrias e densidade de células ricas em mitocôndrias indicam que exemplares grandes de *A. gigas* o compromisso osmorrespiratório é deslocado para processos de regulação de íons. O número de células ricas em mitocôndrias foi menor provavelmente devido ao aumento da barreira de difusão de gases. Quanto ao padrão de regulação iônica e morfologia funcional há similaridades entre *O. bicirrhosum* e *A. gigas* menores, ≈ 200 g, entretanto *O. bicirrhosum* não apresenta o mesmo potencial de recuperação das perdas de íons que *A. gigas*.

ABSTRACT

In the Amazon basin, the Osteoglossiforme order is represented by the species *Osteoglossum ferreirai*, *O. bicirrhosum* and *Arapaima gigas*. Although belonging to the same order, these species show different modes of breathing; while *Osteoglossum* ssp. is an obligatory water breather, *A. gigas* shows a gill remodeling during its development, which causes changes in the osmorepiratory compromise with implications for the gill functions which turns more related to the ion exchanges. The rivers of the Amazon basin have different physicochemical features. While the white water rivers (WW) are slightly alkaline and its waters are considered "soft", black water rivers (BW) are practically "distilled" having an acidic pH. Such different characteristics between these waters leads to hypothesize that black water rivers can act as an hydrographic barrier, containing the spread of some species. This can be observed in the distribution of some amazonian fish since there are several species unique from black waters while other species are distributed in white and black waters as others only in white waters. In Osteoglossiformes, data from literature suggest *O. bicirrhosum* as a fish from white water, while *A. gigas* can be found in black water rivers as white water lakes. This study tested the hydrographic barrier hypothesis exposing the animals in the Amazonian waters and observing responses of ionic fluxes, proliferation of mitochondria rich cells (MRCs), responsible for regulating ion, the presence of mucous cells (MCs) and changes in morphology functional gills. In *A. gigas* ≈ 2000 g there is a fast recovery from ion losses so probably there is no influence of the hydrographic barrier for this specie. Comparing *A. gigas* and *O. bicirrhosum*, these fishes are able to ion regulation in white water environments, mostly by the ion uptake showed in 3 hours. Data from immunohistochemistry for NKA enzyme of MRCs and morphometric data (CRMsFA and density) of these cell indicates that *A. gigas* 2000g have the gill functions related to ion regulation. About the ion regulation pattern and functional morphology there are similarities between *O. bicirrhosum* and 200g *A. gigas* however *O. bicirrhosum* did not showed the same potential to recovery ion losses as *A. gigas*.

INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia contém aproximadamente 60% das florestas tropicais remanescentes (WHITMORE, 1997) sendo fonte de uma enorme biodiversidade e sua ictiofauna é representada por praticamente todos os grupos de peixes de água doce. Estas espécies estão aptas a viver desde lagos quase em total hipóxia até águas acidificadas (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995). Estas diferenças nos ambientes aquáticos amazônicos se deve a características únicas de seus rios e afluentes tais como concentrações de íons, pH, condutividade e níveis de matéria orgânica dissolvida, conforme pode ser observado na Tabela I. Estas diferenças encontradas nos rios da Bacia Amazônica permite uma classificação das águas amazônicas em três principais categorias: rios de água branca (WW), rios de água preta (BW) e rios de água clara (CW) (WALLACE, 1853; JUNK, 1983; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995).

Na bacia Amazônica, o rio Solimões é um representante típico de rio de WW e têm seu início na região dos Andes e seu aspecto, como descrito na expedição α -helix, é de uma aparência “*cafe-au-lait*” (HOCHACHKA & RANDALL, 1978). Esta característica é devido a uma grande quantidade de sedimentos trazidos de seus afluentes. As águas destes rios são consideradas “moles”, têm baixos níveis de minerais e metais alcalinos dissolvidos que resulta em águas com pH neutro ou levemente acidificado (pH 6,3 – 7,0; Tabela I). Os rios de BW têm suas nascentes em relevos suaves, como os das Guianas ou em sedimentos terciários da bacia Amazônica; e em consequência de processos erosivos, o transporte de sedimentos para o leito do rio é baixo, resultando em rios com águas pobres em íons, grande quantidade de matéria orgânica dissolvida e pH ácido (RICHEY *et al.*, 1990; MORTATTI & PROBST, 2003). O pH destes rios é influenciado por ácidos húmicos e fúlvicos produtos da decomposição de matéria orgânica. O rio Negro é um típico

representante de rios de BW, seu pH em alguns trechos é de aproximadamente 5,0 – 6,0 devido à matéria orgânica dissolvida, entretanto em pequenos córregos e áreas alagadas o pH destas águas pode atingir aproximadamente 3,0 – 4,0 (MATSUO & VAL, 2007).

**TABELA I – Parâmetros mensurados
nos dois principais rios amazônicos de WW e BW**

Parâmetro físico e químico	Rio Solimões	Rio Negro
Na (mg.L ⁻¹)	2.3 ± 0.8	0.380 ± 0.124
K (mg.L ⁻¹)	0.9 ± 0.2	0.327 ± 0.107
Mg (mg.L ⁻¹)	1.1 ± 0.2	0.114 ± 0.035
Ca (mg.L ⁻¹)	7.2 ± 1.6	0.212 ± 0.066
Cl (mg.L ⁻¹)	3.1 ± 2.1	1.7 ± 0.7
Si (mg.L ⁻¹)	4.0 ± 0.9	2.0 ± 0.5
Sr (mg.L ⁻¹)	37.8 ± 8.8	3.6 ± 1.0
Ba (mg.L ⁻¹)	22.7 ± 5.9	8.1 ± 2.7
Al (mg.L ⁻¹)	44 ± 37	112 ± 29
Fe (mg.L ⁻¹)	109 ± 76	178 ± 58
Mn (mg.L ⁻¹)	5.9 ± 5.1	9.0 ± 2.4
Cu (mg.L ⁻¹)	2.4 ± 0.6	1.8 ± 0.5
Zn (mg.L ⁻¹)	3.2 ± 1.5	4.1 ± 1.8
Conductância	57 ± 8	9 ± 2
pH	6.9 ± 0.4	5.1 ± 0.6
P Total (µg.L ⁻¹)	105 ± 58	25 ± 17
C total (mg.L ⁻¹)	13.5 ± 3.1	10.5 ± 1.3
HCO ₃ ⁻ C (mg.L ⁻¹)	6.7 ± 0.8	1.7 ± 0.5

FURCH (1984) *apud* VAL & ALMEIDA-VAL (1995).

A ordem Osteoglossiforme é representada na bacia Amazônica por duas espécies do gênero *Osteoglossum*, *O. ferreirai* e *O. bichirrhossum*, e uma do gênero *Arapaima*, *A. gigas*. Este último tem ampla distribuição na bacia Amazônica, sendo que estudos recentes utilizando marcadores genéticos (HRBEK *et al.*, 2005) revelaram que *A. gigas* forma uma grande população panmítica na bacia do Amazonas, sendo encontrando mais freqüentemente em rios de água branca da

bacia Amazônica e da Guiana. Esta espécie até o oitavo ou nono dia após a eclosão dos ovos apresenta modo de respiração exclusivamente branquial, em animais jovens (até 200-500 g), a estrutura branquial é semelhante aquela dos peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática e há, até certo tamanho, uma dependência das brânquias para a respiração e outras funções como regulação de íons, equilíbrio ácido-base, etc. (GRAHAM, 1997; RAMOS, 2008). Em animais adultos embora possa ocorrer absorção de O₂ através do epitélio branquial (BRAUNER *et al.*, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2010), este não é suficiente para suprir a demanda de O₂ e a maior parte do O₂ é absorvido através da bexiga natatória modificada. A bexiga natatória é muito semelhante ao pulmão dos peixes pulmonados, mas constitui um único órgão enquanto que os pulmões são, geralmente, órgãos pares (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995).

As espécies *Osteoglossum*, também conhecidos como aruanã e macaco d'água, tem corpo comprido e alongado e podem alcançar 1m de comprimento total (KANAZAWA, 1966; SANTOS, 2004), são espécies bentopelágicas que habitam lagos e igarapés. Curiosamente as duas espécies descritas, *O. bicirrhosum* e *O. ferreirai* são popularmente conhecidos como aruanã-pardo e aruanã-preto e dados da literatura sugerem que estes animais apresentam uma distribuição restrita a algum tipo de água amazônica: *O. bicirrhosum* é encontrado em rios de água branca enquanto que *O. ferreirai* é restrito à rios de água preta (GOULDING & CARVALHO, 1988; FERREIRA, 1993; MÉRONA *et al.*, 2001; RABELLO-NETO, 2002; SIQUEIRA-SOUZA & FREITAS, 2004; YAMAMOTO, 2004; CLARO-JR., 2003) sendo que, nos períodos de cheia, estas espécies são frequentemente encontradas nas florestas alagadas (SAINT-PAUL *et al.*, 2000). Estas espécies também podem sobreviver em condições hipóxicas apresentando o comportamento de respiração na superfície

aquática; para isto os animais projetam seus barbilhões que auxiliam na aeração das brânquias (BRAUM & BOCK, 1985).

Estas espécies são de grande importância econômica, pois em 2003, *Osteoglossum* spp. tiveram um percentual de 3,75% e *A. gigas* 0,11% do total da produção pesqueira desembarcada nos portos dos principais municípios do Estado do Amazonas (THOMÉ-SOUZA *et al.*, 2007). Existe grande interesse de *A. gigas* em sistemas de pisciculturas, pois apresenta grande produtividade (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; GOMES *et al.*, 2006), podendo atingir 4kg em apenas 1 ano (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995). As espécies de *Osteoglossum* têm grande importância como fonte de proteína para as populações ribeirinhas (QUEIROZ & CRAMPTON, 1999), e têm grande potencial para exploração local, pois os seus alevinos são comercializados no mundo todo como peixes ornamentais (BROWN, 1995; CRAMPTON, 1999).

Apesar do apelo econômico destas espécies e de sua importância, dados sobre os mecanismos fisiológicos de adaptação destas espécies nas águas amazônicas são escassos. O estudo dos mecanismos de regulação destas espécies nas águas amazônicas além de fornecer subsídios para uma melhor compreensão da história biogeográfica da espécie poderá auxiliar em estratégias de manejo e conservação das espécies. O estudo dos mecanismos de regulação iônica em espécies amazônicas estão restritas a apenas algumas espécies como *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum scalare* (GONZALEZ & WILSON, 2001), *Metynnis hypsauchen* (BALDISSEROTTO & VAL, 2002), *Potamotrygon* sp. (WOOD *et al.*, 2002), *Paracheirodon axelrodi* (MATSUO & VAL, 2007), *Hoplosternum littorale* e *A. gigas* (BALDISSEROTTO *et al.*, 2008).

Tendo em vista as diferenças nas características físicas e químicas das águas dos rios da Amazônia e a hipótese que essas características podem atuar como uma barreira hidrográfica que restringe a dispersão de algumas espécies de peixes (LOVEJOY & DE ARAUJO, 2000; HUBERT & RENNO, 2006; WILLIS *et al.*, 2007) é interessante enfatizar que a espécie *O. ferreirai* tem distribuição exclusivamente em BW enquanto as espécies mais próximas como o *O. bicirrhosum* e *A. gigas* não são exclusivos destas águas, ou seja, apresentam distribuição tanto em BW quanto em WW. Sendo assim o presente estudo buscou investigar as respostas destas espécies quando expostas às diferentes águas amazônicas, do modo a compreender melhor os ajustes fisiológicos desses animais e qual é a possível influência para a dispersão destas espécies. Este estudo está organizado em dois capítulos. No primeiro capítulo investigou-se as respostas, em termos de fluxos iônicos, das duas espécies estudadas durante a exposição às águas amazônicas. No segundo capítulo são descritas e discutidas características inerentes à morfologia funcional das brânquias e qual o seu papel no ajuste às águas amazônicas.

AS HIPÓTESES DESTE ESTUDO

Quanto às comparações entre as espécies de peixes e os tipos de águas amazônicas

H1 - *A. gigas* e *O. bicirrhosum* apresentam respostas morfofuncionais das brânquias diferenciadas sob influência das diferentes águas amazônicas.

H0 - *A. gigas* e *O. bicirrhosum* não apresentam respostas fisiomorfológicas diferenciadas sob influência de águas amazônicas.

Quanto às comparações entre duas etapas distintas de desenvolvimento em *A. gigas*

H1 – O remodelamento branquial em *A. gigas* à medida que o animal cresce tem influência na distribuição da espécie nos diferentes tipos de água amazônica.

H0 – O remodelamento branquial em *A. gigas* à medida que o animal cresce tem influência na sua distribuição nos diferentes tipos de água amazônica.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar os ajustes para a manutenção do compromisso osmorespiratório nos Osteoglossiformes, *O. bicirrhosum* e *A. gigas*, em água branca e água preta, verificando suas similaridades e divergências quanto à plasticidade branquial nestes ambientes e a potencialidade do efeito da barreira hidrográfica formada por rios de água preta.

Objetivos Específicos

Capítulo 1:

Investigar os fluxos de íons em *A. gigas* e *O. bichirrhosum* em água branca e água preta de modo a inferir se o tipo de água pode atuar como uma barreira hidrográfica limitando a distribuição dessas espécies na Amazônia.

Capítulo 2:

Investigar a morfologia funcional das brânquias de *A. gigas* em duas etapas distintas de desenvolvimento e de *O. bicirrhosum*, após exposição à água branca e água preta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 405-412, 2008.
- BALDISSEROTTO, B.; VAL, A. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4B, p. 749-752, 2002.
- BRAUM, E.; BOCK, R. Funktions-morphologische Untersuchungen über die Barteln von *Osteoglossum bicirrhosum* (Pisces, Osteoglossidae) wahren der notatmung. **Amazoniana**, v. 9, p. 353-370, 1985.
- BRAUNER, C. J.; MATEY, V.; WILSON, J. M.; BERNIER, N. J.; VAL, A. L. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1433-1438, 2004.
- BROWN, C. L. **Raising the Silver Arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*):** Center for Tropical and Subtropical Aquaculture. 117pp, 1995.

CLARO-JR., L. H. **A influência da floresta alagada na estrutura trófica de comunidades de peixes em lagos de várzea da Amazônia Central.**

Dissertação de Mestrado: Instituto Nacional de Pesquisas/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 61pp., 2003

CRAMPTON, W. G. R. Os peixes da reserva Mamirauá: diversidade e história natural na planície alagável da Amazônia. In: QUEIROZ, H. L. e CRAMPTON, W. G. R. (Ed.). **Estratégias de Manejo de recursos Pesqueiros os em Mamirauá.** . Brasília,DF: SCM, MCT-CNPq, p.197. 1999.

FERREIRA, E. J. G. Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da futura UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 23, n. 1/4, p. 89, 1993.

FURCH, K. Water chemistry of the Amazon basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: H., S. (Ed.). **The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin.** Junk, Dordrecht: Dordrecht, Junk, p.167-199. 1984.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, n. 1, p. 521-528, 2006.

GONZALEZ, R. J.; BRAUNER, C. J.; WANG, Y. X.; RICHARDS, J. G.; PATRICK, M. L.; XI, W.; MATEY, V.; VAL, A. L. Impact of ontogenetic changes in branchial morphology on gill function in *Arapaima gigas*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 2, p. 322-332, 2010.

GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic rio Negro. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 6, p. 1680-1690, 2001.

GOULDING, M.; CARVALHO, L. Rio Negro, rich life in poor water. Amazonian diversity and food chain ecology as seen through fish communities. **SPB Academic Publishing, The Netherlands.**, p. 200, 1988.

GRAHAM, J. B. **Air-breathing fishes: Evolution, Diversity, and Adaptation**. 1st. San Diego: Academic Press, 299pp., 1997.

HOCHACHKA, P.; RANDALL, D. Alpha Helix Amazon Expedition, September-October 1976. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 4, p. 713-716, 1978.

HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R.; MEYER, A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conservation**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 2005.

HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, 2006.

JUNK, W. J. As águas da região amazônica. In: SALATI, E. (Ed.). **Amazônia desenvolvimento, integração e ecologia**. São Paulo: Brasiliense/CNPq, p.327. 1983.

KANAZAWA, R. H. The fishes of the genus *Osteoglossum* with a description of a new species from the rio Negro. **Ichthyologica**, v. 37, n. 4, p. 161-172, 1966.

LOVEJOY, N.; DE ARAUJO, M. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

MATSUO, A. Y. O.; VAL, A. L. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 4, p. 989-1000, 2007.

MÉRONA, B.; MENDES DOS SANTOS, G.; GONÇALVES DE ALMEIDA, R. Short term effects of Tucuruí Dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. **Environmental Biology of Fishes**, v. 60, n. 4, p. 375-392, 2001.

MORTATTI, J.; PROBST, J. L. Silicate rock weathering and atmospheric/soil CO₂ uptake in the Amazon basin estimated from river water geochemistry: seasonal and spatial variations. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1-4, p. 177-196, 2003.

QUEIROZ, H. L.; CRAMPTON, W. G. R. A pesca, as pescarias e os pescadores do Mamirauá: o manejo integrado dos recursos pesqueiros. In: QUEIROZ, H. L. e CRAMPTON, W. G. R. (Ed.). **Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá**. Brasília, DF: SCM, MCT/CNPq, 1999.

RABELLO-NETO, J. G. **Variabilidade morfológica do aruanã preto, *Osteoglossum ferreirai* (Kanazawa, 1966) em seis áreas de pesca do médio rio Negro, município de Barcelos, AM, Brasil: implantação para a identificação de estoques**. Dissertação de Mestrado: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, 44pp., 2002.

RAMOS, C. A. **Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas* durante a transição da respiração aquática para respiração aérea**. Dissertação de Mestrado: Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 79pp., 2008.

RICHEY, J. E.; HEDGES, J. I.; DEVOL, A. H.; QUAY, P. D.; VICTORIA, R.; MARTINELLI, L.; FORSBERG, B. R. Biogeochemistry of carbon in the

Amazon River. **Limnology and Oceanography**, v. 35, n. 2, p. 352-371, 1990.

SAINT-PAUL, U.; ZUANON, J.; CORREA, M. A. V.; GARCÍA, M.; FABRÉ, N. N.; BERGER, U.; JUNK, W. J. Fish communities in central Amazonian white- and blackwater floodplains. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, n. 3, p. 235-250, 2000.

SANTOS, G. M. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí**. Eletronorte, 2004.

SIQUEIRA-SOUZA, F.; FREITAS, C. Fish diversity of floodplain lakes on the lower stretch of the Solimões river. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3A, p. 501-510, 2004.

THOMÉ-SOUZA, M.; RASEIRA, M.; RUFFINO, M.; SILVA, C.; BATISTA, V.; BARTHEM, R.; AMARAL, E. **Estatística pesqueira do Amazonas e Pará-2004**. 76pp., 2007.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspect**. 1st. New York: Springer-Verlag 235pp., 1995.

WALLACE, A. R. **A narrative of travels on the Amazon and rio Negro**. 1st. New York: Dover, 368pp., 1853.

WHITMORE, T. C. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. In: LAURANCE, W. F. e O. BIERREGAARD, R. O. (Ed.). **Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities**: University of Chicago Press, p.3-12. 1997.

WILLIS, S. C.; NUNES, M. S.; MONTAÑA, C. G.; FARIAS, I. P.; LOVEJOY, N. R. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 291-307, 2007.

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

YAMAMOTO, K. C. **A estrutura de comunidades de peixes em lagos manejados da Amazônia Central**. Dissertação de Mestrado:. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 71pp., 2004.

CAPÍTULO 1

Efeito das águas amazônicas nos fluxos iônicos de *Arapaima gigas* e *Osteoglossum bicirrhossum*, dois Osteoglossiformes Amazônicos

Palavras-chave: Compromisso osmorrespiratório, aruanã, pirarucu, água-branca e água-preta.

INTRODUÇÃO

A bacia Amazônica é um vasto sistema hidrográfico que apresenta uma grande variabilidade de características físico e químicas em suas águas. Já no século XIX WALLACE (1853) descreveu e classificou as águas do Amazonas e seus tributários como branca, preta e clara (WW, BW e CW, respectivamente), uma classificação baseada apenas na coloração destas águas. Assim como há essa heterogeneidade na coloração das águas, suas características físico e químicas também são diferentes. Os rios de WW têm uma coloração “café-au-lait” concentrações de íons e solutos elevados, pH neutro à ligeiramente alcalino (FURCH, 1984; SIOLI, 1984) assim como solutos dissolvidos são carregados das regiões dos Andes, de onde também se originam seus mananciais (KONHAUSER *et al.*, 1994; AUCOUR *et al.*, 2003). Os rios de BW apresentam uma coloração escurecida devido à uma grande presença de carbono orgânico dissolvido na forma de ácidos fúlvicos e húmicos (MATSUO & VAL, 2007) e conseqüentemente o pH destas águas é acidificado (RICHEY *et al.*, 1990; MORTATTI & PROBST, 2003). Os rios de CW têm águas transparentes e apresentam baixas quantidades de íons e sedimentos dissolvidos e pH variando de ácido à alcalino (SIOLI, 1984; KONHAUSER *et al.*, 1994). DUNCAN & FERNANDES (2010), analisando as águas do rio Amazonas, Negro e seus tributários observaram uma variabilidade longitudinal dos valores de pH, condutividade e TDS da água, que foi atribuída às descargas dos seus tributários, os quais se originam em diferentes províncias geológicas.

Como as águas da bacia Amazônica apresentam diferenças tão marcantes, embora estando interconectadas pela calha principal do rio Amazonas e seus tributários, pode ser hipotetizado que as condições de alguns rios com BW podem

formar uma barreira hidrográfica que restringe a dispersão das espécies, o que perfiteu ao longo da história filogenética de algumas espécies, a especiação alopátrica (LOVEJOY & DE ARAUJO, 2000; HUBERT & RENNO, 2006; WILLIS *et al.*, 2007). DUNCAN & FERNANDES (2010) estudaram o efeito dessa barreira hidrográfica em arraias Potamotrigonidae e segundo os autores a tolerância à ambientes ácidos e diluídos de BW se dá pela morfologia branquial (DUNCAN *et al.*, 2010) e características fisiológicas (WOOD *et al.*, 2002) destes animais. Outros estudos têm sido realizados em busca de uma melhor compreensão da relação entre a distribuição dos peixes e as características físicas e químicas da água dos rios da bacia Amazônica. GONZALEZ & WILSON (2001) compararam o padrão de regulação iônica de *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum scalare* expostos à BW do rio Negro; WOOD *et al.* (2002) analisaram os mecanismos de transportes iônicos do elasmobrânquio estenohialino *Potamotrygon* sp., endêmico do rio Negro; MATSUO & VAL (2007) investigaram o possível papel de ácidos húmicos nos fluxos de Ca^{2+} em *P. axelrodi* exposto ao pH baixo; DUNCAN *et al.* (2011) estimaram dados morfométricos, de imunolocalização e de atividade das células ricas em mitocôndrias (CRMs) em arraias Potamotrigonidae.

Alguns estudos têm analisado os fluxos iônicos destes peixes e esta ferramenta permite inferir os padrões de regulação iônica dos peixes, especialmente aqueles expostos à águas acidificadas, hipóxicas e pobres em íons. GONZALEZ *et al.* (1997) investigaram a regulação iônica em BW por *Gymnocorymbus ternetzi*; GONZALEZ *et al.* (1998) investigaram o padrão de regulação iônica em algumas espécies do rio Negro; BALDISSEROTTO & VAL (2002) observaram o efeito da temperatura nos fluxos iônicos de *Metynnisshy psauchan*, um peixe nativo do rio Negro; GONZALEZ *et al.* (2002); BALDISSEROTTO *et al.* (2008) compararam os fluxos de íons de

Hoplosternum littorale e *A. gigas* expostos à diferentes tipos de águas amazônicas; BRINN *et al.* (2012) investigaram os fluxos iônicos relacionando-o às respostas de stress na arraia *Potamotrygon cf. hystrix* durante o transporte no rio Negro.

Para as espécies Osteoglossiformes há poucos estudos, principalmente inferindo dados sobre o compromisso osmorrespiratório (BRAUNER *et al.*, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2010). Na bacia Amazônica estas espécies são representadas pelo aruanã, *Osteoglossum bicirrhosum* e *O. ferreirai* e pelo pirarucu, *A. gigas*. Quanto à sua distribuição nas águas amazônicas, *O. bicirrhosum* é endêmico de WW (LOWE-MCCONNELL, 1964) enquanto *O. ferreirai* é endêmico de BW (KANAZAWA, 1966; GOULDING & CARVALHO, 1988) e a espécie *A. gigas* têm distribuição em ambos os rios sendo que estudos utilizando marcadores moleculares sugerem uma única população panmítica (HRBEK *et al.*, 2005).

Apesar de pertencerem a uma mesma ordem, estes gêneros Osteoglossiformes apresentam distintos modos de respiração. Enquanto *A. gigas* (Arapaimidae) é um respirador aéreo obrigatório, que utiliza a bexiga natatória como órgão de respiração aérea. Nessa espécie, a estrutura branquial apresenta características típicas de um peixe com respiração aquática até aproximadamente 400-500g e, em animais maiores que 500g, ocorre atrofia do sistema de células pilares e intensa proliferação de células epiteliais e de CRMs, que aumenta a distância água-sangue e possivelmente reduz a capacidade de difusão dos gases respiratórios das brânquias (RAMOS, 2008). Os *Osteoglossum* (Osteoglossidae) são respiradores aquáticos obrigatórios, que utilizam o epitélio branquial para as trocas gasosas, embora possam sobreviver em condições hipóxicas apresentando o comportamento

de respiração na superfície aquática; para isto os animais projetam seus barbilhões que auxiliam na aeração das brânquias (BRAUM & BOCK, 1985).

Sendo assim, como as espécies Osteoglossiformes apresentam padrões de distribuição nos rios da bacia Amazônica distintos e como há diferenças no desenvolvimento de suas estruturas para a manutenção do compromisso osmorrespiratório, o objeto do presente estudo é investigar os fluxos de íons em *A. gigas* e *O. bichirrhossum* em água branca e água preta testando a hipótese da barreira hidrográfica inferindo as respostas fisiológicas que estes animais apresentam quando expostos às águas amazônicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aquisição e aclimação dos animais

O estudo foi realizado mediante autorização ambiental para coleta e transporte dos animais pelo IBAMA (licença nº17102-3, Anexo). Exemplares de *A. gigas*, foram adquiridos em pisciculturas da região próxima à Manaus e os exemplares de *O. bicirrhossum* foram coletados na natureza, na região de Barcelos, AM. Todos os animais foram transportados em sacos plásticos para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) e mantidos em viveiros escavados e abertos, alimentados com água de poço (características físico e químicas expressas na tabela II). Os animais foram alimentados “ad libitum” com ração própria para piscicultura dessa espécie e produzida pela CPAq (45% de proteína) e foram mantidos nos tanques durante trinta dias para aclimação e controle de doenças e parasitas através de observações da sanidade dos animais.

Delineamento experimental e exposição às águas amazônicas

Após a aclimação aos viveiros do INPA, os animais foram separados em três tanques com capacidade de 500 L para aclimação às águas amazônicas, um tanque contendo água branca (grupo WW) coletada do rio Solimões, um tanque contendo água preta (grupo BW) coletada do rio Negro e um tanque contendo água de poço, a mesma que abastecia os viveiros (grupo C), utilizada como controle. Para testar a

influência do pH a água preta foi acidificada para pH 3,5, utilizando solução de ácido clorídrico. Os animais foram mantidos nestes tanques por um período de sete dias com renovação de água a cada 48h no final da tarde, sendo alimentados pelo menos quatro horas antes da renovação de água. O monitoramento da qualidade da água foi efetuado diariamente analisando os seguintes parâmetros: amônia (mg L^{-1}) e nitrito (mg L^{-1}) que foram determinados de acordo com VERDOUW *et al.* (1978) e BOYD (1979), respectivamente; dureza (mg L^{-1} de CaCO_3) e alcalinidade (mg L^{-1} de CaCO_3) de acordo com ADAD (1982) e (GOLTERMAN *et al.*, 1978), respectivamente; pH e condutividade (μS) foram determinados utilizando um pHmetro (YSI, modelo 60/10), o oxigênio dissolvido (DO, mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram mensurados usando um oxímetro (YSI, modelo 85/10) e, o dióxido de carbono dissolvido (DCO, mg L^{-1}) foi estimado pelo método de BOYD & TUCKER (1992).

Considerando o remodelamento branquial de *A. gigas* e a morfologia em fases distintas de seu desenvolvimento, os animais foram separados em dois grupos, um com peixes pequenos (≈ 200 g) e outro com peixes grandes (≈ 2000 g). Desta forma o experimento contou com três grupos, *O. bicirrhosum*, *A. gigas* pequenos e grandes, cada um dividido em três grupos experimentais: C, WW e BW. A tabela I resume os grupos utilizados e sua distribuição no delineamento experimental.

TABELA I – Grupos controle e experimentais e respectivos números amostrais de cada grupo

	Controle	Água Branca	Água Preta
<i>O. bicirrhossum</i>	10	10	10
<i>A. gigas</i> <≈200 g	10	10	10
<i>A. gigas</i> >≈2000 g	10	10	10

Mensuração dos fluxos de íons

Após sete dias de aclimação em cada tipo de água (C, WW and BW), cada peixe teve sua massa corpórea (M) mensurada. Exemplares de *A. gigas* foram alojados em câmaras individuais com aproximadamente 20 L (Fig. 01-A) contendo o mesmo tipo de água na qual estava previamente mantido (tanques de 500 L). Exemplares de *O. bicirrhossum* devido sua baixa massa corpórea (≈5g), foram acondicionados em uma única câmara de 2 L tendo um agrupamento de todos os animais em uma única câmara para as mensurações de fluxo de íons.

Os animais foram mantidos nestas câmaras para exposição e mensuração dos fluxos de íons (influxo ou efluxo) durante três horas. Amostras de água (250 mL, Fig. 01-B) foram coletadas no início (tempo 0), depois de 2 e 3 horas. Em cada amostra de água foram determinados os níveis dissolvidos (mg L^{-1}) de Na^+ , K^+ , Ca^{++} , pH, DO, DCO, amônia, nitrito, dureza e alcalinidade. As concentrações dos íons (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) foram mensuradas utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica (Micronal® GBC906) no laboratório temático de solos do INPA e, posteriormente, os fluxos de

íons foram calculados de acordo com a metodologia de (GONZALEZ *et al.*, 1998) descrita pela seguinte equação:

$$J_{net} = V([ion]_1 - [ion]_2) \cdot (Mt)^{-1},$$

onde $[ion]_1$ e $[ion]_2$ representam as concentrações de íons ao início e depois de duas horas de experimento ou em relação ao início e depois de três horas de experimento, V é o volume da câmara (L), M é a massa corpórea do peixe (kg) e t é o período de duração no experimento de fluxo (h).

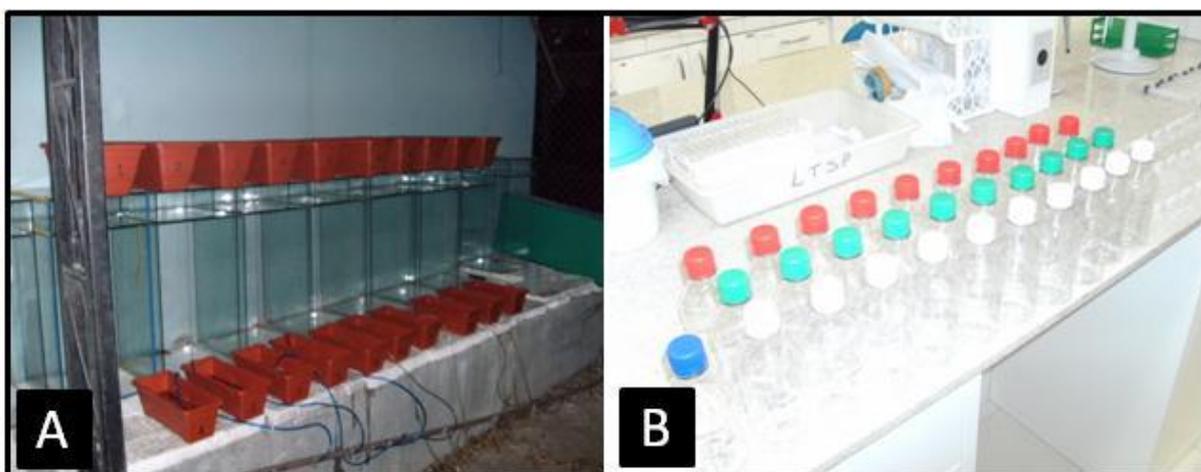


Figura 01 – A: câmaras de acondicionamento individual; B: Garrafas de 250 mL para coleta e acondicionamento das amostras.

As demais análises (pH, DO, DCO, amônia, nitrito, dureza e alcalinidade) foram efetuadas conforme descrito em “*Delineamento Experimental*”.

Análises estatísticas

Para testar o efeito das diferenças na estrutura branquial de *A. gigas* nos fluxos de íons foram comparados os resultados em peixes pequenos e grandes utilizando o

teste t de Student's para dados com distribuição normal, ou o teste de Mann-Whitney para dados com distribuição não-normal.

Para a determinação da significância das diferenças entre os grupos C, WW e BW foi aplicado o teste one-way ANOVA para dados com distribuição normal ou ANOVA "on ranks" para dados com distribuição não-normal. O teste pos hoc de Dunn foi utilizado para determinar onde ocorreram as diferenças com nível de significância de 95% de confiança ($p \leq 0.05$). Os testes foram efetuados utilizando o software Sigmaplot 11 e os dados estão apresentados como média \pm SEM.

RESULTADOS

A Tabela II mostra os dados obtidos do monitoramento diário das variáveis físicas e químicas na água dos tanques de experimentação (C, WW e BW). Não houveram variações significativas nos sete dias de aclimatação a cada um dos tipos de águas amazônicas que antecederam às mensurações dos fluxos de íons.

Variáveis físico e químicas das amostras de água durante três horas de exposição dos peixes às águas amazônicas

Durante o período experimental total (3 h) ocorreu um aumento na massa corpórea de *A. gigas* ≈ 200 g ($p < 0,05$) e uma diminuição da mesma em animais de ≈ 2000 g ($p < 0,05$) em todos os tipos de água, C, BW e WW. Em *O. bicirrhossum* houve aumento na massa corpórea nos animais do grupo BW.

Durante os experimentos de exposição de *A. gigas* (≈ 200 g e 2000 g) e *O. bicirrhossum* às águas C, WW e BW ocorreram alterações significativas nas variáveis físico e químicas da água (dureza, pH, condutividade, DCO, etc.) e os dados estão apresentados na tabela III.

Durante os experimentos de exposição de *A. gigas* ≈ 200 g, a dureza da água aumentou significativamente durante as 3 h de experimentos em C e BW e diminuiu em WW. Nesses experimentos houve diferença significativa entre *A. gigas* ≈ 200 g e ≈ 2000 g sendo que a dureza da água foi mais alta em *A. gigas* ≈ 200 g no grupo C em todo o tempo de exposição e nos grupos WW e BW foi significativamente elevada em *A. gigas* ≈ 2000 g ao término do experimento (3 h). A dureza na água aumentou

significativamente depois de 3 h de exposição em *O. bicirrhossum* no grupo C enquanto no grupo WW aumentou em 2 h e diminuiu na hora seguinte. No grupo BW diminuiu em 2 h e aumentou na hora seguinte.

Quanto aos valores de pH da água não foram observadas diferenças entre *A. gigas* 200 g e 2000 g nos grupos C e WW, mas o pH aumentou significativamente ao longo da exposição em C e BW para *A. gigas* 200 g, 2000 g e também *O. bicirrhossum*, entretanto no grupo WW apenas *A. gigas* 200 g foi observado o mesmo padrão de resposta.

Os valores de condutividade da água diminuíram durante exposição de *A. gigas* a C. Em *A. gigas* 200 g expostos à WW depois de 2 h apresentou um aumento da condutividade na água e no grupo BW houve um aumento em 2 h seguido de redução na hora seguinte. Nas comparações entre *A. gigas* 200 g e 2000 g observou-se que animais ≈2000 g frequentemente apresentaram valores elevados. Em *O. bicirrhossum* foi observado que a condutividade da água diminuiu durante as três horas em que foram expostos a C, WW e BW.

O DCO foi significativamente mais elevado em *A. gigas* 2000 g em todos os grupos, comparativamente à 200 g. No grupo C *A. gigas* 200 g aumentou em 2 h e diminuiu na hora seguinte e animais 2000 g diminuiu em 2 h e manteve na hora seguinte, no grupo WW *A. gigas* 200 g e 2000 g houve aumento do DCO nas 3 h de exposição. No grupo BW em ambas MC houve uma diminuição em 2 h seguida de aumento na hora final. Em *O. bicirrhossum* não foram observadas alterações significativas no DCO no grupo C enquanto que no grupo WW houve um aumento após 2 h que se manteve na hora final. No grupo BW houve um aumento após 2 h com uma redução na hora final de exposição.

A alcalinidade na água foi significativamente mais elevada em *A. gigas* 200 g dos grupos C e WW e em BW não houve diferenças significativas entre as duas faixas de MC. Ao longo do período de exposição, no grupo C a alcalinidade da água aumentou significativamente ao longo de 3 h. No grupo WW houve uma redução em 2 h. seguido de um aumento na hora seguinte e no grupo BW não foram observadas alterações significativas ao longo da exposição à BW.

A temperatura, DO, amônia e nitrito na água não apresentaram diferenças significativas durante os experimentos entre *A. gigas* 200 g e 2000 g. Dos níveis de amônia observados, foi registrada diferença significativa entre *A. gigas* 200 g e 2000g, entretanto não foi observado um padrão em que animais 200 g ou 2000 g apresentassem valores mais elevados, independentemente do grupo experimental. Nas comparações ao longo do tempo de exposição, observou-se, no grupo C, que *A. gigas* 200 g apresentaram aumento significativo dos níveis de amônia na água enquanto que em *A. gigas* 2000 g não foram registradas diferenças significativas. Nos grupos WW e BW, tanto *A. gigas* 200 g quanto 2000 g apresentaram aumento significativo da amônia na água. Em *O. bicirrhossum* observou-se que em todos os grupos houve um aumento da amônia dissolvida na água ao longo das 3h de exposição.

TABELA II – Valores médios (\pm SEM) dos parâmetros mensurados nos tanques de aclimação as águas amazônicas (Controle (C), água branca (WW) e água preta (BW) durante os sete dias de aclimação de *Arapaima gigas* e *Osteoglossum bicirrhossum* que antecederam aos experimentos de fluxo iônico.

	C			WW			BW		
	<i>A. gigas</i>		<i>O. bicirrhossum</i>	<i>A. gigas</i>		<i>O. bicirrhossum</i>	<i>A. gigas</i>		<i>O. bicirrhossum</i>
	≈ 200 g	≈ 2000 g		≈ 200 g	≈ 2000 g		≈ 200 g	≈ 2000 g	
Dureza (mg L^{-1} CaCO_3)	0,95 \pm 0,4	0,97 \pm 0,3	0,93 \pm 0,3	3,97 \pm 0,2	4,03 \pm 0,4	3,99 \pm 0,6	8,84 \pm 0,4	8,92 \pm 0,4	8,89 \pm 0,3
Alcalinidade (mg L^{-1} CaCO_3)	1,10.10 ⁻⁵ \pm 0,03	1,12.10 ⁻⁵ \pm 0,02	1,08.10 ⁻⁵ \pm 0,04	9,90.10 ⁻⁵ \pm 0,04	9,96.10 ⁻⁵ \pm 0,06	9,94.10 ⁻⁵ \pm 0,02	3,12.10 ⁻⁵ \pm 0,01	3,20.10 ⁻⁵ \pm 0,03	3,16.10 ⁻⁵ \pm 0,05
pH	5,26 \pm 0,8	5,31 \pm 0,6	5,41 \pm 0,03	6,8 \pm 0,2	7,1 \pm 0,3	6,5 \pm 0,3	3,2 \pm 0,4	3,3 \pm 0,3	3,4 \pm 0,6
Condutividade (μS)	159 \pm 2,9	160 \pm 3,4	157 \pm 6,1	84,75 \pm 4,8	89,01 \pm 2,8	85,83 \pm 5,2	230,3 \pm 4,7	235,2 \pm 6,2	241 \pm 8,1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25,6 \pm 0,1	26,3 \pm 0,2	25,5 \pm 0,2	25,7 \pm 0,2	25,8 \pm 0,1	25,0 \pm 0,3	25,7 \pm 0,1	25,3 \pm 0,2	25,5 \pm 0,4
DCO (mg L^{-1})	47,50 \pm 5,2	49,01 \pm 6,8	44,32 \pm 3,5	48,12 \pm 5,7	49,56 \pm 6,3	46,62 \pm 6,2	50,1 \pm 4,7	51,8 \pm 7,2	53,12 \pm 3,9
DO (mg L^{-1})	41,08 \pm 7,3	42,12 \pm 4,9	41,12 \pm 5,2	42,06 \pm 6,8	45,13 \pm 8,1	40,92 \pm 6,1	41,29 \pm 7,1	46,32 \pm 8,4	44,25 \pm 8,1
Amônia (mg L^{-1})	7,25 \pm 1,51	6,89 \pm 1,63	6,38 \pm 2,0	7,01 \pm 1,68	6,79 \pm 1,77	6,9 \pm 2,10	7,30 \pm 1,68	7,01 \pm 1,63	7,17 \pm 2,10
Nitrito (mg L^{-1})	0,162 \pm 0,02	0,157 \pm 0,01	0,161 \pm 0,03	0,171 \pm 0,03	0,112 \pm 0,01	0,169 \pm 0,03	0,178 \pm 0,02	0,156 \pm 0,01	0,161 \pm 0,03

Não ocorreram variações significativas entre as amostras analisadas nos sete dias em que os animais foram aclimatados.

TABELA III – Valores médios (\pm SEM) da massa corpórea de *Arapaima gigas* e *Osteoglossum bicirrhossum* e parâmetros físico e químicos mensurados durante o período de exposição às águas amazônicas: Controle (C), água branca (WW) e água preta (BW).

	C			WW			BW			
	<i>A. gigas</i>		O. <i>bicirrhossum</i>	<i>A. gigas</i>		O. <i>bicirrhossum</i>	<i>A. gigas</i>		O. <i>bicirrhossum</i>	
	\approx 200 g	\approx 2000 g		\approx 200 g	\approx 2000 g		\approx 200 g	\approx 2000 g		
Massa Corpórea (g)	227 \pm 31	1964 \pm 74	4,09 \pm 0,47	231 \pm 16	1984 \pm 55	7,36 \pm 0,93	265 \pm 25	2004 \pm 42	5,21 \pm 0,37	INÍCIO
Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	0,92 \pm 0,2 #	0,50 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	39,21 \pm 2,59 #	41,30 \pm 3,37	29,03 \pm 0,9	6,92 \pm 0,33 #	7,34 \pm 1,9	7,01 \pm 0,3	
pH	5,25 \pm 0,3	5,20 \pm 0,8	5,25 \pm 0,7	7,55 \pm 0,3	7,32 \pm 0,3	7,4 \pm 0,5	3,23 \pm 0,3	3,21 \pm 0,3	3,64 \pm 0,2	
Condutividade (μ S)	159 \pm 1,95	160 \pm 2,2	159 \pm 3,0	90 \pm 4,2 #	85 \pm 3,9	191 \pm 5,2	193 \pm 2,0 #	230 \pm 1,63	390 \pm 1,6	
DCO (mg L ⁻¹)	10,00 \pm 1,87 #	35,00 \pm 2,67	10,00 \pm 1,4	10,83 \pm 4,9	11,67 \pm 3,97	10,00 \pm 2,1	38,33 \pm 2,58 #	42,50 \pm 2,58	15,43 \pm 3,1	
Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	*0,95 \pm 0,01 #	0,50 \pm 0,01	1,20 \pm 0,01*	39,12 \pm 1,88 #	38,04 \pm 1,17	32,53 \pm 0,2*	*7,96 \pm 4,47 #	7,34 \pm 2,9	10,01 \pm 0,8*	2 h
pH	*6,15 \pm 0,41	6,20 \pm 0,79*	6,15 \pm 0,37*	*7,47 \pm 0,06	7,2 \pm 0,07	7,55 \pm 0,1	*3,31 \pm 0,14	3,295 \pm 0,22*	3,74 \pm 0,3*	
Condutividade (μ S)	*61 \pm 5,1 #	70 \pm 2,6*	61 \pm 8,1*	93,02 \pm 3,6 #	108 \pm 2,4*	112 \pm 2,0*	*198 \pm 1,9 #	206 \pm 2,64*	268 \pm 2,8*	
DCO (mg L ⁻¹)	*15,00 \pm 2,7 #	30,00 \pm 4,1*	10,00 \pm 5,3	*13,33 \pm 2,03 #	16,67 \pm 1,37*	15,00 \pm 3,0*	*31,33 \pm 6,38 #	37,83 \pm 5,16*	20 \pm 3,7*	
Massa Corpórea (g)	*239 \pm 27	1952 \pm 53*	3,53 \pm 0,30	*254 \pm 21	1962 \pm 42*	7,57 \pm 0,65	*274 \pm 17	1981 \pm 68*	5,93 \pm 0,18*	3 h
Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	*1,25 \pm 0,92 #	0,50 \pm 0,08	1,50 \pm 0,9*	*35,54 \pm 3,22 #	39,79 \pm 2,55	30,03 \pm 0,3*	*8,09 \pm 2,34 #	8,84 \pm 1,9*	9,51 \pm 0,4*	
pH	*7,26 \pm 0,12	7,30 \pm 0,20*	7,26 \pm 0,29*	*7,82 \pm 0,10	7,30 \pm 0,10	7,48 \pm 0,37	*3,42 \pm 0,17	3,42 \pm 0,27*	3,79 \pm 0,2*	
Condutividade (μ S)	*34 \pm 2,1 #	40 \pm 3,9*	34 \pm 4,1*	*112,97 \pm 2,9 #	121 \pm 3,1*	108 \pm 1,8*	*179 \pm 4,0 #	185 \pm 3,36*	259 \pm 2,8*	
DCO (mg L ⁻¹)	*10,00 \pm 1,85 #	30,00 \pm 2,96	10,00 \pm 1,5	*36,67 \pm 6,2 #	45,00 \pm 1,25*	15,00 \pm 2,8	*46,33 \pm 2,59 #	51,67 \pm 8,37*	15,00 \pm 3,6*	

(*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação coleta de água no período anterior e (#) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação a *A. gigas* \approx 200 g e \approx 2000 g.

...continuação da tabela III.

	C			WW			BW			
	A. gigas		O.	A. gigas		O.	A. gigas		O.	
	≈200 g	≈2000 g	bicirrhossum	≈200 g	≈2000 g	bicirrhossum	≈200 g	≈2000 g	bicirrhossum	
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	13,6.10 ⁻⁵ ±0,3	12,0.10 ⁻⁵ ±0,5	13,2.10 ⁻⁵ ±0,4	74,6.10 ⁻⁵ ±0,5	71,9.10 ⁻⁵ ±0,7	75,9.10 ⁻⁵ ±0,8	0,8.10 ⁻⁵ ±0,4	1,0.10 ⁻⁵ ±0,5	1,1.10 ⁻⁵ ±0,6	Início
Temperatura (°C)	25,5±0,2	25,4±0,3	25,2±0,1	25,6±0,4	25,6±0,3	25,3±0,2	25,2±0,1	25,3±0,2	25,2±0,1	
DO (mg L ⁻¹)	7,51±0,5	7,26±0,2	7,47±0,3	7,19±0,6	7,67±0,7	7,65±0,5	7,63±0,6	7,84±0,5	7,51±0,7	
Amônia (mg L ⁻¹)	4,05±0,4	5,07±0,7	0,26±0,1	0,39±0,1	0,60±0,2	0,37±0,2	2,11±0,2	1,79±0,4	0,22±0,1	
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,746±0,002	0,770±0,004	0,069±0,003	0,317±0,004	0,311±0,001	0,115±0,001	0,0326±0,001	0,0257±0,002	0,012±0,001	
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	*14,2.10 ⁻⁵ ±0,5	# 13,5.10 ⁻⁵ ±0,7*	15,4.10 ⁻⁵ ±0,8*	*70,4.10 ⁻⁵ ±0,7	# 68,3.10 ⁻⁵ ±0,6*	64,9.10 ⁻⁵ ±0,8*	0,9.10 ⁻⁵ ±0,5	1,0.10 ⁻⁵ ±0,8	1,2.10 ⁻⁵ ±0,7	2 h
Temperatura (°C)	25,4±0,2	26,0±0,1	26,2±0,1	24,9±0,2	25,6±0,1	26,2±0,2	25,6±0,1	25,3±0,1	26,2±0,1	
DO (mg L ⁻¹)	7,35±0,4	7,28±0,6	5,95±0,5	7,24±0,6	7,65±0,4	7,35±0,5	7,62±0,6	7,58±0,3	7,59±0,4	
Amônia (mg L ⁻¹)	*6,78±0,6	# 5,47±0,5	*1,85±0,4	*7,79±0,5	# 7,26±0,4*	*6,25±0,6	*4,06±0,4	# 5,10±0,4*	*4,47±0,5	
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,774±0,001	0,794±0,002	0,018±0,002*	0,224±0,001	0,162±0,002	0,105±0,001	0,025±0,001	0,020±0,001	0,070±0,001	
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	*18,2.10 ⁻⁵ ±0,8	# 16,7.10 ⁻⁵ ±0,6*	19,8.10 ⁻⁵ ±0,2*	*74,1.10 ⁻⁵ ±0,3	# 71,9.10 ⁻⁵ ±0,4*	69,3.10 ⁻⁵ ±0,3*	0,8.10 ⁻⁵ ±0,5	0,9.10 ⁻⁵ ±0,7	1,1.10 ⁻⁵ ±0,7	3 h
Temperatura (°C)	25,6±0,2	26,1±0,4	25,2±0,2	25,2±0,3	25,3±0,2	25,2±0,4	26,0±0,1	25,3±0,3	25,2±0,2	
DO (mg L ⁻¹)	7,34±0,4	# 7,94±0,3	7,27±0,5	6,99±0,7	# 7,51±0,3	7,71±0,3	7,19±0,3	# 7,44±0,5	7,50±0,2	
Amônia (mg L ⁻¹)	*4,10±0,6	# 5,10±0,7	*3,42±0,6	*11,65±0,6	# 11,53±0,5*	*9,35±0,6	*13,39±0,5	# 12,40±0,7*	*7,13±0,6	
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,798±0,001	0,806±0,001	0,349±0,001*	0,202±0,003	0,137±0,002	0,119±0,003	0,034±0,003	0,016±0,002	0,058±0,002	

(*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação coleta de água no período anterior e (#) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação a *A.gigas* ≈200 g e ≈2000 g.

Análises dos fluxos de íons

Para as análises dos fluxos de íons ao longo da exposição em C, WW e BW foram considerados os movimentos dos íons nos animais determinados como diminuição de íons na água representando a absorção de íons (influxo líquido) e aumento de íons na água representando a difusão para o meio aquático (efluxo líquido).

Em *A. gigas* ≈ 200 g o efluxo líquido de Na^+ foi significativamente maior ($p \leq 0.05$) em peixes expostos à BW e aumentaram durante a exposição (Fig. 02). Em *A. gigas* ≈ 2000 g os valores de efluxo líquido foram significativamente menores em relação a *A. gigas* ≈ 200 g sendo que houve uma redução significativa no efluxo líquido de Na^+ mais evidente no grupo WW (Fig. 02). Em *O. bicirrhossum* houve efluxo deste íon nos grupos C e WW, sendo que em C houve um aumento significativo em 3h enquanto que em WW não houveram diferenças significativas (Fig. 02). Em BW ocorreu influxo deste íon, que reduziu em 3h de exposição (Fig. 02).

Em relação ao fluxo líquido de K^+ (Fig. 03), em *A. gigas* o efluxo de K^+ foi mais elevado em animais ≈ 200 g dos grupos C e BW. No grupo WW, *A. gigas* ≈ 200 g apresentaram efluxo deste íon e *A. gigas* ≈ 2000 g influxo, em 2 h e em 3h os animais ≈ 200 g apresentaram influxo e os ≈ 2000 g efluxo (Fig. 03). Nas observações ao longo das 3h de exposição, *A. gigas* ≈ 200 g expostos a WW observou-se efluxo de K^+ nas primeiras 2 h de experimento e foi seguido de influxo após 3 h; em *A. gigas* ≈ 2000 g ocorreu um influxo inicial (2 h) seguido de efluxo após 3 h. Em animais expostos à BW ocorreu um efluxo em 2 h de exposição e um aumento significativo em 3 h sendo que o efluxo foi significativamente mais alto nos animais menores (Fig. 03). Em *O. bicirrhossum*, observou-se no grupo C influxo, que diminuiu ao longo de 3 h. No grupo

WW não houveram diferenças significativas nas 3 h de exposição e no grupo BW houve efluxo inicial que aumentou significativamente em 3 h de exposição (Fig. 03).

Em relação ao fluxo líquido de Ca^{++} (Fig. 04), em *A. gigas* foram observados os maiores valores de efluxos de Ca^{++} em animais ≈ 200 g, em todos os grupos (C, WW e BW) em 2 h. Após 3 h de experimento, *A. gigas* ≈ 200 g apresentaram redução no efluxo em *A. gigas* ≈ 2000 g o grupo C teve uma ligeira redução do efluxo inicial, o grupo WW teve a maior redução do efluxo e o grupo BW não foram observadas diferenças significativas após 3 h de exposição. Em *O. bicirrhossum*, houve efluxo deste cátion nos grupos C e BW, enquanto que em WW, após um efluxo inicial houve um influxo ao término das 3 h de exposição.

FLUXOS LÍQUIDOS DE Na⁺ EM OSTEGLLOSSIFORMES APÓS EXPOSIÇÃO EM ÁGUAS AMAZÔNICAS

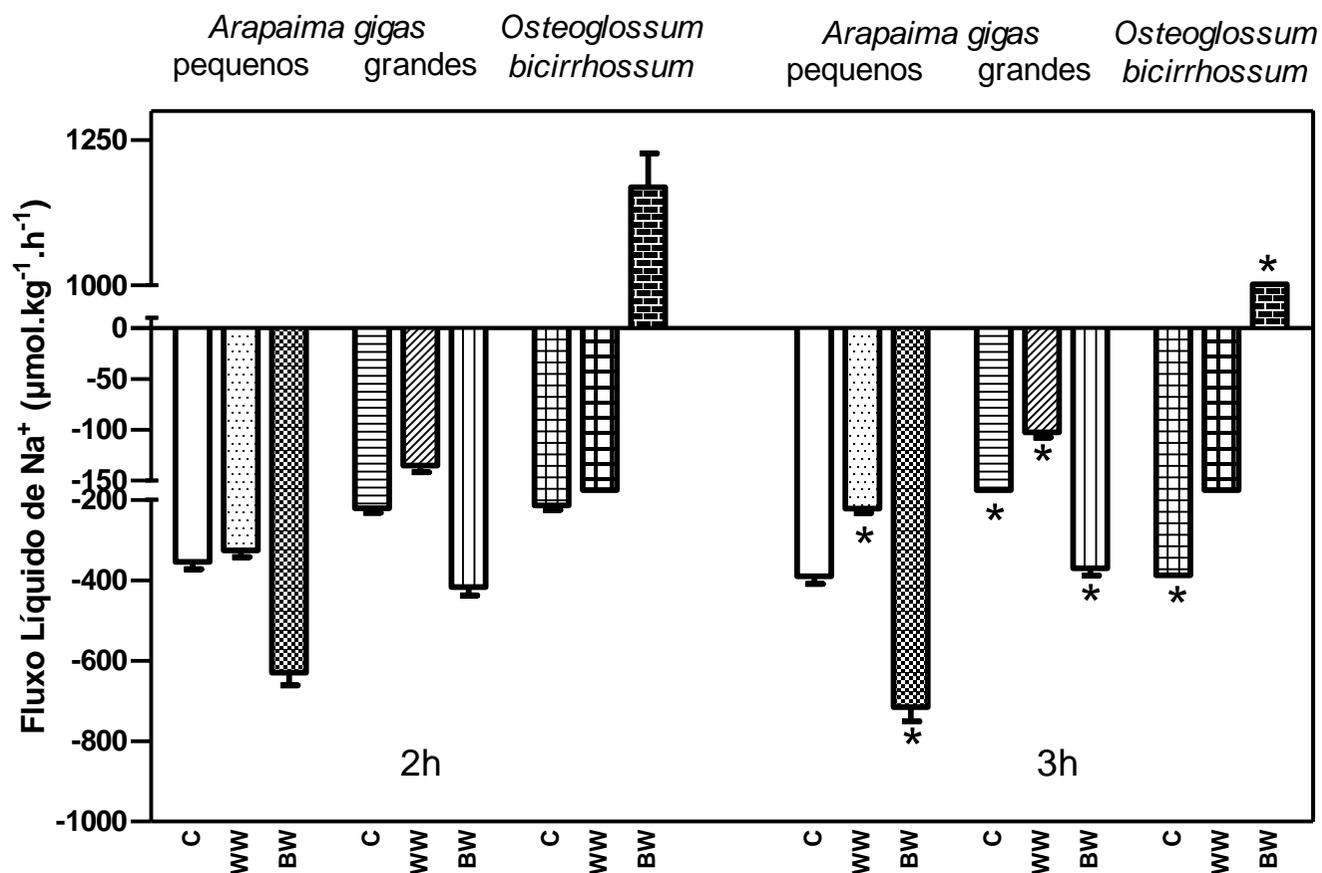


Figura 02: Fluxos líquidos de Na⁺ em *Arapaima gigas* [pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)] e em *Osteoglossum bicirrhossum*. Note que em *A. gigas* houve redução do efluxo de Na⁺ em WW e aumento em BW, enquanto em *O. bicirrhossum* houve aumento do efluxo no grupo C seguido de influxo de Na⁺, após três horas, no grupo BW.

* indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

FLUXOS LÍQUIDOS DE K⁺ EM OSTEOGLOSSIFORMES APÓS EXPOSIÇÃO EM ÁGUAS AMAZÔNICAS

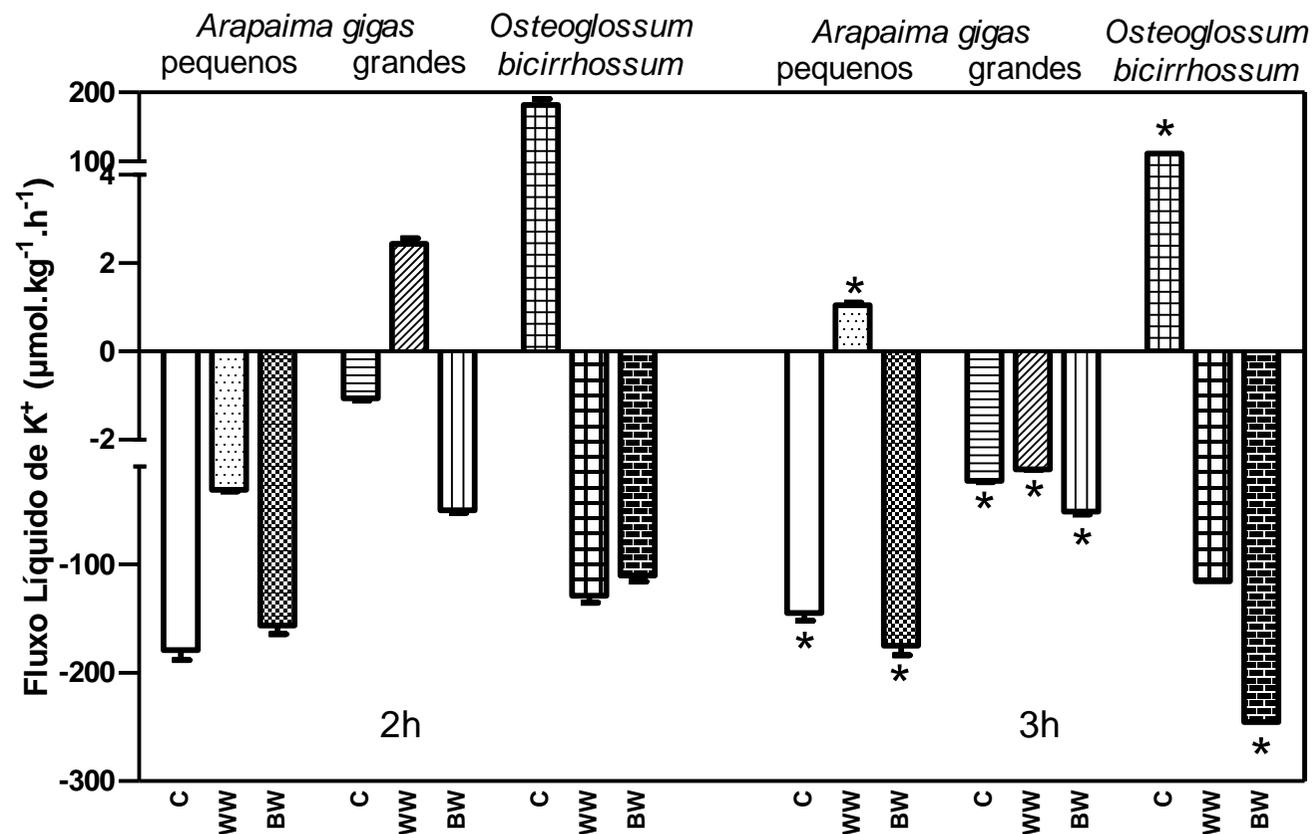


Figura 03: Fluxos líquidos de K⁺ em *A. gigas* pequenos (≈200 g) e grandes (≈2000 g) e *O. bicirrhossum*. Note redução do efluxo de K⁺ nos exemplares menores de *A. gigas* no grupo C, influxo no grupo WW e aumento do efluxo em BW após 3 h; nos exemplares maiores note aumento de efluxo no grupo C, mudança de influxo (2 h) para efluxo (3 h) em WW e aumento de efluxo em BW. Em *O. bicirrhossum* note influxo (2 h) e efluxo (3 h) no grupo C e aumento de efluxo em BW e ausência de alterações significativas em WW. * indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

FLUXOS LÍQUIDOS DE Ca^{++} EM OSTEOGLOSSIFORMES APÓS EXPOSIÇÃO EM ÁGUAS AMAZÔNICAS

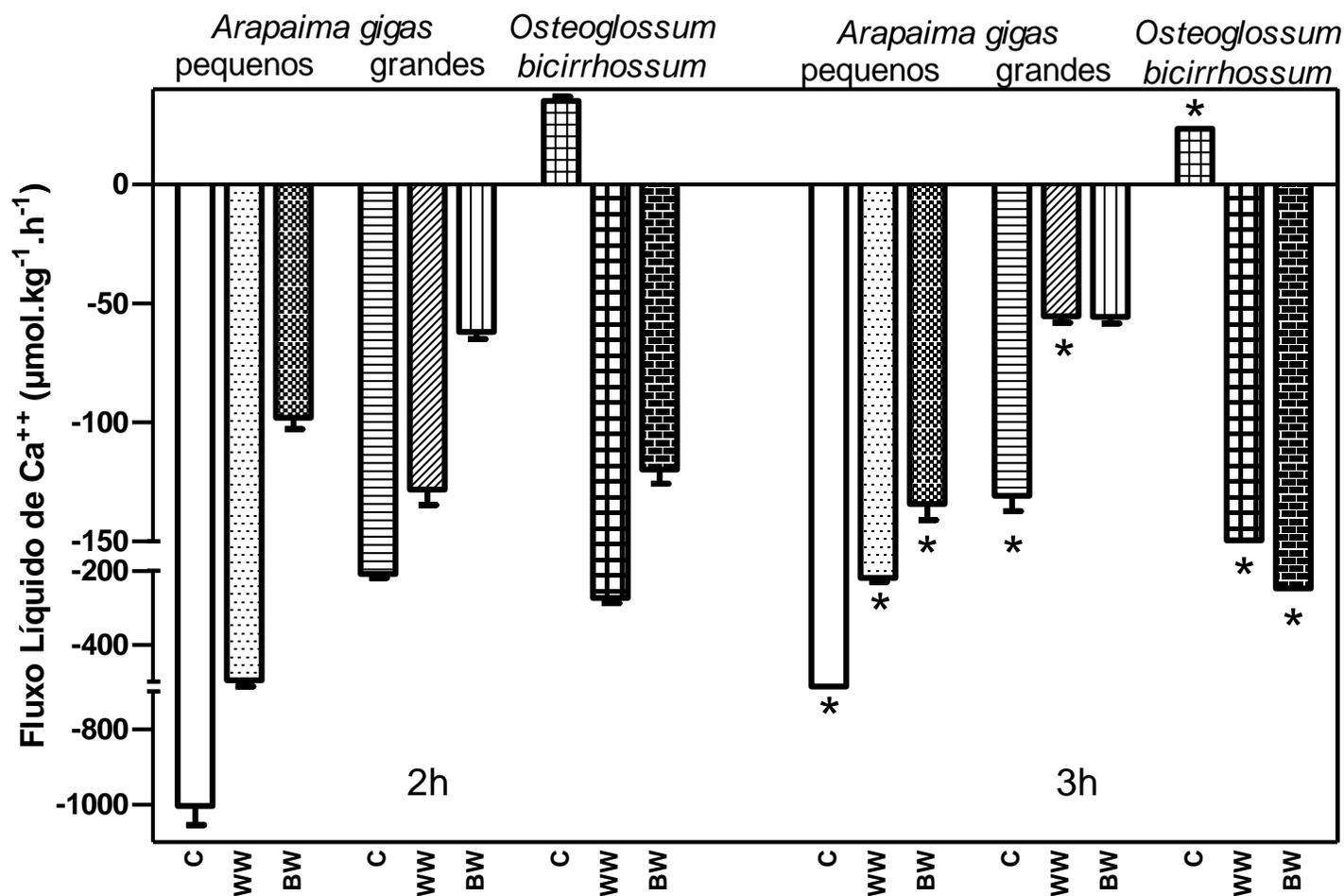


Figura 04: Fluxos líquidos de Ca^{++} em *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g)] e *O. bicirrhossum*. Observa-se em exemplares menores de *A. gigas* redução do efluxo nos grupo C, WW e BW; exemplares maiores apresentaram redução de efluxo nos grupos C e WW. Em *O. bicirrhossum* houve diminuição de influxo no grupo C, redução do efluxo em WW e aumento de efluxo em BW. * indica diferença significativa entre o período de 2 h e 3 h.

DISCUSSÃO

Inferências sobre os processos de regulação iônica em animais expostos à diferentes águas amazônicas podem ser formuladas baseando-se em respostas dos parâmetros mensurados durante o tempo de exposição do animais à estas águas. A comparação das variações destes parâmetros entre animais pequenos e grandes pode estar relacionada com a variação na morfologia branquial.

As alterações constatadas nos valores da massa corpórea (MC) de *A. gigas* como a redução da MC nos animais maiores e aumento nos animais menores podem ser reflexo da morfologia branquial destes animais. *A. gigas* com até ≈ 200 g apresentam uma barreira branquial de difusão de gases delgada, conforme demonstrado por RAMOS (2008) a qual pode favorecer o fluxo de água para o corpo do animal assim como a difusão de íons para o meio externo. Em *A. gigas* com ≈ 2000 g o sistema de células pilares está embebido no tecido epitelial dos filamentos de forma que o influxo de água para o animal é reduzido, assim como as perdas iônicas. Exemplares de *A. gigas* de até ≈ 400 g apresentam respiração bimodal e a sua estrutura branquial é típica de um respirador aquático obrigatório sendo suas brânquias o principal sítio para as trocas gasosas (GRAHAM, 1997); nos peixes maiores (>400 g) a bexiga natatória, modificada passa a ser o principal sítio para a absorção do O_2 , via atmosfera. Nestes animais as brânquias são o principal sítio de regulação de íons devido à grande proliferação de células ricas em mitocôndrias (CRMs) (RAMOS, 2008).

As mudanças na dureza, alcalinidade, condutividade e pH na água, durante o período de exposição nas diferentes águas amazônicas podem estar associadas às

modificações na fisiologia destes animais a despeito da regulação iônica e excreção de compostos nitrogenados. Com base nos resultados observados na dureza, pH e condutividade e fluxos de íons podem ser feitas inferências acerca dos mecanismos de transporte iônico nos animais. Foi constatado no grupo C e WW e BW um aumento do pH na água para ambas as espécies deste estudo, entretanto em *A. gigas* ≈ 2000 g não foi observado tal aumento. Considerando o modelo proposto por HIROSE *et al.* (2003), que sugere a atividade de transportadores do tipo V-ATPases localizados nas membranas basolaterais das CRMs, nos exemplares de *A. gigas* ≈ 2000 g pode haver contribuição destas proteínas para manter o pH estável ao longo da exposição em WW. Considerando ainda que animais nesta faixa de MC apresentam grande proliferação de CRMs (RAMOS, 2008) a hipótese da atividade destas enzimas como agente da manutenção do pH é plausível. A redução da condutividade da água constatada pode estar relacionada com a absorção de íons (influxos) e este padrão foi observado em *O. bicirrhosum* em todos os grupos, entretanto em *A. gigas*, ambas MCs, no grupo WW houve aumento da condutividade, indicando perdas de íons (efluxo). BRINN *et al.* (2012) estudando o stress em *Potamotrygon cf. hystrix* durante transporte no rio Negro, registrou aumento da condutividade na água e relacionou-o com aumento das perdas de Na^+ e K^+ e excreção de amônia na água. Estes dados refutam a hipótese de que *A. gigas* teria melhor capacidade íon regulatória em WW, pois se for considerado que este animal é típico de WW as perdas de íons seriam reduzidas. Esta divergência pode ser explicada pelo aumento da liberação de amônia para o meio e também o aumento da alcalinidade e dureza.

Os valores observados nos fluxos de íons também permitem uma inferência no padrão de regulação de íons nas águas a que os animais foram expostos. Os aumentos dos valores de efluxo líquido de Na^+ em peixes pequenos do grupo BW ao

longo de 3 h contrastando com a redução deste efluxo em WW é um indicativo que em WW a capacidade íon regulatória de *A. gigas* é mais eficiente. Nas comparações entre *A. gigas* ≈ 200 g e ≈ 2000 g estes último grupo apresentou um efluxo menor que os animais ≈ 200 g o que leva à hipótese de que animais ≈ 2000 g têm menos perdas do íon Na^+ . Esta hipótese é suportada pelo estudo de BRAUNER *et al.* (2004), que observou elevada imunoreatividade por imunofluorescência para a enzima NKA de peixes de 1000 g, e também pelo estudo de (RAMOS, 2008) que observou nas brânquias de animais a partir de ≈ 400 g grande proliferação de células que envolvem o sistema de células pilares acarretando em uma diminuição das perdas iônicas. GONZALEZ *et al.* (2010) observaram em *A. gigas* de $\approx 67,5$ g, os valores de absorção de Na^+ dos peixes de $\approx 724,2$ g foi quase 3,5 vezes maior, ressaltando o envolvimento das brânquias destes animais com a regulação de íons. Neste estudo os autores observaram a atividade da enzima NKA nas brânquias e rins e esta mostrou-se mais elevada nos peixes menores ($\approx 67,5$ g). Considerando os resultados obtidos por GONZALEZ *et al.* (2010) a grande ocorrência de CRMs observada em peixes grandes (BRAUNER *et al.*, 2004; RAMOS, 2008) contrasta com sua baixa atividade. Neste caso pode haver uma baixa quantidade da proteína NKA nas CRMs. Sendo assim a diminuição nos efluxos de Na^+ observados no presente trabalho podem estar relacionados com outras vias como o trocador Na^+/H^+ na membrana apical. A ocorrência e atividade destas proteínas pode, também, estar relaciona com o aumento do pH na água, observado em todos os grupos, exceto *A. gigas* ≈ 2000 g e *O. bicirrhosum* em WW. Nas comparações entre as duas espécies seria esperado que *O. bicirrhosum* apresentasse um padrão de regulação iônica semelhante ou próxima à de *A. gigas* ≈ 200 g, por conta das semelhanças na estrutura branquial. Alguns resultados mostraram-se semelhantes, como o efluxo de Na^+ em C e WW, K^+ em BW

e Ca^{++} em WW e BW, entretanto para os outros íons e grupos os resultados entre as duas espécies contrastaram. Estas diferenças têm duas explicações, primeiramente a diferença morfométrica dos rins destes animais e suas ATPases. HOCHACHKA *et al.* (1978) observaram que o rim de *A. gigas* é cerca de 3,5 vezes maior que o rim de *O. bicirrhossum* e a atividade de NKA renal em *A. gigas* é cerca de 4 vezes maior que de *O. bicirrhossum*. Além disso GONZALEZ *et al.* (2010) observaram diferenças na atividade NKA dos rins e das brânquias. Segundo estes autores, em peixes pequenos a atividade NKA renal é cerca de 75% maior que a branquial e em peixes grandes apenas 4 vezes maior.

Sobre o transporte de Na^+ em BW, estudos sugerem dois padrões básicos de regulação iônica. O primeiro, de acordo com GONZALEZ & WILSON (2001), sugere a presença de transportadores de Na^+ com uma alta afinidade pelo íon e conseqüentemente altas taxas de absorção e perda de Na^+ . O segundo padrão, proposto por GONZALEZ *et al.* (2002) sugere uma baixa afinidade dos transportadores de Na^+ e conseqüentemente baixas taxas de absorção e perdas deste íon. No presente estudo foi observado uma pequena, mas significativa, absorção de Na^+ em WW para ambas MC de *A. gigas* enquanto que em *O. bicirrhossum* não ocorreu alterações. Deste modo, pode-se inferir que a afinidade do transportador de Na^+ e a taxa de absorção são baixas. Resultados similares foram constatados por BALDISSEROTTO *et al.* (2008), que citaram uma taxa muito baixa de tomada de Na^+ ($70 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) em *A. gigas* ≈ 1000 g. Algumas espécies apresentam um transporte de Na^+ que é mais acentuado em pH baixo, o que permite a sobrevivência em águas acidificadas (GONZALEZ & WILSON, 2001). Esse padrão de resposta não foi observado nas espécies do presente estudo, de modo que em BW, *A. gigas* ≈ 200 g

teve um aumento da perda de Na⁺ enquanto *A. gigas* 2000 g teve uma ligeira redução das perdas de Na⁺ e em *O. bicirrhossum* ocorreu um aumento das perdas de Na⁺.

Esta maior perda de Na⁺ em BW e, comparativamente menor em *A. gigas* ≈2000 g, permitem inferir que em ambientes de WW exemplares grandes de *A. gigas* devem apresentar uma capacidade de regulação iônica otimizada. Quanto aos exemplares grandes (≈2000 g), de acordo com os dados encontrados no Cap. 2, corroborando o estudo de RAMOS (2008), os animais maiores, a partir de 1000 g têm suas brânquias como sítios de regulação iônica através das CRMs e sabe-se que as CRMs apresentam bombas eletrogênicas do tipo NKA (HIROSE *et al.*, 2003) e estudos têm demonstrado grandes quantidades desta bomba eletrogênica nas brânquias de *A. gigas* (BRAUNER *et al.*, 2004; RAMOS, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2010) e também conforme demonstrado no Cap 2. a bomba NKA também é responsável pelo transporte intracelular de K⁺ e no presente estudo esta enzima pode ter contribuído para redução do efluxo deste íon no período de três horas de exposição (Fig. 03).

A literatura cita que a tomada de Ca⁺⁺ é muito menor que a de Na⁺ (MATSUO *et al.*, 2005; BALDISSEROTTO *et al.*, 2009) e este íon que desempenha importantes funções como na coagulação e sinalização celular é adquirido nos peixes por fontes nutricionais ou absorção pelas brânquias (FLIK *et al.*, 1995). No presente estudo os efluxos de Ca⁺⁺ e conseqüentemente sua redução ao longo de 3 h sugerem que animais menores do grupo WW apresentam vias de regulação iônica para este íon mais eficiente que animais maiores. BALDISSEROTTO *et al.* (2009) observaram que o fluxo de Ca⁺⁺ em *Hoplosternum littoralle* transferido de BW para WW ou vice-versa era resultado em perdas deste íon apenas nas 2 h iniciais do experimento. Os autores ainda concluem que a transferência deste peixe para as BW leva a uma perda de Ca⁺⁺

temporária e a disponibilidade de Ca^{++} na WW pode prevenir a perda deste íon após a transferência do peixe. Considerando que no presente estudo *A. gigas* (ambas MC), tanto em WW quanto em BW apresentaram uma ligeira tomada de íons e provavelmente este fato se deve aos animais já estavam aclimatados nestas águas por sete dias e não foram transferidos de BW à WW, ou vice-versa. O mesmo não se aplica para *O. bicirrhosum*, que em WW apresentou uma absorção de Ca^{++} ao longo de 3h em contraste com a exposição à BW onde observou-se um aumento do efluxo deste íon.

No presente estudo, a absorção de Ca^{++} , constatada em *A. gigas* pode ser reflexo da morfologia branquial, mais precisamente pelo aumento de CRMs (BRAUNER *et al.*, 2004; RAMOS, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2010). De acordo com HIROSE *et al.* (2003) o principal contribuidor para o transporte deste cátion pelas CRMs é o cotransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX) e a bomba eletrogênica Ca^{++} -ATPase (PMCA). Por outro lado o Ca^{++} pode influenciar na alcalinidade e dureza da água, pois a análise destes dois parâmetros se dá por mensurações de CaCO_3 livre na água (GOLTERMAN *et al.*, 1978; ADAD, 1982). A redução dos efluxos destes cátions ao longo de três horas de exposição provavelmente não estão relacionados à alterações de alcalinidade pois este parâmetro apresentou um ligeiro aumento embora não significativo. Outro fator que pode influenciar a disponibilidade de CaCO_3 livre é a secreção de H^+ e HCO_3^- pelas CRMs, considerando a seguinte reação: $\text{H}^+ + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{++}$. Deste modo, o H^+ e HCO_3^- liberado pelas CRMs poderia diminuir ou aumentar a alcalinidade do meio, respectivamente. No presente estudo foi verificado uma alta taxa de efluxo de Ca^{++} e um aumento da alcalinidade e dureza na água, sendo assim o aumento do efluxo de Ca^{++} não está relacionado com o aumento da alcalinidade/dureza. Uma secreção de HCO_3^- pelas CRMs associada com uma

liberação de Ca^{++} contribuiria para o aumento da dureza, mas isso não foi observado nos experimentos uma vez que houve aumento dos efluxos de Ca^{++} em BW concomitantemente com o aumento da dureza/alcalinidade. Sendo assim a redução dos níveis de Ca^{++} provavelmente se deve à atividade da NCX e PCMA. O aumento do pH observado nos grupos C e WW não foi observado no grupo BW, provavelmente devido ao caráter ácido desta água. Resultado similar foi observado por HUANG & LIN (2011), que estudaram os fluxos de íons em *Trichogaster lalius* sp., um peixe de respiração aérea. Os autores observaram diferentes padrões de regulação iônica em ambientes acidificados que envolvem também alterações morfológicas do epitélio branquial, similares às observações de estudos recentes (SOLLID *et al.*, 2003; SOLLID *et al.*, 2005; SOLLID & NILSSON, 2006), ou seja, um remodelamento do epitélio branquial que aumenta a espessura da barreira de difusão contribuindo para diminuir as perdas iônicas. As espécies do presente estudo não apresentaram alterações semelhantes à observada pelos autores, conforme discutido no Cap. 2.

Embora as brânquias sejam sítios ativos de regulação iônica, os rins e intestinos devem ser considerados na regulação iônica e osmótica do animal e o transporte de íons nesses órgãos também pode ser afetado por alterações no meio externo. DUNCAN *et al.* (2011) sugerem que arraias Potamotrigonidae de água doce coletadas no rio Negro podem realizar uma “*up-regulation*” da atividade da enzima NKA, comparado à outros peixes amazônicos, e que em ambientes de água preta ocorreria uma reabsorção de Na^+ pelos rins. Tal resultado seria esperado para animais endêmicos de ambientes com águas moles e pobres em íons de modo que a proliferação de CRMs nos filamentos e lamelas dessas arraias poderia manter o compromisso osmorrespiratório dos animais (DUNCAN *et al.*, 2010; DUNCAN *et al.*, 2011). De acordo com GONZALEZ & MCDONALD (1992); GONZALEZ &

MCDONALD (1994) a absorção de íons do meio depende de seu pH, temperatura e osmolaridade e WOOD (1989) sugere que a redução ou inibição do influxo de Na⁺ é uma resposta típica de peixes de água doce expostos à baixo pH, assim como os resultados observados no presente estudo.

Na bacia Amazônica, devido às características físico e químicas da água dos rios de WW e BW, tem sido hipotetizado que os de BW formariam uma barreira hidrográfica restringindo a dispersão dos peixes (LOVEJOY & DE ARAUJO, 2000; HUBERT & RENNO, 2006; WILLIS *et al.*, 2007). No caso de *A. gigas* os resultados claramente indicam que esta espécie pode permanecer em ambientes de BW com pH baixo, entretanto os espécimes maiores possuem maior capacidade para regular a homeostase iônica em relação aos menores. O mesmo padrão de resultados foi observado em *O. bicirrhossum* o que sugere que animais de *A. gigas* podem migrar através dos rios de BW para rios de WW, permitindo a dispersão da espécie. Entretanto, *A. gigas* menores e *O. bichirrossum*, devido à morfologia de suas brânquias típica de respiradores aquáticos, são mais suscetíveis ao ambiente pobre em íons e acidificado típicos de BW. Com o remodelamento do epitélio branquial, exemplares maiores de *A. gigas* tem maior possibilidade de migração entre rios de diferentes águas enquanto que *O. bicirrhossum* se restringe ao rios de WW, baseando-se no aumento das perdas de íons em BW e a morfologia branquial desta espécie (discutida no Cap. 2).

Os resultados do presente estudo, quanto ao fluxo iônico nas diferentes águas amazônicas corrobora a hipótese de HRBEK *et al.* (2005) que baseados em marcadores genéticos, sugerem que esta espécie forma uma única população panmítica. Deste modo a espécie pode migrar por ambientes de BW sendo que a

regulação iônica deve ser mais eficiente em WW. No entanto a espécie *O. bichirrossum* não deve apresentar tal plasticidade e portanto explica-se a sua distribuição em rios de WW (LOWE-MCCONNELL, 1964).

Dentre as multifunções executadas pelas brânquias está a liberação de produtos nitrogenados (EVANS *et al.*, 2005; MARSHALL & GROSELL, 2006) e no presente estudo foi observado um ligeiro, mas não significativo, aumento nos níveis de amônia durante às exposições em WW e BW. Segundo WOOD (1993) e WILKIE (1997) este composto nitrogenado é liberado para o ambiente de forma passiva e pelas brânquias, entretanto em *A. gigas*, devido ao sistema de células pilares obstruídos por epitélio nos animais maiores a amônia liberada para a água deve ocorrer por atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ renal (BRAUNER *et al.*, 2004).

As alterações na regulação iônica têm efeito direto nas trocas gasosas, pelo espessamento da barreira de difusão, de modo que este balanço intrínseco entre a “demanda de oxigênio” e “regulação iônica” nas brânquias é definido como “compromisso osmorespiratório” (NILSSON, 1986). Como *A. gigas* apresenta uma morfologia branquial distinta entre peixes pequenos e grandes seria esperado alterações nesse compromisso em peixes pequenos, assim como em *O. bicirrhossum*. GONZALEZ *et al.* (2010) sugere que a redução na capacidade de difusão branquial em peixes grandes tem pouco efeito na tomada de O_2 , principalmente devido à respiração aérea do animal. Nossos resultados sugerem uma rápida recuperação dos efluxos de íons (influxo) em peixes grandes, entretanto alterações de outras classes não podem ser descartadas, como remodelamento branquial em *Carassius auratus* e *C. carassius* (SOLLID *et al.*, 2003; SOLLID *et al.*, 2005; SOLLID & NILSSON, 2006)

ou atividade específica das bombas eletrogênicas diferencias em ambientes de BW (DUNCAN *et al.*, 2011).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem inferir sobre o padrão de regulação iônica em *A. gigas* e *O. bicirrhosum*. Primeiramente, testando o efeito do remodelamento branquial de *A. gigas*, pode-se concluir que o epitélio branquial de *A. gigas* ≈ 2000 g teve efeito na regulação de íons o que foi comprovado pelas menores perdas iônicas nos espécimes maiores. Considerando que a literatura cita que *A. gigas* e *O. bicirrhosum* são espécies de ocorrência em WW os fluxos de íons corroboram esta afirmação pois em WW as espécies apresentaram uma absorção dos íons em 3h de exposição. Finalmente, testando a hipótese da barreira hidrográfica por BW o estudo fornece subsídios para indicar que a espécie *A. gigas* não sofre efeito da barreira, principalmente os exemplares grandes que apresentam menores perdas de íons, diferentemente de *O. bicirrhosum* onde observou-se que frequentemente em BW há um aumento das perdas iônicas em 3h enquanto em WW a retomada de íons é mais eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAD, J. M. T. **Controle químico de qualidade**. Guanabara, 204pp., 1982.

AUCOUR, A. M.; TAO, F. X.; MOREIRA-TURCQ, P.; SEYLER, P.; SHEPPARD, S.; BENEDETTI, M. The Amazon River: behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1-4, p. 271-285, 2003.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 405-412, 2008.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R. Calcium fluxes in *Hoplosternum littorale* (tamoatá) exposed to different types of Amazonian waters. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 465-470, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; VAL, A. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4B, p. 749-752, 2002.

BOYD, C. E. **Water quality in warm water fish ponds**. Auburn University, Agricultural Experiment Station Auburn, Alabama, 359pp., 1979.

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Water quality and pond soil analyses for aquaculture**. Alabama: Auburn University, 190pp., 1992.

BRAUM, E.; BOCK, R. Funktions-morphologische Untersuchungen über die Barteln von *Osteoglossum bicirrhosum* (Pisces, Osteoglossidae) während der Notatmung. **Amazoniana**, v. 9, p. 353-370, 1985.

BRAUNER, C. J.; MATEY, V.; WILSON, J. M.; BERNIER, N. J.; VAL, A. L. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1433-1438, 2004.

BRINN, R. P.; MARCON, J. L.; MCCOMB, D. M.; GOMES, L. C.; ABREU, J. S.; BALDISSEROTTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 162, p. 139-145, 2012.

DUNCAN, W. P.; DA COSTA, O. T. F.; SAKURAGUI, 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, n. 1, p. 19-32, 2010.

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

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

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97-177, 2005.

FLIK, G.; VERBOST, P. M.; BONGA, S. E. W. Calcium Transport Processes in Fishes. In: WOOD, C. M. e SHUTTLEWORTH, T. J. (Ed.). **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. San Diego: Academic Press, v.14, cap. 12, p.317-342, 1995.

FURCH, K. Water chemistry of the Amazon basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: H., S. (Ed.). **The Amazon: limnology and**

landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Junk, Dordrecht: Dordrecht, Junk, p.167-199, 1984.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHMSTAD, M. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. **IBP Handbook**, v. 8, p. 215, 1978.

GONZALEZ, R. J.; MCDONALD, D. G. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 163, n. 1, p. 317-332, 1992.

GONZALEZ, R.; MCDONALD, D. G. The relationship between oxygen uptake and ion loss in fish from diverse habitats. **Journal of Experimental Biology**, v. 190, n. 1, p. 95-108, 1994.

GONZALEZ, R. J.; BRAUNER, C. J.; WANG, Y. X.; RICHARDS, J. G.; PATRICK, M. L.; XI, W.; MATEY, V.; VAL, A. L. Impact of ontogenetic changes in branchial morphology on gill function in *Arapaima gigas*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 2, p. 322-332, 2010.

GONZALEZ, R. J.; DALTON, V. M.; PATRICK, M. L. Ion regulation in ion-poor acidic water by the blackskirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*), a fish native to the Amazon River. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 70, n. 4, p. 428-435, 1997.

GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic Rio Negro. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 6, p. 1680-1690, 2001.

GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; WOOD, C. M.; PATRICK, M. L.; VAL, A. L. Diverse strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio Negro. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, n. 1, p. 37-47, 2002.

GONZALEZ, R. J.; WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; VAL, A. L. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 71, n. 1, p. 15-22, 1998.

GOULDING, M.; CARVALHO, L. Rio Negro, rich life in poor water. Amazonian diversity and food chain ecology as seen through fish communities. **SPB Academic Publishing, The Netherlands.**, p. 200, 1988.

GRAHAM, J. B. **Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation.** Academic Press San Diego, California, 299pp., 1997.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 4, p. 593-620, 2003.

- HOCHACHKA, P. W.; MOON, T. W.; BAILEY, J.; HULBERT, W. C. The osteoglossid kidney: correlations of structure, function, and metabolism with transition to air breathing. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 4, p. 820-832, 1978.
- HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R.; MEYER, A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conservation**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 2005.
- HUANG, C. Y.; LIN, H. C. The effect of acidity on gill variations in the aquatic air-breathing fish, *Trichogaster lalius*. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 158, n. 1, p. 61-71, 2011.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, 2006.
- KANAZAWA, R. H. The fishes of the genus *Osteoglossum* with a description of a new species from the Rio Negro. **Ichthyologica**, v. 37, n. 4, p. 161-172, 1966.
- KONHAUSER, K. O.; FYFE, W. S.; KRONBERG, B. I. Multi-element chemistry of some Amazonian waters and soils. **Chemical Geology**, v. 111, n. 1-4, p. 155-175, 1994.

LOVEJOY, N.; DE ARAUJO, M. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

LOWE-MCCONNELL, R. H. The fishes of the Rupununi savanna district of British Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle on the fish. **Journal of the Linnean Society (Zoology)**, v. 45, n. 304, p. 103-144, 1964.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: EVANS, D. H. e CLAIBORNE, J. B. (Ed.). **The Physiology of Fishes**. New York: CRC Press, v.3, p.177-230. 2006.

MATSUO, A. Y. O.; VAL, A. L. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 4, p. 989-1000, 2007.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. **Aquatic toxicology**, v. 74, n. 4, p. 351-364, 2005.

MORTATTI, J.; PROBST, J. L. Silicate rock weathering and atmospheric/soil CO₂ uptake in the Amazon basin estimated from river water geochemistry:

seasonal and spatial variations. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1-4, p. 177-196, 2003.

NILSSON, S. Control of gill blood flow. In: NILSSON, S. e HOLMGREN, S. (Ed.). **Fish Physiology: Recent Advances**. London: Croom Helm, p.86-101. 1986.

RAMOS, C. A. **Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas* durante a transição da respiração aquática para respiração aérea**. Dissertação de Mestrado: Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 79pp., 2008

RICHEY, J. E.; HEDGES, J. I.; DEVOL, A. H.; QUAY, P. D.; VICTORIA, R.; MARTINELLI, L.; FORSBERG, B. R. Biogeochemistry of carbon in the Amazon River. **Limnology and Oceanography**, v. 35, n. 2, p. 352-371, 1990.

SIOLI, H. The Amazon and its main effluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: SIOLI, H. (Ed.). **The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty Tropical river and its basin**. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, p.127-166, 1984.

SOLLID, J.; DE ANGELIS, P.; GUNDERSEN, K.; NILSSON, G. E. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 20, p. 3667-3673, 2003.

SOLLID, J.; NILSSON, G. E. Plasticity of respiratory structures-Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 154, n. 1-2, p. 241-251, 2006.

SOLLID, J.; WEBER, R. E.; NILSSON, G. E. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 6, p. 1109-1116, 2005.

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.

WALLACE, A. R. **A narrative of travels on the Amazon and Rio Negro**: New York: Dover, 368pp., 1853.

WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 118, n. 1, p. 39-50, 1997.

WILLIS, S. C.; NUNES, M. S.; MONTAÑA, C. G.; FARIAS, I. P.; LOVEJOY, N. R. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 291-307, 2007.

WOOD, C. M. The physiological problems of fish in acid waters. In: MORRIS, R.; TAYLOR, E. W., *et al* (Ed.). **Acid toxicity and aquatic animals**. Cambridge: Society for Experimental Biology, v.34, p.125-152. 1989.

WOOD, C. M. **Ammonia and urea metabolism and excretion**. The Physiology of Fishes. EVANS, D. Boca Raton: CRC Press: 379-425 p. 1993.

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

CAPÍTULO 2

Morfologia funcional das brânquias de Osteoglossiformes amazônicos em ambientes de água branca e preta

Palavras-chave: Compromisso osmorrespiratório, histoquímica, imunohistoquímica, pirarucu, aruanã.

INTRODUÇÃO

As brânquais dos teleósteos respiradores aquáticos obrigatórios apresenta uma morfologia característica constituída de arcos branquiais nos quais estão inseridas duas fileiras de filamentos branquiais unidos até certa extensão por um septo (septo interbranquial) e em cada filamento, acima e abaixo do seu eixo longitudinal, apresenta lamelas transversais que são as estruturas efetivas para as trocas gasosas. Estes órgãos são considerados multifuncionais (EVANS *et al.*, 2005), pois além das trocas gasosas, tem importante papel em outras funções como equilíbrio ácido-base, regulação iônica e eliminação de produtos nitrogenados. O epitélio branquial é constituído por três tipos celulares principais, as células pavimentosas (CPs), células ricas em mitocôndrias (CRMs) e células mucosas (CMs) além de células indiferenciadas (HUGHES, 1984; HOSSLER *et al.*, 1985; PERRY, 1997; EVANS *et al.*, 2005). De acordo com estes estudos, as CPs são as mais numerosas, as CMs são responsáveis pela secreção de mucossubstâncias e as CRMs são responsáveis pela absorção de íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} nos peixes de água doce. As CRMs e CMs estão distribuídas entre as CPs no epitélio que reveste o filamento branquial e, dependendo das características físicas e químicas da água, pode ocorrer proliferação das CRMs no epitélio da lamela que é o local onde ocorrem as trocas gasosas (O_2 e CO_2) aumentando a distância de difusão água-sangue no processo respiratório.

Diversos estudos quanto a organização anatômica e caracterização da morfologia funcional têm elucidado características espécie-específica e suas relações com o meio ambiente (HUGHES, 1972; OLSON & FROMM, 1973; HOSSLER, 1980; HOSSLER *et al.*, 1985; FERNANDES *et al.*, 2007; DUNCAN *et al.*, 2010), entretanto estudos envolvendo a influência dos diferentes tipos de águas amazônicas na

morfologia branquial quanto ao compromisso osmorrespiratório dos peixes da Amazônia são escassos. Os teleósteos amazônicos enfrentam diferentes desafios osmóticos uma vez que nos rios de água branca (WW) há uma grande quantidade de sedimentos, níveis de minerais e metais alcalinos dissolvidos baixos e pH neutro ou levemente acidificado (pH 6,3 – 7,0) enquanto que nos rios de água preta (BW) são pobres em íons, tem grande quantidade de matéria orgânica dissolvida e pH ácido, podendo atingir pH 3,0 – 4,0 (MORTATTI & PROBST, 2003; MATSUO & VAL, 2007). Segundo LOVEJOY & DE ARAUJO (2000) os rios de BW, devido à suas características físico e químicas, formam uma barreira hidrográfica contendo a dispersão de algumas espécies. Dentro desta hipótese observa-se um quadro diferente para duas espécies Osteoglossiformes estudadas. *Osteoglossum bicirrhosum*, conhecido popularmente como aruanã-pardo, é um respirador aquático obrigatório e que segundo (LOWE-MCCONNELL, 1964; KANAZAWA, 1966) têm distribuição preferencialmente em rios de WW, enquanto que *A. gigas*, conhecido popularmente como pirarucu é peixe endêmico da região Amazônica, sendo facilmente encontrado em toda bacia hidrográfica da região. Esta espécie apresenta respiração bimodal, ou seja, possui respiração aquática e aérea obrigatória em fases distintas de sua vida (GRAHAM, 1997), sendo que na primeira semana, após a eclosão dos ovos, essa espécie respira, exclusivamente, através das brânquias e este órgão é semelhante aquela dos peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática. Por outro lado, as brânquias dos animais grandes (>600g) não são mais capazes de obter O₂ suficiente para atender as necessidades metabólicas do animal, portanto, a maior absorção de O₂ ocorre através da bexiga natatória modificada. Deste modo há uma mudança progressiva nas funções branquiais de forma que na transição da fase de alevino à fase adulta há um remodelamento do epitélio branquial, as

brânquias estão relacionadas principalmente à regulação de íons (RAMOS, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2010). Diferentemente de *O. bicirrhosum*, que ocorre em WW, estudos utilizando marcadores genéticos sugerem que esta espécie compreende uma única e grande população panmítica em toda a bacia Amazônica (HRBEK *et al.*, 2005; HRBEK *et al.*, 2007) e deste modo pode ser inferido que a barreira hidrográfica formada por rios de água preta teria pouca ou nenhuma influência para esta espécie e a morfologia branquial pode ter contribuição significativa para estes animais otimizarem a sua regulação iônica em BW, pois como a morfologia branquial desta espécie é característica, o balanço do compromisso osmorespiratório é desviado para as funções osmorregulatórias em detrimento às trocas gasosas (RAMOS, 2008).

Tendo em vista que as espécies de Osteoglossiformes apresentam modos de respiração distintos, e também, no caso de *A. gigas* com massa corpórea (MC) ≥ 1000 g e ≤ 400 g, o objetivo do presente estudo foi o de investigar a morfologia funcional tanto de *A. gigas* em duas etapas distintas de desenvolvimento quanto de *O. bicirrhosum*, em exposição à WW e BW, analisando parâmetros referentes à quantidade, densidade e atividade das CRMs, participação das CMs e outras alterações na morfologia funcional nestas águas amazônicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aquisição e aclimação dos animais

O estudo foi realizado mediante autorização ambiental para coleta e transporte dos animais pelo IBAMA (licença nº17102-3, Anexo). Exemplares de *A. gigas* (n = 10, MC ≈200 g e n = 10, MC = ≈2000 g) foram adquiridos em pisciculturas da região próxima à Manaus e os exemplares de *O. bicirrhossum* (n = 10, MC = 5 g) foram coletados na natureza, na região de Barcelos, AM. Todos os animais foram transportados para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) e mantidos em viveiros escavados e abertos abastecidos com água de poço com aeração mecânica. Os animais foram alimentados “ad libitum” com ração comercial própria para piscicultura dessa espécie, produzida pela CPAQ (45% de proteína). Os animais foram mantidos nesse tanque durante trinta dias para aclimação e controle de doenças e parasitas.

Delineamento experimental e exposição às águas amazônicas

Após a aclimação de 30 dias nos viveiros do INPA, os animais foram separados em três tanques com capacidade de 500 L para aclimação as águas amazônicas, um tanque contendo água branca (grupo WW) coletada do rio Solimões, um tanque contendo água preta (grupo BW) coletada do rio Negro e um tanque contendo água dos viveiros (grupo C) nos quais os animais foram aclimatados e foi utilizada como controle. Para testar a influência do pH a água preta foi acidificada para pH 3,5, utilizando solução de ácido clorídrico.

A qualidade da água foi monitorada diariamente e renovada a cada 48 horas para todos os grupos. Os animais foram mantidos nestes tanques por um período de sete dias com renovação de água a cada 48h, sendo alimentados pelo menos quatro horas antes da renovação de água. O monitoramento da qualidade da água foi efetuado diariamente analisando os seguintes parâmetros: amônia (mg L^{-1}) e nitrito (mg L^{-1}) que foram determinados de acordo com VERDOUW *et al.* (1978) e BOYD (1979), respectivamente; dureza (mg L^{-1} de CaCO_3) e alcalinidade (mg L^{-1} de CaCO_3) de acordo com ADAD (1982) e (GOLTERMAN *et al.*, 1978), respectivamente; pH e condutividade (μS) foram determinados utilizando-se um pHmetro (YSI, modelo 60/10), o oxigênio dissolvido (DO, mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram mensurados usando um oxímetro (YSI, modelo 85/10) e, o dióxido de carbono dissolvido (DCO, mg L^{-1}) foi estimado pelo método de BOYD & TUCKER (1992).

Coleta de amostras e processamento para microscopia de luz e eletrônica de varredura

Após os sete dias de aclimação foi realizada morfometria dos animais, os mesmos foram sacrificados por lesão medular e os segundos arcos branquiais (Abs) foram removidos, lavados em solução fisiológica de NaCl 0,9%, e fixados em glutaraldeído 3%, tamponado em solução de fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4. Dos abs fixados, foram retiradas porções aleatórias dos filamentos branquiais e processadas para microscopia de luz, imunohistoquímica e eletrônica de varredura.

Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas

Amostras das brânquias contendo 4-5 filamentos fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7,4 foram desidratadas em série crescente em etanol (70 e 95%) e posteriormente incluídas em Histo-resina Leica®. Cortes seriados de 2 a 5 µm, sagitais ao filamento branquial, foram obtidos com micrótomo Micron®. Para a identificação das principais mucosubstâncias e tipos de células mucosas, os cortes foram corados com Alcian blue (AB) em pH 1,0 para a identificação de glicoproteínas sulfatadas, (LEV & SPICER, 1964) e em pH 2,5 para identificação de glicoproteínas ácidas (MOWRY, 1956; PEARSE, 1961), foi utilizado para a identificação de glicoproteínas neutras a técnica do ácido periódico Schiff (PAS) (MCMANUS, 1948). Os cortes foram observados em microscópio de luz Olympus-Micronal® CBA-K. A determinação da densidade de células mucosas no epitélio branquial foi efetuada em 20 campos aleatórios e não contínuos do epitélio do filamento (em cerca de 5 filamentos) e o registro das imagens foi realizado com uma câmera de vídeo acoplada a um computador que contém o software de captura de imagens Scope Photo 2.0.4. A incidência das CMs foi observada no arco (base dos filamentos), filamentos e lamelas e quanto sua ocorrência foi avaliada semi quantitativamente como 0 ausente, + raras, ++ pouco frequentes e +++ muito frequentes.

Análises imunohistoquímicas nas células ricas em mitocôndrias (CRMs)

Amostras de brânquias fixadas com solução de Bouin foram gradualmente desidratadas em álcool (70% -100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina histológica (INLAB). Cortes sagitais (8 µm), longitudinais ao filamento

branquial, foram obtidos com micrótomo Micron®. Os cortes foram submetidos à reação imunohistoquímica como descrito para esta espécie por RAMOS (2008), onde: a parafina dos cortes foi removida e estes foram colocados em solução de 1% H₂O₂ em metanol para remover a atividade das peroxidase endógenas; posteriormente, os cortes reidratados, lavados em tampão TRIS-salino e incubados com “Normal Goat Serum” (NGS) para bloquear ligações não específicas. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo α-5 anti Na/K-ATPase (IgGα5, desenvolvido pelo Dr. DOUGLAS FRAMBOUGH, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, USA) diluído 1:3000 em câmara úmida à 20°C “overnight”. Após lavagem com tampão, os cortes foram incubados com o segundo anticorpo (GAMPO – peroxidase-conjugatedgoatantimouse) diluído 1:100 em tampão Tris por 1h. O complexo anticorpo-antígeno foi visualizado utilizando DAB-Ni (3,3’diaminobenzidine, DAB e (NH₄)₂SO₄.NiSO₄.6H₂O, Sigma®). Controles negativos foram obtidos com a omissão do primeiro ou segundo anticorpo. As lâminas foram então desidratadas em etanol (50-100%) e diafanizadas em xilol e montadas com Entellan. A determinação da densidade das CRMs foi efetuada em microscópio de luz Olympus-Micronal® CBA-K com observação de 20 campos aleatórios e não contínuos dos filamentos branquiais à sua região aferente. O registro das imagens foi realizado com uma câmera de vídeo acoplada a um computador utilizando o software de captura de imagens Scope Photo 2.0.4.

Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% em 0,1M de solução de tampão fosfato pH 7,3 foram lavadas no mesmo tampão, em seguida foram tratadas para remoção

de muco com glicerol 16%. Posteriormente, foram desidratadas em solução crescente de etanol (30-100%). Em seguida foram passadas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (Aldrich) e, então, secas em temperatura ambiente. Após secagem, foram coladas com cola de prata (Degusa SA) em porta-amostra próprio para MEV, metalizadas (ouro 99 % - Metalizador MTEC CA7625) e as imagens do epitélio do filamento foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 em 25KV e as imagens foram obtidas e salvas em formato tif (Tagged Image File Format).

Freqüência, área apical e área fracional das células-cloreto e células mucosas

A área de superfície das CRMs expostas ao meio aquático, a área fracional dessas células (AFCRM) e sua densidade no epitélio do filamento branquial, região aferente, foi efetuada segundo BINDON *et al.* (1994), MORON *et al.* (2003) e FERNANDES *et al.* (2007), utilizando-se de electronmicrografias em um aumento de 3000x (em cinco campos não contínuos de cada amostra) com auxílio do software SigmaScan Pro 3.0 (JANDELL SCIENTIFIC Inc.) que foi utilizado para o delineamento do perímetro das células e área total da imagem. Esta análise refere-se à fração da área das células-cloreto por unidade de área do epitélio do filamento branquial sem considerar as microvilosidades, microssaliências ou depressões da superfície. A análise foi comparativa em relação à área do perímetro branquial de acordo com as seguintes equações:

$$\text{AFCRM} = [\sum \text{área de todas as CRMs}] / [\text{área da fotografia}]$$

$$\text{Densidade} = [\text{AFCRM}] / [\text{média da área das CRMs}]$$

Análises estatísticas

Para testar o efeito de *A. gigas* de diferentes tamanhos, peixes pequenos e grandes, foi utilizado o teste t de Student's, para dados com distribuição normal, ou o teste de Mann-Whitney, para dados com distribuição não-normal.

Para a determinação da significância das diferenças entre os grupos C, WW e BW, para *A. gigas* e *O. bicirrhosum*, foi aplicado o teste one-way ANOVA, para dados com distribuição normal, ou ANOVA onranks, para dados com distribuição não-normal. O teste pos hoc de Dunn foi utilizado e as diferenças de $p \leq 0.05$ foram consideradas como significativas. Os testes foram efetuados utilizando o software Sigmaplot® 11 e os dados estão apresentados como média \pm SEM.

RESULTADOS

Morfologia geral das brânquias de A. gigas e O. bicirrhosum

Nas observações em microscopia de luz, a reação histoquímica da fucsina básica evidenciou a morfologia geral das brânquias das espécies. As CPs, CRMs e células pilares do tecido branquial foram coradas em azul enquanto as CMs são coradas em avermelhadas. As brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum* se assemelham entre si, apresentam quatro pares de arcos branquiais de modo que de cada um partem duas fileiras de filamentos branquiais e as características gerais das brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum* estão apresentadas na Figura 01. A morfologia branquial de *O. bicirrhosum* é a típica de respiradores aquáticos obrigatórios, as suas lamelas são bem desenvolvidas e perpendiculares ao filamento branquial. As brânquias de *A. gigas* apresentaram morfologia distinta nos dois grupos analisados (Figura 01). Animais menores (≈ 200 g) têm lamelas respiratórias onde é possível observar um sistema de células pilares desenvolvido e uma barreira de difusão delgada. Nos animais grandes (≈ 2000 g) ocorre atrofia do sistema de células pilares e o espessamento do epitélio dos filamentos e lamelas e uma proliferação de CRMs e CMs.

Caracterização histoquímica das sub-populações de células mucosas

Nas brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum* foram identificadas CMs PAS positivas (PAS+) e Alcian Blue positivas (AB+) (Figura 02). Quanto à sua localização e incidência nos arcos branquiais, em *A. gigas* tanto ≈ 200 g quanto ≈ 2000 g as CMs

AB+ e PAS+ têm maior ocorrência na região dos arcos branquiais, seguida da região dos filamentos e estão praticamente ausentes nas lamelas. Em *A. gigas* ≈ 2000 g foi observado uma densidade significativamente maior destas células nos filamentos e lamelas. Em *O. bicirrhosum*, as CMs são pouco frequentes e localizadas predominantemente nas regiões dos arcos branquiais.

O número de CMs AB+ (pH 2,5 e 1,0) e PAS+ (Tabela II) em *A. gigas* grandes foi significativamente maior em relação aos animais menores nos animais do grupo C e WW, exceto no grupo BW. O número de CMs AB+ (pH 2,5 e 1,0) diminuiu nos grupos WW e BW em relação a C, tanto para peixes pequenos quanto para peixes grandes. A densidade de CMs PAS+ diminuiu no grupo BW. Em *O. bicirrhosum* células AB+ pH 2,5 aumentaram significativamente no grupo WW e diminuíram no grupo BW e as CMs AB+ pH 1,0 diminuíram em WW e BW, sendo neste último grupo o menor valor observado. As células PAS+ diminuíram significativamente nos grupos WW e BW em relação ao grupo C, entretanto no grupo WW a redução foi mais acentuada (Tabela II).

Quanto ao tipo de CM observada, foi registrado que em ambas as espécies e em todos os grupos, C, WW e BW, o tipo de CM mais frequente são as células PAS+ seguidas das CMs AB+ em pH 2,5 seguida das CMs AB+ em pH 1,0.

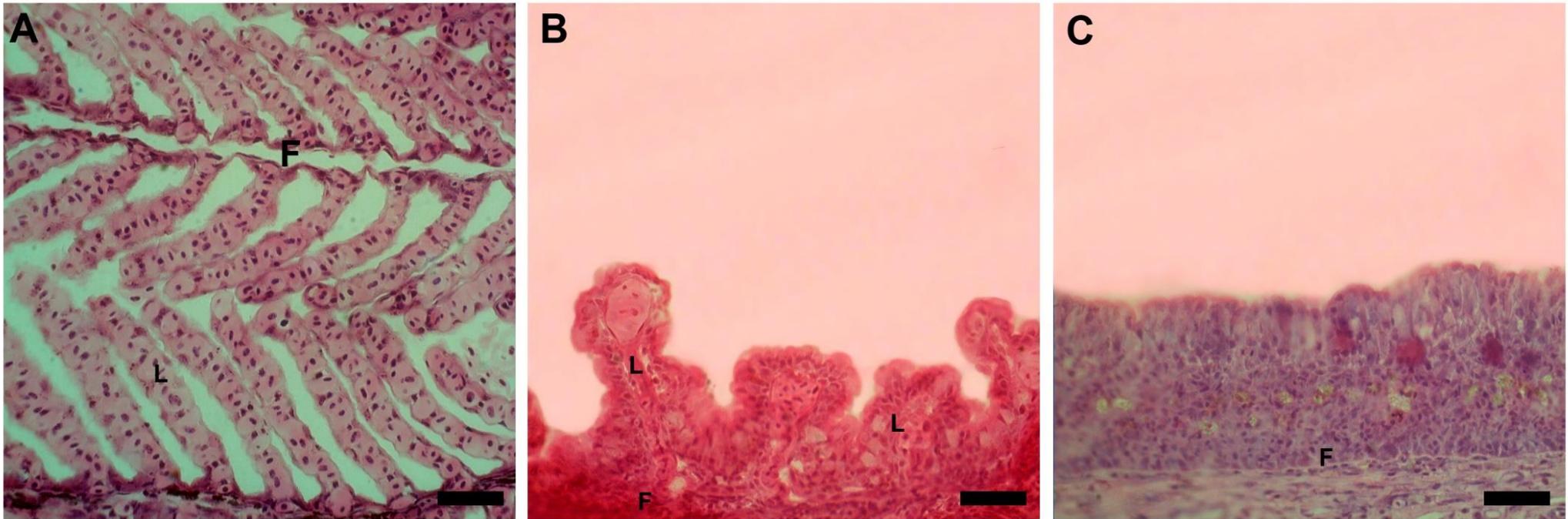


Figura 01: Morfologia branquial de *O. bicirrhosum* (A), *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) (B) e grandes (≈ 2000 g) (C). Note que os filamentos branquiais de *O. bicirrhosum* apresentam lamelas (L) bem evidentes, assim como exemplares pequenos de *A. gigas*. Nos exemplares grandes as lamelas estão inseridas no filamento branquial (F). Barra de escala: 40 μ m

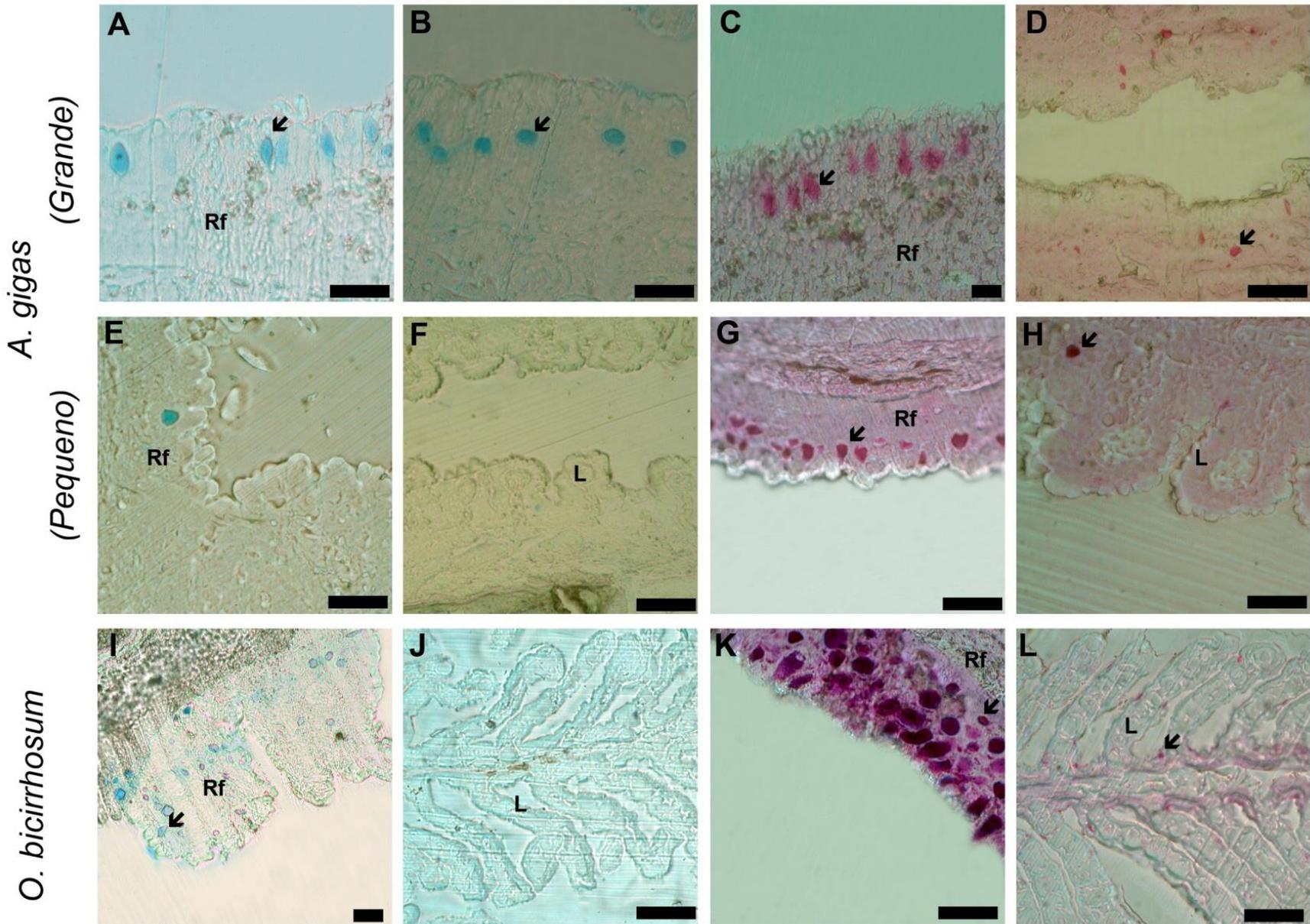


Figura 02: Celulas AB+ (pH 2,5) em azul e PAS+ em violeta (setas) As duas primeiras linhas correspondem à *A. gigas* ≈2000 g e ≈200 g, respectivamente e na última linha em *O. bicirrhosum*. Em A, C, E, G, I e K observa-se a região faríngea, que apresenta maior incidência de CMs AB+ e PAS+ e em B, D, F, H, J e L observam-se as lamelas (L), onde as CMs são raras. Barra de escala: 40 µm.

TABELA I – Incidência e Localização de Células Mucosas nas Brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*

	<i>A. gigas</i> (≈200g)			<i>A. gigas</i> (≈2000g)			<i>O. bicirrhosum</i>		
	ARCO	FILAMENTO	LAMELA	ARCO	FILAMENTO	LAMELA	ARCO	FILAMENTO	LAMELA
Alcian Blue pH 2,5	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+	+
Alcian Blue pH 1,0	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+	+
PAS	+++	+	+	+++	+++	+	+++	+	+

Incidência das CMs arco (base dos filamentos), filamentos e lamelas de modo que quanto sua ocorrência foi avaliada semi quantitativamente como 0 ausente, + raras, ++ pouco frequentes e +++ muito frequentes.

TABELA II – Densidade de células mucosas nas brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*, expostos à água branca e água preta

		C		WW		BW	
		<i>A. gigas</i>		<i>A. gigas</i>		<i>A. gigas</i>	
		≈200g	≈2000g	≈200g	≈2000g	≈200g	≈2000g
		<i>O. bicirrhosum</i>		<i>O. bicirrhosum</i>		<i>O. bicirrhosum</i>	
(nºcelsx10 ² /m	Alcian Blue pH 2,5	4,92±0,8 # 9,67±1,1	9,85±0,7	*3,23±1,2 # 5,09±1,0*	11,2±0,7*	*2,65±0,6 # 4,88±0,8*	7,6±0,9*
	Alcian Blue pH 1,0	2,85±0,7 # 5,02±0,9	7,2±0,8	*1,12±0,9 # 4,65±0,5*	5,6±0,9*	*1,16±0,8 # 3,86±0,5*	3,7±0,5*
	PAS	6,13±0,7 # 17,68±0,8	23,4±0,7	*3,74±0,8 # 16,17±0,9	14,6±0,7*	*5,08±0,8 5,15±0,9*	21,3±0,6*

*indica diferenças significativas ($p \leq 0,5$) de WW e BW contra o grupo C, e # entre *A. gigas* pequenos (≈200 g) e grandes (≈2000 g).

1 **Análises imunohistoquímicas nas células ricas em mitocôndrias**

2

3 Quanto à localização destas células, nos registros em microscopia óptica
4 (Figura 03), verificou-se que em exemplares de *A. gigas* ≈200 g e exemplares de *O.*
5 *bicirrhosum* as CRMs são encontradas na região dos filamentos branquiais,
6 principalmente na borda aferente do filamento e foram praticamente ausentes nas
7 regiões das lamelas respiratórias. Por outro lado os exemplares de *A. gigas* ≈2000 g
8 apresentaram uma morfologia branquial diferenciada em comparação aos padrões
9 observados em animais de ≈200 g e em *O. bicirrhosum*. Deste modo, a ocorrência
10 destas células foi em todo o epitélio branquial, sem distinção entre filamentos e
11 lamelas e assim como observado em *A. gigas* 200 g e *O. bicirrhosum*, as CRMs são
12 frequentemente observadas na borda aferente do filamento branquial.

13 As CRMs estão distribuídas no epitélio do filamento das duas espécies e podem
14 ser identificadas CRM claras (CRM_c – com imunomarcacão pouco intensa) e CRM
15 escuras (CRM_e - imunomarcacão muito intensa). Em *A. gigas* ≈200 g e ≈2000 g de
16 todos os grupos, C, WW e BW, houve diferenças significativas na densidade de CRMs
17 entre as duas faixas de massa corpórea (Figura 04). Nos animais do grupo C, *A. gigas*
18 ≈2000 g apresentaram valores mais elevados de CRMs claras, no grupo WW e
19 escuras no grupo C, os animais menores apresentaram valores mais elevados de
20 CRM_c e os maiores apresentaram valores mais elevados de CRM_e e no grupo BW,
21 os animais pequenos apresentaram valores elevados de CRM_e e CRM_c em relação
22 aos animais grandes (Fig. 04). Nas comparações entre os grupos, para *A. gigas*,
23 observou-se nas as células claras que animais pequenos apresentaram aumento
24 significativo nos grupos WW e BW sendo o grupo WW observado o valor mais

1 elevado. Nos animais grandes houve uma redução significativa do número de células
2 claras sendo que no grupo BW foi observado redução mais elevada. Em *O.*
3 *bicirrhosum* as CRMs apresentaram valores mais elevados apenas no grupo WW,
4 quase o dobro em relação ao grupo C. Nas observações das células escuras, em *A.*
5 *gigas* observou-se que nos animais pequenos houve um aumento significativo destas
6 células nos grupos WW e BW sendo que neste último foram observados os valores
7 mais elevados. Nos animais grandes observou-se que houve uma redução
8 significativa destas células nos grupos WW e BW de modo que neste último foram
9 observados os valores mais reduzidos. Em *O. bicirrhosum* foi observado um aumento
10 significativo destas células nos grupos WW e BW de modo que o grupo WW foi
11 ligeiramente mais elevado em relação ao grupo BW.

12

13

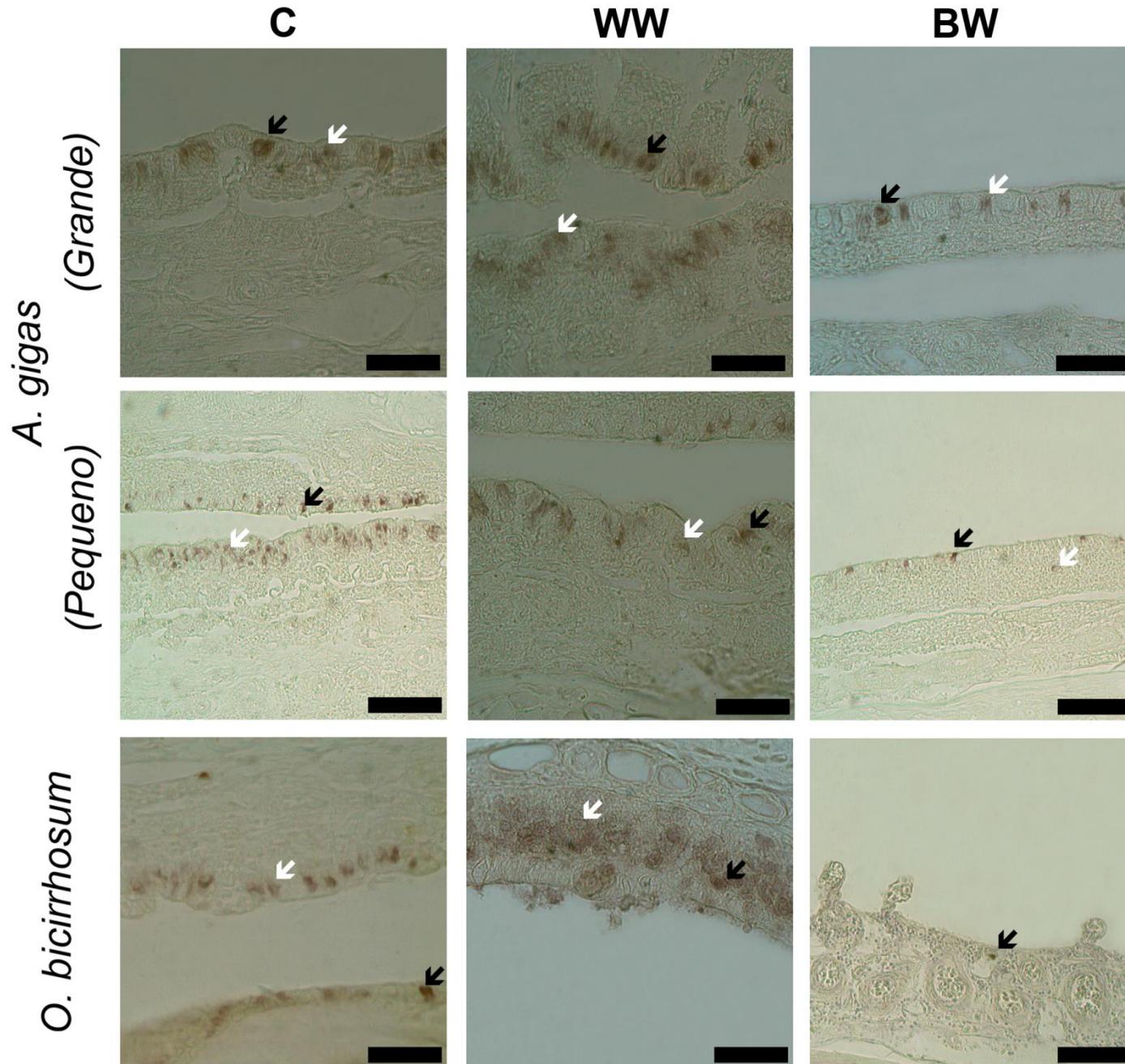


Figura 03: Células ricas em mitocôndrias (CRMs) imunomarcadas para a enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA), localizadas na borda aferente do filamento branquial de *A. gigas* grandes (≈ 2000 g) e pequenos (≈ 200 g) e de *O. bicirrhosum*.

Observa-se CRMs claras (setas brancas) que apresentaram fraca reação de imunomarcção e CRMs escuras (setas pretas) que apresentaram forte reação de imunomarcção.

Barra de escala: 40 μm

IMUNOHISTOQUÍMICA DE CRMs EM OSTEOGLOSSIFORMES EXPOSTOS ÀS ÁGUAS AMAZÔNICAS

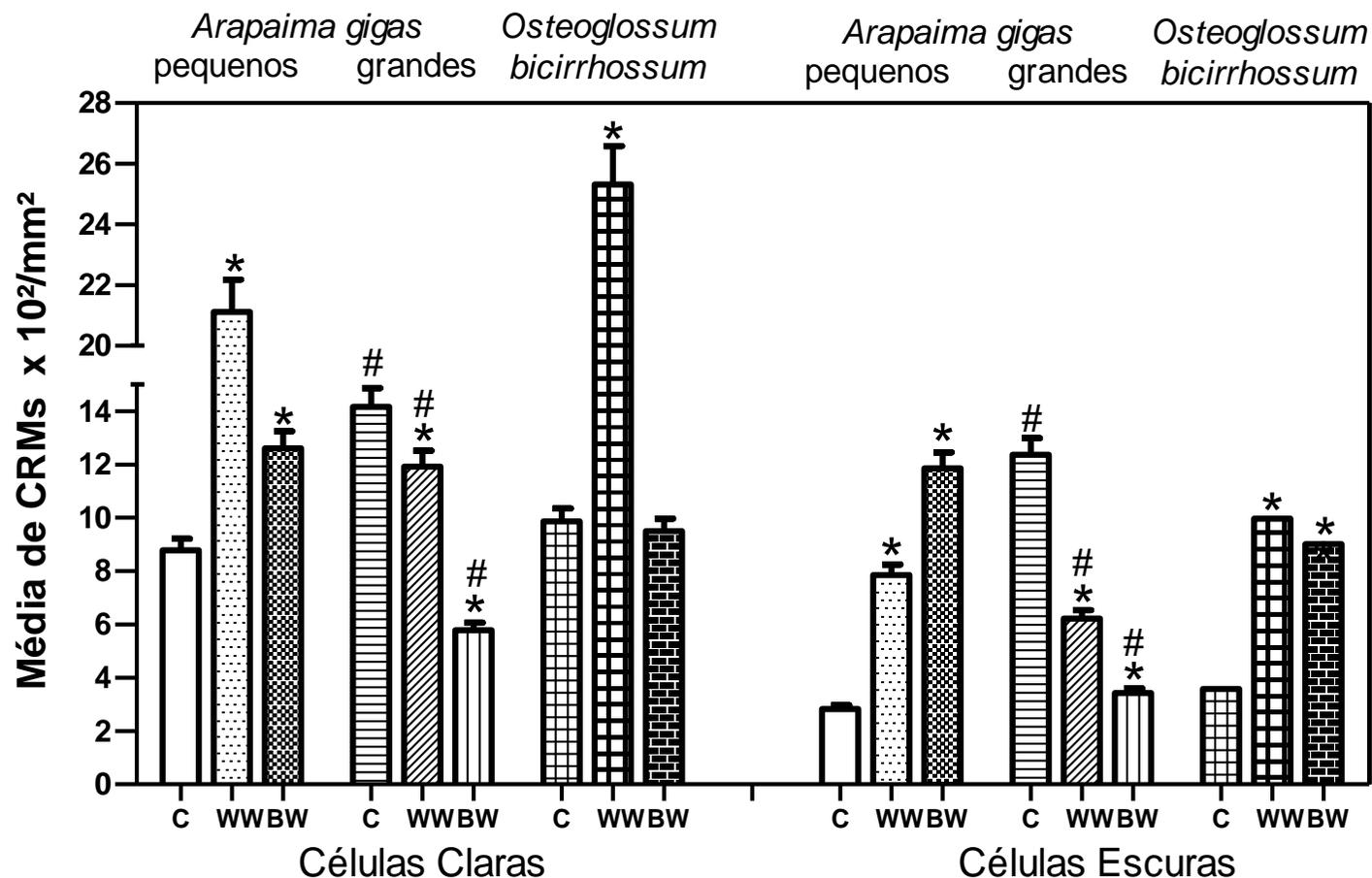


Figura 04: Células ricas em mitocôndrias (CRMs) imunomarcadas para a subunidade α -5 (*alfa five*) da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA). CRMs claras apresentam fraca imunoreatividade e células escuras têm forte reatividade marcação. * representa diferença significativa ($p \leq 0,5$) em relação ao grupo controle e a # representa diferenças significativas ($p \leq 0,5$) entre *A. gigas* pequenos (≈ 200 g) e grandes (≈ 2000 g).

1 **Morfologia da superfície do epitélio branquial**

2

3 Magnificações desta estrutura básica observada em microscopia de luz
4 revelaram característica ultraestruturais destas espécies, deste modo, verificou-se nos
5 exemplares *A. gigas* ≈ 2000 g uma morfologia branquial típica dessa espécie nesta
6 fase de desenvolvimento, observando-se a ausência das lamelas respiratórias e
7 apenas dobras na superfície epitelial, resquício das lamelas respiratórias, (Figura 05:
8 A). Em exemplares ≈ 200 g, as lamelas ainda estão presentes de modo que são mais
9 desenvolvidas na borda aferente (Figura 05: B). As brânquias de *O. bicirrhosum* se
10 assemelham as de exemplares de *A. gigas* com ≈ 200 g. As lamelas são desenvolvidas
11 e os animais apresentam maior desenvolvimento destas estruturas na borda aferente
12 (Figura 05: C).

13 Em todas as espécies observaram-se três principais tipos celulares em contato
14 com o ambiente externo, CPs, CMs e CRMs (Figura 06). As CPs, em *A. gigas*,
15 independentemente do tamanho, tem superfície irregular e convexa (Figura 07A e B).
16 A superfície apical possui microssaliências curtas com distribuição aleatória (Figuras
17 07: A e B). Em *O. bicirrhosum*, as CPs que revestem o epitélio branquial apresentam
18 uma superfície apical plana e o padrão formado pelas microssaliências é concêntrico
19 (Figura 07: C) mas os limites celulares apicais não são bem evidenciados.

20 As CMs são caracterizadas por formarem pequenas criptas entre CPs
21 adjacentes e, em geral, pode ser identificada a presença de muco sendo secretado.
22 Estas células são encontradas abaixo das CPs e o contato com a superfície consiste
23 de uma superfície muito restrita, em geral, inferior à das CRMs. As CRMs estão
24 localizadas principalmente na região aferente dos filamentos branquiais. Em

1 exemplares menores de *A. gigas* e de *O. bicirrhosum* estas células estão também na
2 região interlamelar. Nos exemplares maiores de *A. gigas* não há um padrão específico
3 de distribuição destas células de modo que estão distribuídas em todo o filamento e
4 são muito freqüentes.

5 Após a mensuração e cálculos para determinar a AFCRMs e a densidade das
6 CRMs, observou-se que a AFCRM de exemplares de *A. gigas* (2000 g) foi
7 significativamente elevada nos grupos C e WW (Fig. 08). Nas comparações entre os
8 grupos expostos foi observado que em *A. gigas* (≈ 200 g) houve um aumento
9 significativo da AFCRMs no grupo WW e BW. Nos exemplares maiores os valores de
10 AFCRMs foram mais elevados no grupo C, e significativamente mais baixos nos
11 grupos WW e BW. A densidade das CRMs nos filamentos de *A. gigas* menores foi
12 maior nos grupos C e WW do que nos maiores (Figura 09). Comparando os grupos
13 WW e BW contra o grupo C foi observado que em *A. gigas* com ≈ 200 g há um aumento
14 significativo da densidade das CRMs no grupo WW enquanto que em *A. gigas* com
15 ≈ 2000 g o grupo C e WW apresentaram valores mais elevados em relação à animais
16 com ≈ 200 g e no grupo BW houve uma redução significativa de aproximadamente
17 50% em relação aos grupos C e WW. Em *O. bicirrhosum* dos valores encontrados
18 para a AFCRMs e densidade das CRMs verificou-se que o grupo WW apresentou
19 valor significativamente elevados para a AFCRMs assim como para a densidade das
20 CRMs.

21



Figura 05: Morfologia do filamento branquial de *A. gigas* e *O. bicirrhosum*. Em “A”, os filamentos branquiais de *A. gigas* com ≈2000 g e em “B” de um exemplar com ≈200 g. Em “C” filamentos branquiais de *O. bicirrhosum*. Note que no exemplar ≈200 g de *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* as lamelas (L) estão presentes, enquanto que em um exemplar ≈2000 g de *A. gigas* as lamelas são identificadas como dobras na superfície epitelial.

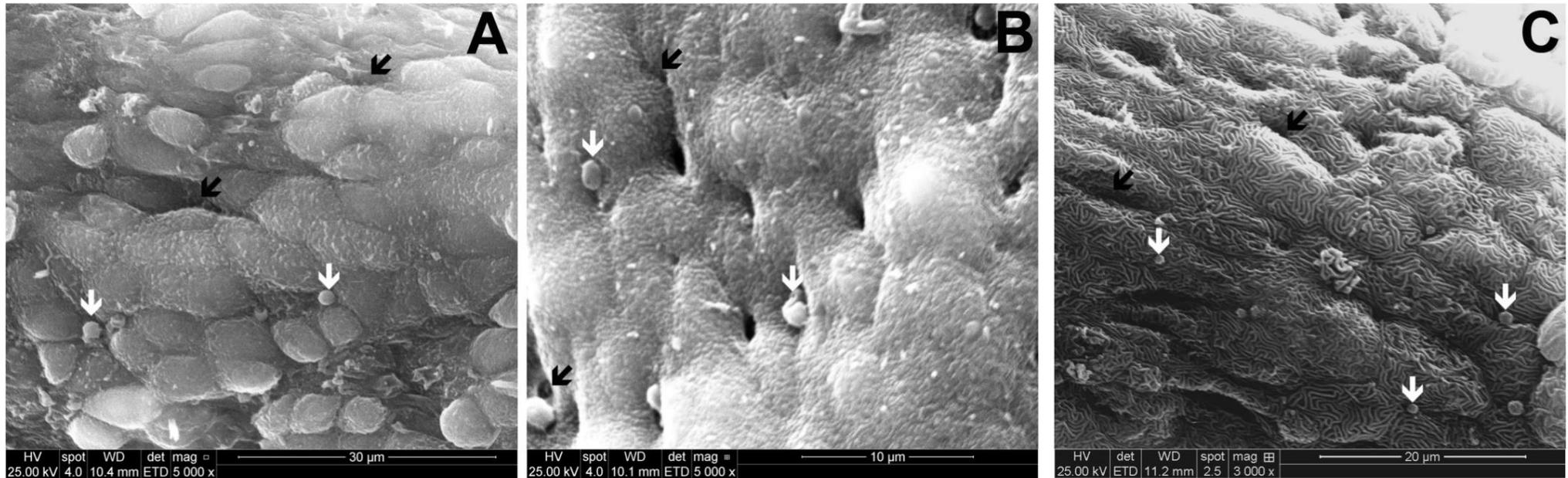


Figura 06: Detalhe da região aferente dos filamentos branquiais de *A. gigas* grandes (A), pequenos (B) e de *O. bicirrhosum*(C). Note indicado a presença de grande quantidade de células mucosas (CMs) (setas brancas) e as células ricas em mitocôndrias (CRMs) (setas pretas) que em todas as espécies se apresentaram como criptas no epitélio branquial.

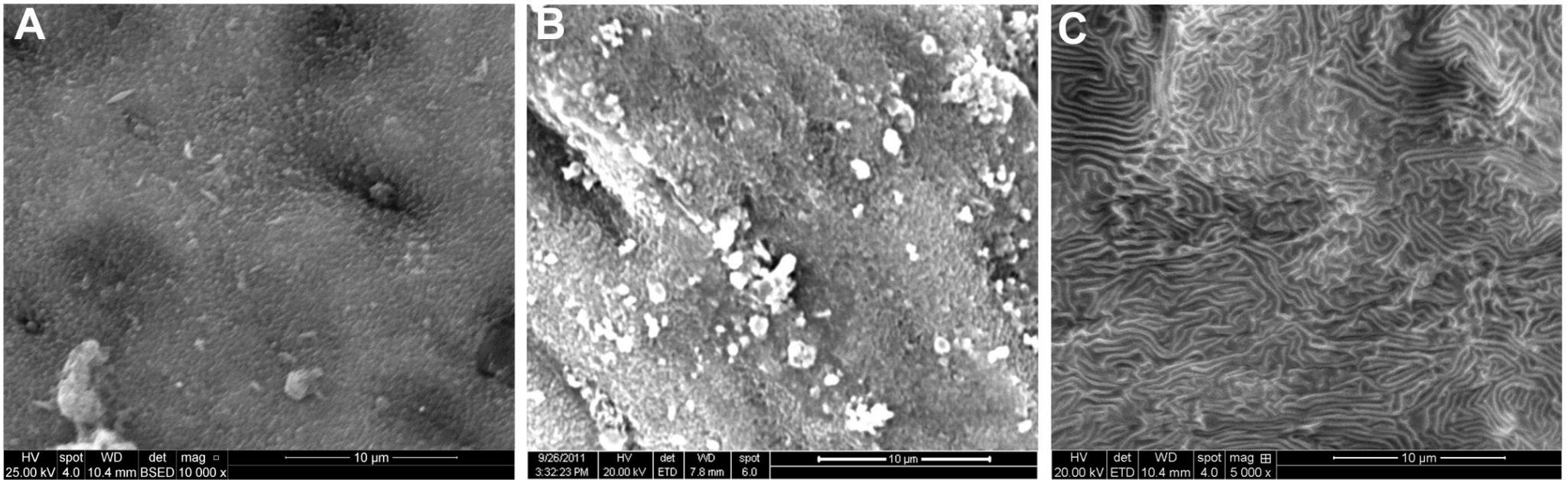


Figura 07: Epitélio branquial de exemplares de *A. gigas* ≈2000 g (A), ≈200 g (B) e de *O. bicirrhosum* (C). Note epitélio irregular e padrão de microsaliências aleatório em *A. gigas*. Em *O. bicirrhosum* o padrão de organização das microcriptas é concêntrico e a superfície apical das células é plano.

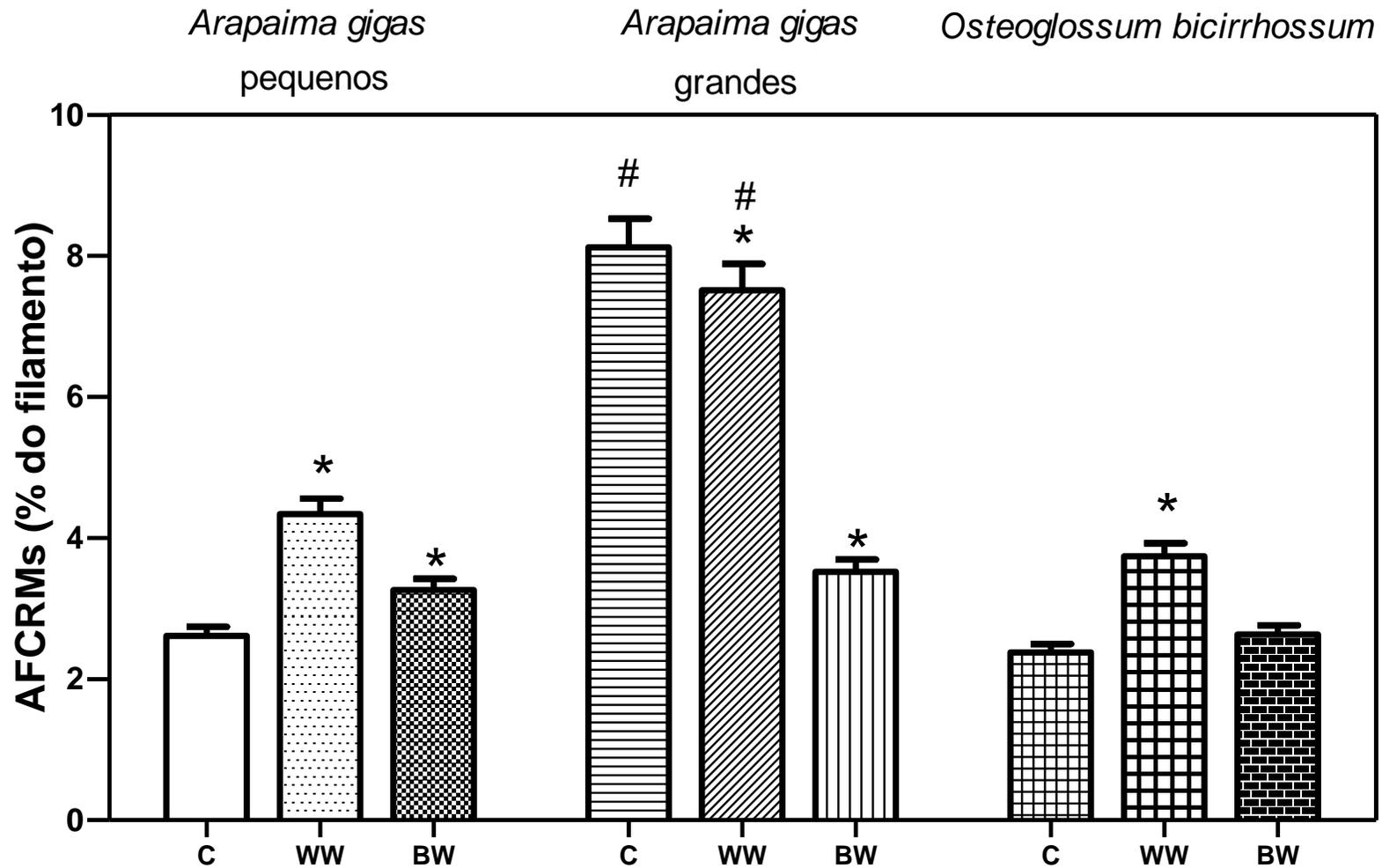


Figura 08: Área fracional das células ricas em mitocôndrias (AFCRMs) em *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* expostos à água branca (WW) e água preta (W). * indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) dos grupos WW e BW em relação ao grupo C e # indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) entre exemplares pequenos e grandes de *A. gigas*.

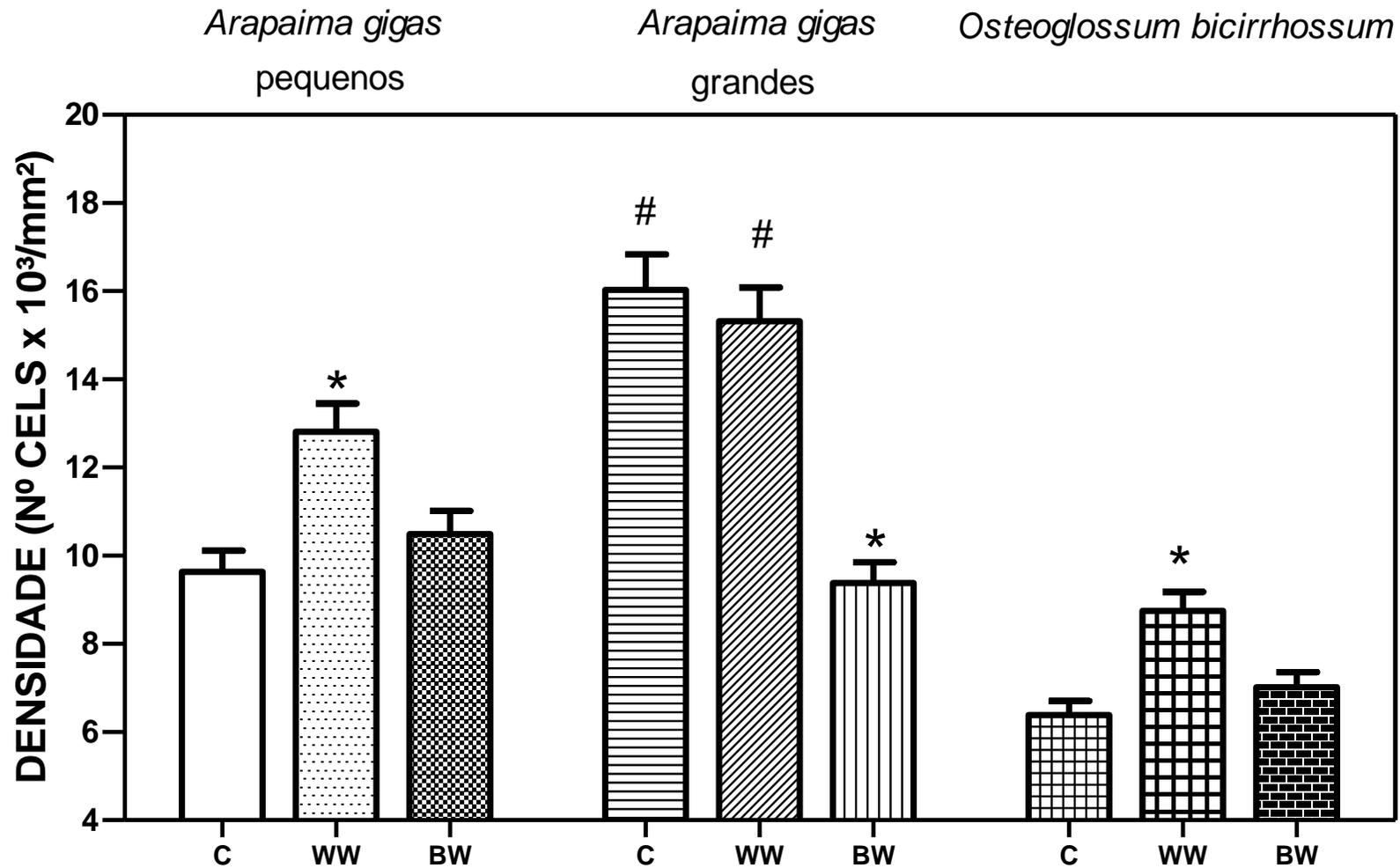


Figura 09: Densidade de células ricas em mitocôndrias em *A. gigas* e em *O. bicirrhosum* expostos à água branca (WW) e água preta (W). * indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) dos grupos WW e BW em relação ao grupo C e # indica diferença significativa ($p \leq 0,5$) entre exemplares pequenos e grandes de *A. gigas*.

DISCUSSÃO

A morfologia branquial dos peixes é altamente adaptada às trocas gasosas através de uma pequena barreira de difusão de gases, que aperfeiçoa o processo de trocas gasosas, permite que haja uma tendência natural de perdas de íons, que por sua vez é minimizada através da proliferação de células-cloreto, de forma que há um comprometimento entre as trocas gasosas e a regulação iônica, definido por NILSSON (1986) como compromisso osmorrespiratório. Deste modo os peixes apresentam uma plasticidade da estrutura branquial que segundo SARDELLA & BRAUNER (2007) pode ser classificada em alterações reversíveis e alterações irreversíveis. Um exemplo de alteração irreversível é a que ocorre em *A. gigas* na transição da respiração aquática para a respiração aérea (BRAUNER (BRAUNER *et al.*, 2004; RAMOS, 2008) e um exemplo de alteração reversível é o desenvolvimento de lamelas para otimizar as trocas gasosas (SOLLID *et al.*, 2003; SOLLID *et al.*, 2005; SOLLID & NILSSON, 2006) ou o aumento da barreira de difusão através de proliferação de CRMs (SAKURAGUI *et al.*, 2003).

Tendo em vista que as águas da Bacia Amazônica apresentam diferentes desafios osmóticos aos peixes, podendo até mesmo interferir em padrões de distribuição das espécies, como as do presente estudo, as alterações no compromisso osmorrespiratório devem envolver ajustes para uma adaptação em peixes que ocorrem em WW e BW. De acordo com a literatura os peixes que habitam BW apresentam duas estratégias para a manutenção do equilíbrio iônico; a primeira estratégia consiste em uma alta capacidade de transporte iônico e uma alta afinidade das proteínas de transporte por seus osmólitos que em BW é extremamente eficiente (GONZALEZ *et al.*, 1997; GONZALEZ & WILSON, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2002). A

outra estratégia (GONZALEZ & WILSON, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2005) consiste em uma baixa capacidade de transporte de íons e uma baixa afinidade das proteínas transportadoras por seus osmólitos de modo que pode ser completamente inibida em pH baixo (4,0).

As espécies de Osteoglossiformes utilizadas no presente estudo apresentam padrões de distribuição distintos (LOWE-MCCONNELL, 1964; KANAZAWA, 1966) e como *A. gigas* poderia ter ocorrência em rios de água preta, formando uma única população Panmítica (HRBEK *et al.*, 2005) esta espécie pode não ser influenciada pela barreira hidrográfica formada por rios de BW (LOVEJOY & DE ARAUJO, 2000; HUBERT & RENNO, 2006; WILLIS *et al.*, 2007) pois a microscopia óptica revelou a morfologia branquial distinta em duas etapas de desenvolvimento de *A. gigas*, corroborando observações em estudos anteriores (BRAUNER *et al.*, 2004; RAMOS, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2010). *A. gigas* ≈200 g apresentam ainda lamelas respiratória com uma barreira de difusão de gases delgada e conseqüentemente as perdas iônicas nestes animais são mais acentuadas e em *A. gigas* ≈2000 g as lamelas estão embebidas por células do epitélio do filamento, originadas de uma intensa proliferação celular que ocorre a partir de ≈400 g (RAMOS, 2008). Uma das causas da ausência de lamelas funcionais em animais grandes pode ser explicada pelo surgimento do modo de respiração aérea, que ocorre através da bexiga natatória, que é modificada (GRAHAM, 1997). Considerando que as brânquias nestes animais diminuem ou anulam a tomada de O₂ o compromisso osmorrespiratório seria deslocado para funções de regulação iônica, equilíbrio ácido-base e liberação de produtos nitrogenados e liberação de CO₂ na forma de bicarbonato (BRAUNER & VAL, 1996).

No presente estudo este deslocamento do compromisso osmorrespiratório em *A. gigas* é observado tanto com base nos dados da imunohistoquímica para marcação da enzima NKA quanto nos dados morfométricos de AFCRMs e densidade de CRMs que claramente sugerem que as brânquias de animais grandes têm participação nos processos de regulação de íons, conforme discutido adiante.

Nas análises de imunomarcação da subunidade $\alpha 5$ da bomba NKA observou-se que o número de células claras e escuras inumoreativas foi menor em *A. gigas* com ≈ 2000 g expostos à WW e BW e provavelmente este resultado ocorre devido a uma diminuição das perdas iônicas para o meio, que pode ser reflexo do aumento da barreira de difusão de gases observadas nestes animais (COSTA *et al.*, 2007; RAMOS, 2008). Apesar dos resultados para imunomarcação da NKA de CRMs indicar que *A. gigas* ≈ 200 g apresentam uma maior incidências destas proteínas de membrana, contrastando com este resultado a AFCRMs e a sua densidade foi maior em *A. gigas* ≈ 2000 g. A intensidade da imunomarcação reflete o grau de atividade da NKA nestas células e a AFCRMs e densidade é indicativo do percentual em contato com o meio externo e a ocorrência destas células no filamento. Uma possível explicação para esta divergência nos resultados pode ser explicada pelo fato de que uma grande área de contato com o meio e uma grande densidade destas células acarreta em baixa atividade da NKA devido à disponibilidade destas células e da redução das perdas iônicas em *A. gigas* ≈ 2000 g, conforme discutido no Cap. 1. Deve-se ser levado em consideração, também, que as CRMs além da NKA (localizada na membrana basolateral) apresentam outras proteínas envolvidas com o transporte de íons (HIROSE *et al.*, 2003) como trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que participam da liberação do CO_2 para o meio aquático, bombas eletrogênicas do tipo V-ATPase (apicais e

basolaterais) que participam do equilíbrio ácido-base, efetuando o transporte de H^+ , trocadores Na^+/H^+ que regulam os níveis de Na^+ intra e extracelulares e transportadores de Ca^{++} como a bomba Ca^{++} -ATPase e o trocador $Ca^{++}/3Na^+$, responsáveis pela absorção de Ca^{++} . Desse modo pode-se inferir que as CRMs de *A. gigas* ≈ 2000 g podem apresentar atividade acentuada destas proteínas, em relação à NKA.

Apesar das brânquias de *A. gigas* apresentarem CRMs com elevada imunoreatividade, segundo GONZALEZ *et al.* (2010) em *A. gigas* pequenos (≈ 67 g) a atividade da NKA branquial é 75% menor que a atividade renal e em *A. gigas* grandes (≈ 700 g) a atividade NKA branquial é 4 vezes menor que a atividade renal. Os dados dos autores também sugerem um envolvimento das brânquias de animais grandes (>700 g) com funções íon-regulatórias mas deve ser considerado, também que a atividade íon-regulatória dos rins têm papel fundamental na dispersão da espécie anulando o efeito da barreira hidrográfica formada por BW. Em *O. bicirrhosum* essa situação não deve ocorrer pois o rim desta espécie é cerca de 3,5 vezes menor que o rim de *A. gigas* (HOCHACHKA *et al.*, 1978).

Na espécie *O. bicirrhosum*, dos dados analisados para a imunomarcção da NKA, AFCRMs e densidade, observou-se similaridade aos resultados obtidos em *A. gigas* com ≈ 200 g, de modo que estes parâmetros foram acentuadamente maiores em exposição à WW, indicando que nestas águas as CRMs têm atividade mais acentuada. Este resultado corrobora as observações do Cap. 1 onde verificou-se maior efluxo de íons em exposição à BW. Nas investigações sob microscopia de luz e microscopia eletrônica registrou-se que a estrutura morfológica das brânquias de *O. bicirrhosum* é típica de respiradores aquáticos obrigatórios, ou seja, semelhante à

exemplares de *A. gigas* com ≈ 200 g. Deste modo, assim como *A. gigas* ≈ 200 g, na espécie *O. bicirrhosum* foi observada na borda aferente uma grande quantidade de CRMs e os dados de imunoreatividade para a NKA mostraram grande quantidade de células claras em WW e a AFCRMs e densidade foi baixa. Como as células claras indicam um nível de atividade baixo, pode-se inferir que a espécie mantenha um turnover de CRMs e estas células podem estar em estágios precoces ou tardios de maturação ou, ainda, estar participando do transporte de outros osmólitos (HIROSE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2005). Quanto à localização das CRMs, assim como em *A. gigas*, na espécie *O. bicirrhosum* foi registrado a presença destas células frequentemente na borda aferente. A localização destas células é vantajosa, pois recebe a água imediatamente após sua passagem pelas lamelas e antes de sua eliminação pelo opérculo e deste modo reabsorve os íons perdidos pela barreira de difusão de gases e elimina diretamente os compostos nitrogenados para o meio externo (HUGHES & MORGAN, 1973; HUGHES, 1984; EVANS *et al.*, 2005).

Ainda na análise morfológica do epitélio branquial de *A. gigas*, observando as CPs, verificou-se que estas células possuem microssaliências curtas, do mesmo modo descrito por RAMOS (2008). O padrão das microssaliências geralmente é diferente de uma espécie para outra (HUGHES & WRIGHT, 1970; OJHA *et al.*, 1987; MORON *et al.*, 2003). Enquanto em *A. gigas* as microssaliências são morfológicamente semelhantes àquelas encontradas em *Oncorhynchus mykiss* (OLSON & FROMM, 1973), *Mugil platanus* e *M. curema* (EIRAS-STOFELLA *et al.*, 2001), em *O. bicirrhosum* o padrão concêntrico das microssaliências é semelhante à *Fundulus heteroclitus* (HOSSLER *et al.*, 1985) e *Odontesthes bonariensis* (VIGLIANO *et al.*, 2006). Contrastando com as observações nas microssaliências neste estudo, tanto em *A. gigas* quanto para *O. bicirrhosum*, DUNCAN *et al.* (2010) observaram

padrões de microssaliências distintos em arraiais do rio Negro (geralmente microssaliências curtas e com uma borda apical bem definida) de modo que as microssaliências podem não ter influência ou alterações em WW e BW. Alterações no padrão das microssaliências do filamento e/ou lamelas em uma mesma espécie podem ser causadas por mudanças na temperatura ou salinidade (FERRI, 1982; 1983; AVELLA *et al.*, 1993) e exposição a poluentes (MAZON *et al.*, 2002; PAULINO *et al.*, 2011). A literatura cita que as microssaliências podem representar uma expansão da área de superfície no epitélio de trocas e criar um fluxo de água sobre as células mais lento de forma a otimizar as trocas gasosas (KENDALL & DALE, 1979), entretanto deve-se levar em consideração que as CPs são recobertas por um glicocálix e uma fina camada de muco que fica retida entre as microssaliências de modo que estas formariam microcanais que auxiliam na retenção do muco liberado pelas CMs (SPERRY & WASSERSUG, 1976; OJHA *et al.*, 1987).

O muco que recobre o epitélio branquial tem uma função de proteção do epitélio contra atrito ou choques mecânicos de partículas, prevenção contra infecções causadas por bactérias e fungos, proteção contra ataques de parasitas e atração de íons que favoreceriam as trocas iônicas (HUGHES & WRIGHT, 1970; SHEPHARD, 1982; 1994; VARSAMOS *et al.*, 2005; MORON *et al.*, 2009). Essa camada de muco pode ter um importante papel nas brânquias de *A. gigas* e *O. bicirrhosum* pois estariam relacionadas à formação de um gradiente de íons próximo a superfície do epitélio e das técnicas citoquímicas empregadas no presente estudo as CMs observadas sintetizam mucosubstâncias de caráter ácido e neutro (reação com Alcian blue e PAS, respectivamente). As células Alcian Blue positivas apresentam glicosaminoglicanos (GAGs) corados em azul identificando radicais carboxilados em pH de 2,5 e sulfatados em pH de 0,5 e 1,0 (LEV & SPICER, 1964). Os GAGs ácidos podem prevenir a

proliferação de microrganismos patogênicos na superfície epitelial (MITTAL & MITTAL, 2008; KUMARI *et al.*, 2009), entretanto no presente estudo não foi observado infestação por parasitas nos animais, além do fato de que no período de aclimatação houve controle na sanidade dos animais antes de expô-los aos protocolos experimentais. Deste modo os resultados observados, número de CMs AB + inferior ao observado em CMs PAS + é esperado. As CMs PAS+ contem mucosubstâncias neutras como hexoses e resíduos de ácidos siálicos. A literatura sugere que estas substâncias neutras podem estar associadas à proteção e lubrificação do epitélio branquial contra o atrito (SIBBING & URIBE, 1984). Frequentemente observa-se aumento ou diminuição na densidade de população de células mucosas presente nas brânquias como respostas à patógenos ou frente à alterações no meio ao qual o peixe está inserido (HANDY *et al.*, 1989; PAULINO *et al.*, 2011). De acordo com HANDY & EDDY (1991), o muco que recobre o epitélio branquial dos peixes de água doce apresenta elevada concentração de Na⁺ e Cl⁻ em relação à água circundante. Neste caso, o papel do muco é contribuir efetivamente nos processos de ajuste e transporte de íons de modo que auxilia na retenção destes íons pelo animal. Ainda, segundo (VARSAMOS *et al.*, 2005), as CMs podem influenciar na regulação iônica devido às cargas elétricas presentes no muco que poderiam atrair íons, facilitando assim sua absorção pelas CRMs (POWELL *et al.*, 1994). A secreção de muco com estas funções também seria uma estratégia que as espécies utilizam em ambientes de água preta, sobretudo exemplares menores de *A. gigas* e de *O. bicirrhossum*, que estariam sujeitos à perdas de íons. Além disso, diversos estudos (WOOD *et al.*, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2005; STEINBERG *et al.*, 2006; MATSUO & VAL, 2007) relatam que as substâncias húmicas dissolvidas na água preta contribuem para a prevenção de perdas iônicas.

CONCLUSÃO

O presente estudo corrobora os dados de marcadores moleculares para a distribuição Panamazonica da espécie *A. gigas* e sugere que o remodelamento do epitélio branquial com espessamento da barreira de difusão de gases diminui a influência do caráter ácido e pobre em íons de BW. Por outro lado *O. bicirrhossum* pode não apresentar uma osmorregulação eficiente em BW pois apesar de apresentar AFCRMs e densidade de CRMs similares à de *A. gigas* as CRMs imunomarcadas apresentam pouca reatividade ao anticorpo além de que na espécie *A. gigas* o rim têm papel fundamental para a regulação iônica. Deste modo, a barreira hidrográfica imposta pelos rios de BW podem exercer funções de isolamento dispersivo para a espécie. A secreção de muco nas brânquias também pode auxiliar na função osmorregulatória e é mais acentuada em BW e poderia explicar a baixa ocorrência de CRMs nestas águas, pois o muco seria uma ferramenta para minimizar as perdas de íons e facilitar sua absorção.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 ADAD, J. M. T. **Controle químico de qualidade**. Guanabara, 204pp. 1982.

4
5 AVELLA, M.; BERHAUT, J.; BORNANCIN, M. Salinity tolerance of two tropical fishes,
6 *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological
7 changes in the gill epithelium. **Journal of Fish Biology**, v. 42, p. 243-254,
8 1993.

9
10 BINDON, S. D.; FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. Branchial chloride cell proliferation in
11 the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: implications for gas transfer.
12 **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 8, p. 1395-1402, 1994.

13
14 BOYD, C. E. **Water quality in warmwater fish ponds**. Auburn University, Agricultural
15 Experiment Station Auburn, Alabama, 359pp., 1979.

16
17 BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Water quality and pond soil analyses for**
18 **aquaculture**. Alabama: Auburn University, 190pp., 1992.

19
20 BRAUNER, C. J.; MATEY, V.; WILSON, J. M.; BERNIER, N. J.; VAL, A. L. Transition
21 in organ function during the evolution of air-breathing; insights from
22 *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. **Journal**
23 **of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1433-1438, 2004.

- 1 BRAUNER, C. J.; VAL, A. L. The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the
2 obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather,
3 *Lipossarcus pardalis*. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F., et al (Ed.).
4 **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**: Inpa, p.101-
5 109, 1996.
- 6
- 7 COSTA, O. T. F.; PEDRETTI, A. C. E.; SCHMITZ, A.; PERRY, S. F.; FERNANDES,
8 M. N. Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish
9 gills in vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 225, n. 1, p. 1-9, 2007.
- 10
- 11 DUNCAN, W. P.; DA COSTA, O. T. F.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N.
12 Functional morphology of the gill in amazonian freshwater stingrays
13 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): implications for adaptation to
14 freshwater. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 1, p. 19-32,
15 2010.
- 16
- 17 EIRAS-STOFELLA, D. R.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FANTA, E.; CASAGRANDE-
18 VIANNA, A. C. Surface ultrastructure of the gills of the mullets *Mugil curema*,
19 *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces). **Journal of Morphology**, v.
20 247, n. 2, p. 122-133, 2001.
- 21
- 22 EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill:
23 Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation,
24 and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1,
25 p. 97-177, 2005.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

FERNANDES, M. N.; MORON, S. E.; SAKURAGUI, M. M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: FERNANDES, M. N.; GLOSS, M. L., et al (Ed.). **Fish Respiration and Environment**. Enfield: Science Publisher, p.93-120. 2007.

FERRI, S. Temperature induced transformation of teleost (*Pimelodus maculatus*) epidermal cells. **Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch**, v. 128, n. 5, p. 712, 1982.

FERRI, S. Modification of microridge pattern in teleost (*Pimelodus maculatus*) epidermal cells induced by NaCl. **Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch**, v. 129, n. 3, p. 325-329, 1983.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHMSTAD, M. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. **IBP Handbook**, v. 8, p. 215, 1978.

GONZALEZ, R. J.; BRAUNER, C. J.; WANG, Y. X.; RICHARDS, J. G.; PATRICK, M. L.; XI, W.; MATEY, V.; VAL, A. L. Impact of ontogenetic changes in branchial morphology on gill function in *Arapaima gigas*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 83, n. 2, p. 322-332, 2010.

GONZALEZ, R. J.; DALTON, V. M.; PATRICK, M. L. Ion regulation in ion-poor acidic water by the blackskirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*), a fish native to the

- 1 Amazon River. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 70, n. 4, p.
2 428-435, 1997.
- 3
- 4 GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native
5 to the ion-poor, acidic Rio Negro. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 6, p.
6 1680-1690, 2001.
- 7
- 8 GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; WOOD, C. M. Ionoregulation in Tropical Fishes
9 from Ion-Poor, Acidic Blackwaters. In: IVAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.,
10 et al (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes: Fish Physiology Series**,
11 v.16, p.397-442. 2005.
- 12
- 13 GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; WOOD, C. M.; PATRICK, M. L.; VAL, A. L. Diverse
14 strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio
15 Negro. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, n. 1, p. 37-47,
16 2002.
- 17
- 18 GRAHAM, J. B. **Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation.**
19 Academic Press San Diego, California, 299pp., 1997.
- 20
- 21 HANDY, R.; EDDY, F. The absence of mucus on the secondary lamellae of unstressed
22 rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Biology**,
23 v. 38, n. 1, p. 153-155, 1991.
- 24

- 1 HANDY, R. D.; EDDY, F. B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role
2 of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminium and zinc toxicity. **Journal of**
3 **Fish Biology**, v. 35, n. 5, p. 737-747, 1989.
4
- 5 HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major
6 components of chloride cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**
7 **Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 4, p. 593-620,
8 2003.
9
- 10 HOCHACHKA, P. W.; MOON, T. W.; BAILEY, J.; HULBERT, W. C. The osteoglossid
11 kidney: correlations of structure, function, and metabolism with transition to
12 air breathing. **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 4, p. 820-832, 1978.
13
- 14 HOSSLER, F. E. Gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. III. Rate of response to salinity
15 change. **American Physiological Society**, v. 238, n. 3, p. R160-R164,
16 1980.
17
- 18 HOSSLER, F. E.; MUSIL, G.; KARNAKY JR., K. J.; EPSTEIN, F. H. Surface
19 ultrastructure of the gill arch of the killifish, *Fundulus heteroclitus*, from
20 sewer and freshwater, with special reference to the morphology of apical
21 crypts of chloride cells. **Journal of Morphology**, v. 185, n. 3, p. 377-386,
22 1985.
23

- 1 HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. Conservation strategies for *Arapaima gigas*
 2 (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian Journal of**
 3 **Biology**, v. 67, n. 4, p. 909-917, 2007.
- 4
- 5 HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R.; MEYER, A.
 6 Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater
 7 fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal**
 8 **Conservation**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 2005.
- 9
- 10 HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater
 11 fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, 2006.
- 12
- 13 HUGHES, G. M. Morphometrics of fish gills. **Respiration Physiology**, v. 14, n. 1-2, p.
 14 1-25, 1972.
- 15
- 16 HUGHES, G. M. General Anatomy of the Gills. In: W.S., H. e D.J., R. (Ed.). **Fish**
 17 **physiology**, v.10, p.1-72, 1984.
- 18
- 19 HUGHES, G. M.; MORGAN, M. The structure of fish gills in relation to their respiratory
 20 function. **Biological reviews**, v. 48, n. 3, p. 419-475, 1973.
- 21
- 22 HUGHES, G. M.; WRIGHT, D. E. A comparative study of the ultrastructure of the water-
 23 blood pathway in the secondary lamellae of teleost and elasmobranch
 24 fishes—benthic forms. **Cell & Tissue Research**, v. 104, n. 4, p. 478-493,
 25 1970.

1

2 KANAZAWA, R. H. The fishes of the genus *Osteoglossum* with a description of a new
3 species from the Rio Negro. **Ichthyologica**, v. 37, n. 4, p. 161-172, 1966.

4

5 KENDALL, M. W.; DALE, J. E. Scanning and transmission electron microscopic
6 observations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gill. **Journal of the
7 Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, n. 9, p. 1072-1079, 1979.

8

9 KUMARI, U.; YASHPAL, M.; MITTAL, S.; MITTAL, A. K. Histochemical analysis of
10 glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita*
11 (Siluriformes, Bagridae). **Tissue and Cell Research**, v. 41, n. 4, p. 271-
12 280, 2009.

13

14 LEV, R.; SPICER, S. S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH.
15 **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 12, n. 4, p. 309, 1964.

16

17 LOVEJOY, N.; DE ARAUJO, M. Molecular systematics, biogeography and population
18 structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus
19 *Potamorrhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

20

21 LOWE-MCCONNELL, R. H. The fishes of the Rupununi savanna district of British
22 Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and
23 effects of the seasonal cycle on the fish. **Journal of the Linnean Society
24 (Zoology)**, v. 45, n. 304, p. 103-144, 1964.

25

- 1 MATSUO, A. Y. O.; VAL, A. L. Acclimation to humic substances prevents whole body
 2 sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal
 3 tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH.
 4 **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 4, p. 989-1000, 2007.
- 5
- 6 MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes
 7 induced by cooper exposure in the South American tropical freshwater fish
 8 *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, v. A, n. 88, p. 52-63, 2002.
- 9
- 10 MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Biotechnic**
 11 **& Histochemistry**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.
- 12
- 13 MITTAL, S.; MITTAL, A. Glycoproteins in the epithelium of lips and associated
 14 structures of a hill stream fish *Garra lamta* (Cyprinidae, Cypriniformes): a
 15 histochemical investigation. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 37, n.
 16 2, p. 101-113, 2008.
- 17
- 18 MORON, S. E.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Response of mucous cells of
 19 the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus*
 20 *unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo-and hyper-osmotic ion
 21 stress. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 491-498, 2009.
- 22
- 23 MORON, S. E.; OBA, E. T.; DE ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cell
 24 responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids
 25 *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of**

- 1 **Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v.
2 298, n. 2, p. 93-104, 2003.
- 3
- 4 MORTATTI, J.; PROBST, J. L. Silicate rock weathering and atmospheric/soil CO₂
5 uptake in the Amazon basin estimated from river water geochemistry:
6 seasonal and spatial variations. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1-4, p. 177-
7 196, 2003.
- 8
- 9 MOWRY, R. W. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic
10 carbohydrates. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 4, p.
11 407, 1956.
- 12
- 13 NILSSON, S. Control of gill blood flow. In: NILSSON, S. e HOLMGREN, S. (Ed.). **Fish**
14 **Physiology: Recent Advances**. London: Croom Helm, p.86-101, 1986.
- 15
- 16 OJHA, J.; MISHRA, A. K.; MUNSHI, J. S. D. Interspecific variations in the surface
17 ultrastructure of the gills of freshwater mullets. **Ichthyological Research**,
18 v. 33, n. 4, p. 388-393, 1987.
- 19
- 20 OLSON, K. R.; FROMM, P. O. A scanning electron microscopic study of secondary
21 lamellae and chloride cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Zeitschrift**
22 **für Zellforsch und Mikroskopische Anatomie**, v. 143, n. 4, p. 439-449,
23 1973.
- 24

- 1 PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Effects of atrazine on the
2 gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*.
3 **Chemosphere**, 2011.
4
- 5 PEARSE, A. G. Histochemistry: theoretical and applied. **The American Journal of the**
6 **Medical Sciences**, v. 241, n. 1, p. 136, 1961.
7
- 8 PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes.
9 **Annual Review Physiology**, v. 59, p. 325-347, 1997.
10
- 11 POWELL, M. D.; SPEARE, D. J.; WRIGHT, G. M. Comparative ultrastructural
12 morphology of lamellar epithelial, chloride and mucous cell glycocalyx of the
13 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. **Journal of Fish Biology**, v. 44,
14 n. 4, p. 725-730, 1994.
15
- 16 RAMOS, C. A. **Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas***
17 **durante a transição da respiração aquática para respiração aérea.**
18 Dissertação de Mestrado: Programa Interinstitucional de Pós-Graduação
19 em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,
20 79pp., 2008.
21
- 22 SAKURAGUI, M.; SANCHES, J.; FERNANDES, M. Gill chloride cell proliferation and
23 respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias*
24 *malabaricus*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical,**
25 **Systemic, and Environmental Physiology**, v. 173, n. 4, p. 309-317, 2003.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

SARDELLA, A. B.; BRAUNER, C. J. The osmorepiratory compromise in fish: the effects of physiological state and the environmental. In: FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. (Eds). **Fish respiration and environment**. Enfield, NH, USA: Science Publishers: p. 147-165, 2007.

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of ions across the esophagus of fish. **Physiological Zoology**, v. 55, n. 1, p. 23-34, 1982.

SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 4, p. 401-429, 1994.

SIBBING, F. A.; URIBE, R. Regional specializations in the oro-pharyngeal wall and food processing in the carp (*Cyprinus carpio* L.). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 35, n. 3, p. 377-422, 1984.

SOLLID, J.; DE ANGELIS, P.; GUNDERSEN, K.; NILSSON, G. E. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 20, p. 3667-3673, 2003.

SOLLID, J.; NILSSON, G. E. Plasticity of respiratory structures-adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 154, n. 1-2, p. 241-251, 2006.

- 1 SOLLID, J.; WEBER, R. E.; NILSSON, G. E. Temperature alters the respiratory surface
2 area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*.
3 **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 6, p. 1109-1116, 2005.
4
- 5 SPERRY, D. G.; WASSERSUG, R. J. A proposed function for microridges on epithelial
6 cells. **The Anatomical Record**, v. 185, n. 2, p. 253-257, 1976.
7
- 8 STEINBERG, C. E. W.; KAMARA, S.; PROKHOTSKAYA, V. Y.; MANUSADZIANAS,
9 L.; KARASYOVA, T. A.; TIMOFEYEV, M. A.; JIE, Z.; PAUL, A.; MEINELT,
10 T.; FARJALLA, V. F. Dissolved humic substances—ecological driving forces
11 from the individual to the ecosystem level?. **Freshwater Biology**, v. 51, n.
12 7, p. 1189-1210, 2006.
13
- 14 VARSAMOS, S.; NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. Ontogeny of osmoregulation in
15 postembryonic fish: a review. **Comparative Biochemistry and**
16 **Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 141, n. 4, p.
17 401-429, 2005.
18
- 19 VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination
20 based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v.
21 12, n. 6, p. 399-402, 1978.
22
- 23 VIGLIANO, F.; ALEMAN, N.; QUIROGA, M.; NIETO, J. Ultrastructural characterization
24 of gills in juveniles of the *Argentinian silverside*, *Odontesthes bonariensis*

1 (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). **Anatomia, Histologia,**
2 **Embryologia**, v. 35, n. 2, p. 76-83, 2006.

3

4 WILLIS, S. C.; NUNES, M. S.; MONTAÑA, C. G.; FARIAS, I. P.; LOVEJOY, N. R.
5 Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock
6 basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and**
7 **Evolution**, v. 44, n. 1, p. 291-307, 2007.

8

9 WOOD, C. M.; MATSUO, A. Y. O.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R.; PATRICK, M. L.;
10 PLAYLE, R. C.; VAL, A. L. Protection by natural blackwater against
11 disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater
12 stingrays endemic to the Rio Negro. **Physiological and Biochemical**
13 **Zoology**, v. 76, n. 1, p. 12-27, 2003.

14

15

16

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies do presente estudo estão distribuídas na bacia amazônica de modo distinto. Enquanto que *O. bicirrhossum* é frequentemente encontrado em águas brancas *A. gigas* pode ser encontrado tanto em água branca quanto água preta. O fato de que a literatura sugerir que a espécie compreende uma única população panmítica, testando a hipótese da barreira hidrográfica, pode ser inferido que esta barreira formada por rios de água preta teriam pouca ou nenhuma influência na dispersão da espécie.

O presente estudo procurou contribuir em vários aspectos para elucidar como e quais são as respostas dos animais quando em exposição à água branca e preta e os resultados sugerem que as brânquias de exemplares pequenos de *A. gigas* estão mais suscetíveis às alterações do meio e portanto exemplares grandes devem transpor águas pretas e deste modo destacamos os principais pontos que corroboraram as hipóteses deste trabalho:

- Exemplares grandes de *A. gigas* (≈ 2000 g) apresentam uma rápida recuperação das perdas iônicas no início do experimento de fluxo iônico e portanto não teriam influência da barreira hidrográfica de rios de água preta e conseqüentemente, influência na dispersão da espécie;
- Ambas as espécies aparentemente apresentam uma capacidade íon-regulatória mais eficiente em ambientes de água branca, principalmente pela retomada de íons (influxo de íons);

- Os resultados da imunohistoquímica para marcação da enzima NKA, a morfometria da AFCRMs e a densidade de CRMs indicam que em exemplares grandes de *A. gigas* (≈ 2000 g) o compromisso osmorrespiratório é deslocado para processos de regulação de íons;
- Os fluxos iônicos e a morfometria das CRMs indicaram similaridades entre *O. bicirrhosum* e exemplares menores de *A. gigas* (≈ 200 g). Entretanto *O. bicirrhosum* não apresentaram o mesmo potencial de recuperação das perdas de íons que *A. gigas*.

Deve ser considerado que o presente estudo reproduz condições que os peixes podem enfrentar na natureza, entretanto ressalta-se a importância de outros estudos que possam aprimorar o conhecimento da fisiologia osmorregulatória destas espécies. Também seriam importantes estudos envolvendo outras espécies de Osteoglossiformes além das amazônicas, de modo a delinear melhor a história biogeográfica deste grupo.

ANEXOS

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFSCar



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Protocolo CEEA nº 054/2008

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto pesquisa **FLUXO DE ÍONS NAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA OSTEGLOSSIDADE EXPOSTAS EM ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA, SEUS MECANISMOS DE AJUSTE FISIOLÓGICO E INTERFERÊNCIA NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO**, elaborado por Cleverson Agner Ramos, Marisa Narciso Fernandes e Wallice Luiz Paxiúba Duncan.

São Carlos, 16 de dezembro de 2008.



Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Licença Ambiental 17102-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-1	Data da Emissão: 16/02/2009 16:07	Data de Validade: 16/02/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 3025976	Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: FLUXO DE ÍONS NAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA OSTEOGLOSSIDAE EXPOSTAS EM ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA, SEUS MECANISMOS DE AJUSTE FISIOLÓGICO E INTERFERÊNCIA NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS		CNPJ: 45.358.058/0001-40

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MANAUS	AM	Manaus	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Osteoglossum ferreirai, Arapaima gigas, Osteoglossum bicirrhosum
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Arapaima gigas (*Qtde: 50), Osteoglossum ferreirai (*Qtde: 50), Osteoglossum bicirrhosum (*Qtde: 50)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Osteoglossum bicirrhosum, Arapaima gigas, Osteoglossum ferreirai

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Animal morto ou partes (carcaça)osso/pele, Sangue
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Tarrafa, Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Outros petrechos(aquisição com criadores), Rede de arrasto de melá-água (tração motorizada)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	Ensino Superior e Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18645994



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-1	Data da Emissão: 16/02/2009 16:07	Data de Validade: 16/02/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 3025976	Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: FLUXO DE ÍONS NAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA OSTEOGLOSSIDAE EXPOSTAS EM ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA, SEUS MECANISMOS DE AJUSTE FISIOLÓGICO E INTERFERÊNCIA NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS		CNPJ: 45.358.058/0001-40
2	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA	Pesquisa científica
3	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Ensino Superior e Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18645994



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-1	Data da Emissão: 16/02/2009 16:07	Data de Validade: 16/02/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 3025978	Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: FLUXO DE ÍONS NAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA OSTEOGLOSSIDAE EXPOSTAS EM ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA, SEUS MECANISMOS DE AJUSTE FISIOLÓGICO E INTERFERÊNCIA NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO		
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS		CNPJ: 45.358.058/0001-40

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18645994



Página 3/3

Licença Ambiental 17102-2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-2	Data da Emissão: 22/09/2010 08:51
Dados do titular	
Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES EM AMBIENTES DE ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento bibliográfico e compra do material de consumo	09/2010	10/2010
2	Aquisição dos exemplares e realização dos protocolos experimentais	10/2010	06/2011
3	Análises dos resultados, publicação e conclusão do doutorado	06/2011	07/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	Apoio na pesquisa	304.905.962-15	11586206 SESEG - AM-AM	Brasileira
2	Elizabeth Gusmão Afonso	Apoio na pesquisa	179.760.732-49	430.337 SSP-AM-AM	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MANAUS	AM	Manaus	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Osteoglossum bicirrhosum, Osteoglossum ferreirai, Arapaima gigas
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Osteoglossum bicirrhosum (*Qtde: 100), Osteoglossum ferreirai (*Qtde: 100), Arapaima gigas (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Osteoglossum bicirrhosum, Osteoglossum ferreirai, Arapaima gigas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 21679832



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-2	Data da Emissão: 22/09/2010 08:51
Dados do titular	
Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES EM AMBIENTES DE ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Tarrafa, Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Outros petrechos(aquisição com criadores), Rede de arrasto de meia-água (tração motorizada)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Ensino Superior e Pesquisa
2	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Ensino Superior e Pesquisa
3	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA - INPA	Pesquisa científica

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 21679832



Página 2/3

Licença Ambiental 17102-3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-3	Data da Emissão: 02/02/2011 16:58
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEGLOSSIFORMES EM AMBIENTES DE ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento bibliográfico e compra do material de consumo	09/2010	10/2010
2	Aquisição dos exemplares e realização dos protocolos experimentais	10/2010	06/2011
3	Análises dos resultados, publicação e conclusão do doutorado	06/2011	07/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	Apoio na pesquisa	304.905.962-15	11586206 SESEG - AM-AM	Brasileira
2	Elizabeth Gusmião Afonso	Apoio na pesquisa	179.760.732-49	430.337 SSP-AM-AM	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MANAUS	AM	Manaus	Fora de UC
2	BARCELOS	AM	Barcelos	Fora de UC
3	NOVO AIRAO	AM	Novo Airão	Fora de UC
4	SANTA ISABEL DO RIO NEGRO	AM	Santa Isabel	Fora de UC
5	SAO GABRIEL DA CACHOEIRA	AM	São Gabriel	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13211954



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-3	Data da Emissão: 02/02/2011 16:58
Dados do titular	
Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES EM AMBIENTES DE ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Osteoglossum bicirrhosum, Osteoglossum ferreirai, Arapaima gigas
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Osteoglossum bicirrhosum (*Qtde: 100), Osteoglossum ferreirai (*Qtde: 100), Arapaima gigas (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Osteoglossum bicirrhosum, Osteoglossum ferreirai, Arapaima gigas

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Tarrafa, Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Outros petrechos(aquisição com criadores), Rede de arrasto de meia-água (tração motorizada)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Ensino Superior e Pesquisa
2	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	Ensino Superior e Pesquisa
3	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA	Pesquisa científica

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13211954



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 17102-3	Data da Emissão: 02/02/2011 16:58
Dados do titular	
Nome: Cleverson Agner Ramos	CPF: 026.847.379-08
Título do Projeto: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPROMISSO OSMORRESPIRATÓRIO EM OSTEOGLOSSIFORMES EM AMBIENTES DE ÁGUA BRANCA E ÁGUA PRETA	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13211954



Página 3/3