

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**HABITAT, MORFOLOGIA BRANQUIAL E OSMORREGULAÇÃO DAS ARRAIAS DE
ÁGUA DOCE DA BACIA AMAZÔNICA (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE)**

WALLICE LUIZ PAXIÚBA DUNCAN

São Carlos – SP

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**HABITAT, MORFOLOGIA BRANQUIAL E OSMORREGULAÇÃO DAS ARRAIAS DE
ÁGUA DOCE DA BACIA AMAZÔNICA (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE)**

WALLICE LUIZ PAXIÚBA DUNCAN

ORIENTADORA: Dra. MARISA NARCISO FERNANDES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais 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, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos – SP

2008

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

D911hm

Duncan, Wallice Luiz Paxiúba.

Habitat, morfologia branquial e osmorregulação das arraias de água doce da bacia amazônica (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) / Wallice Luiz Paxiúba Duncan. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
173 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Arraia. 2. Morfologia branquial. 3. Regulação osmótica.
4. Amazônia. 5. Habitat (Ecologia). I. Título.

CDD: 574.522 (20^a)

Wallice Luiz Paxiúba Duncan

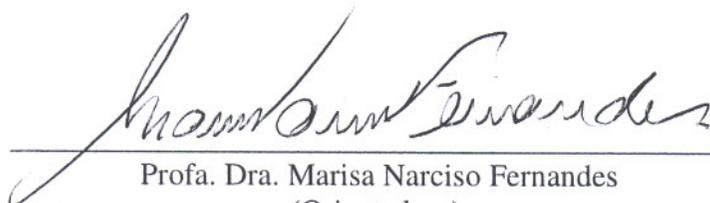
**HABITAT, MORFOLOGIA BRANQUIAL E OSMORREGULAÇÃO DAS
ARRAIAS DE ÁGUA DOCE DA BACIA AMAZÔNICA (ELASMOBRANCHII:
POTAMOTRYGONIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 29 de agosto de 2008

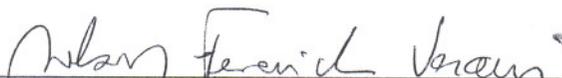
BANCA EXAMINADORA

Presidente



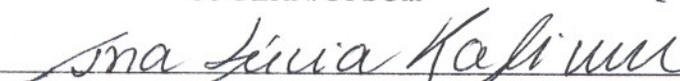
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



Profa. Dra. Nelsy Fenerich Verani
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
PPGCF/UFSCar

3º Examinador



Prof. Dr. Fernando Portella de Luma Marques
USP/SÃO PAULO-SP

4º Examinador



Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto
UFSM/Santa Maria-RS

DEDICATÓRIA

Dedido esta tese as pessoas mais importantes da minha vida:
Philip, Morrison, Louise, Davys, Anne, Ilin, Maurice, Dete, Deca e Fran
In memoriam à Hilarita, Haile e Luzia Paxiúba

A eles, minhas sinceras desculpas pelo momento de clausura que me deixou profundamente isolado, mas ainda assim carreguei com muito amor um pedacinho de cada um pelos quatro cantos da Amazônia e desse imenso Brasil.

Esta tese também é dedicada à memória de Peter W. Hochachka, cuja simplicidade e genialidade no campo da Fisiologia e Bioquímica Comparativa influenciaram várias gerações de pesquisadores

“Amazônia, minha Terra, se for preciso morro por ti”.



“A intolerância, um dos maiores cancos da humanidade é extremamente perversa para uma sociedade justa e democrática. Do mesmo modo que transforma um idiota em carrasco (A. Hitler e seus ideais anti-semitas), também é capaz de transformar as idéias de um gênio em estupidez absoluta (J. Watson e suas teorias racistas)”.

Wallice Paxiúba Duncan

Cheia do Rio Amazonas, 01 de junho de 2007

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço com uma reverência especial à **Dra. Marisa Narciso Fernandes**, minha orientadora. Desde o começo, a Profa. Marisa deu-me completa liberdade para desenvolver este trabalho, acompanhou-me passo a passo, incentivou, cobrou e sempre se mostrou solícita e disposta a ensinar. Seu papel foi muito além da formação profissional; Marisa foi especialmente compreensiva e amiga, sobretudo nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Agradeço também ao **PPG-ERN/UFSCar**, especialmente aos Coordenadores, Dr. José Eduardo e Dr. José Roberto Verani pelo apoio, atenção, esclarecimentos e compreensão.

Fundamentalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (**FAPEAM**) pelo suporte financeiro (processo PPP No.#1089/2004), e principalmente pela concessão de uma bolsa de DOUTORADO RH-POSGRAD em caráter excepcional (Decisão N.067/2007 – CD/FAPEAM), a qual foi sensível à solicitação da UFAM/PROPESP/DPG, após decisão da CAPES (Ofício Circular CAPES/CD N. 023-01-/2007). Agradeço também ao CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro concedido à Dra. Marisa Narciso Fernandes, os quais foram importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e professores da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), especialmente aos meus maiores incentivadores: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa, Dra. Izeni Pires Farias, Dr. Marcelo Gordo e Dra. Maria Isabel Galdames-Portus.

Aos Colegas do Departamento de Morfologia da UFAM, em nome da Profa. Lúcia Tereza Makarém, Prof. Dr. Fernando Barcellos, Profa. Maria Lúcia Góes Araújo, Prof. Antônio Batista Carneiro, e demais companheiros que apoiaram incondicionalmente minha liberação para finalizar este estudo.

Quero agradecer à Dona Iracema e as biólogas Rosinalda e Elenize, pelo carinho e acolhida durante as viagens ao Rio Negro. **Aos pescadores:** Sr. Alfredo, Sr. Walter, Sr. Santana, Alderly, Pinheiro, Américo, Manolo, Sra. Ivonete, entre tantos outros que foram meus verdadeiros mestres nos bancos das canoas durante horas a fio, nas noites úmidas no coração da Amazônia na busca de conhecimento sobre as arraias e sobre o meu povo – “os povos da floresta”.

À minha família pelo amor, carinho, educação e apóio durante as expedições ao Rio Tapajós, especialmente ao João Paxiúba, Cíntia, Jhony, Aldilon, Nanci, Rosa, Leilce, Lena, André, Dudi, Tio Haile, Nilton, Sr. Lavôr e esposa e aos moradores da Vila de São Luís do Tapajós (incluindo os “amigos” do espinhel).

Ao pessoal do IBAMA/AM, especialmente ao Júlio Alberto Dias Siqueira, chefe do Núcleo de Recursos Pesqueiros. Ao IBAMA pelas autorizações (IBAMA/DIREC Lic. No.#127/2004; IBAMA/SISBIO Lic. No.#10085-1/2007 e IBAMA-ICMBio/SISBIO Lic. No.#15068-1/2008) concedidas para captura e transporte das arraias.

Aos professores do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC/UFSCar), Dr. Tadeu Rantin e Dra. Ana Kalinin. Além destes, gentilmente agradeço à Dra. Keico Nonaka pela amizade, confiança e incentivo.

Quero expressar uma especial gratidão ao Dr. Gilberto Moraes (DEBE/UFSCar), o qual eu tive o privilégio de conhecê-lo desde o começo dos meus estudos, ainda na iniciação científica. Ao longo desse período, Giba foi

incansavelmente um dos meus maiores incentivadores, além do apóio e da grande amizade.

À Dra. Nelsy Verani (Hidrobiologia/UFSCar) pelo apoio e sugestões. Ao Dr. Fernando Marques (USP) pelo apóio, esclarecimentos e momentos de descontração durante uma campanha no Rio Negro. Ao Dr. Marcelo de Carvalho (USP) e Dra. Patrícia Charvet-Almeida (MPEG/PA) pelas dúvidas esclarecidas sobre os potamotrigonídeos.

À Dra. Daniele Félix e Dr. Juarez Pezzuti (NAEA/UFPa) pelo incentivo, amizade e apoio durante as expedições ao estuário amazônico.

À amiga, MSc. Sara Melo e minha ex-aluna do PIBIC/UFAM Naara Silva pelo auxílio no campo e pelos bons momentos durante as viagens ao Arquipélago de Mariuá.

À minha querida amiga MSc. Helen Sadauskas pelos bons momentos e pela confiança durante longas horas de conversas na “sacadinha”. À Dra. Marise Sakuragui (UNESP/Rio Claro), amiga especial para todas as horas; pelo auxílio importantíssimo durante a obtenção das imagens de microscopia eletrônica.

Aos colegas e aos amigos do LZBC/UFSCar pelo auxílio nas técnicas e também pelos bons momentos de descontração: MSc. Cleverson, MSc. Hugo, Diana, Tayrine, Pamela, Marcelo, MSc. Fabiano, Natan, Fábio, D. Vera, Sr. Ângelo, Vincent, Carmen e Nadir.

Finalmente, porém não menos importante... aos **POTAMOTRIGONÍDEOS** utilizados neste estudo. Tenho certeza que, em diversos momentos de devaneios no campo os papéis se inverteram. Em alguma ocasião, tornei-me objeto-alvo de “estudo” das arraias, nem que a intenção delas era para me “ferrar”... e com toda razão! E se um dia isso vier acontecer, desde já antecipo meu perdão.

SUMÁRIO

	pag.
PARTE I	
ASPECTOS GERAIS E HABITATS	
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS	3
Geral	3
Específicos	4
CAPÍTULO 1	
A BACIA AMAZÔNICA: HETEROGENEIDADE DE HABITATS E SUAS IMPLICAÇÕES PARA BIOGEOGRAFIA DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE	8
Introdução	9
Material e Métodos	11
Sítios de amostragens	11
Coleta dos animais	12
Análises estatísticas	13
Resultados	13
Rio Amazonas	15
Rio Negro	19
Rio Tapajós	20
Discussão	25
PARTE II	
MORFOLOGIA FUNCIONAL	
CAPÍTULO 2	
MORFOLOGIA FUNCIONAL DAS BRÂNQUIAS DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE: ELASMOBRANCHII)	34
Introdução	35
Material e Métodos	37
Animais	37
Microscopia de Luz	38
Microscopia Eletrônica de Varredura	39
Microscopia Eletrônica de Transmissão	39
Análises estatísticas	40
Resultados	40
Discussão	58
CAPÍTULO 3	
MORFOMETRIA BRANQUIAL, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase E CÉLULA CLORETO DE <i>Paratrygon aiereba</i> E <i>Potamotrygon</i> sp. (ELASMOBRANCHII: POTAMOTRYGONIDAE)	67
Introdução	68
Material e Métodos	69
Resultados	72
Morfometria branquial	72
Atividade da NKA, imunolocalização e distribuição das células cloreto.	74
Discussão	78

PARTE III
OSMORREGULAÇÃO

CAPÍTULO 4

OSMORREGULAÇÃO DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE: ELASMOBRANCHII): ÍONS, URÉIA, OSMOLALIDADE E ATIVIDADE DA Na^+/K^+ - ATPASE

Introdução	82
Material e Métodos	83
Resultados	84
Discussão	87
	93

PARTE IV
ADAPTAÇÕES: ESTUDOS DE CASOS

CAPÍTULO 5

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ÁGUA DO RIO BRANCO SOBRE OS PROCESSOS OSMO-IONORREGULATÓRIOS DE *Potamotrygon* sp.: EVIDÊNCIAS DE BARREIRA HIDROGRÁFICA

Introdução	98
Material e Métodos	99
Resultados.....	101
Discussão	106
	109

CAPÍTULO 6

PADRÕES OSMORREGULATÓRIOS DA ARRAIA DE ÁGUA DOCE, *Paratrygon aiereba* MÜLLER & HENLE (CHONDRICHTHYES: POTAMOTRYGONIDAE) DA ÁGUA PRETA E ÁGUA BRANCA DA BACIA AMAZÔNICA

Introdução	114
Material e Métodos	115
Área de estudo e captura dos animais.....	116
Análises hematológicas.....	116
Procedimentos analíticos	118
Atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase.....	118
Análises estatísticas	118
Resultados	119
Variáveis físicas e químicas da água	119
Hematologia	120
Composição química do plasma e do fluido perivisceral	121
Atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal	124
Discussão	125

PARTE V
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 7

BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO DE POTAMOTRYGONIDAE

A sistemática atual: um grande problema para a biologia da conservação	130
A sistemática atual: um grande problema para a biologia da conservação	131
Uso dos recursos: conflitos de pesca, legislação e controvérsias.....	133
Degradação dos habitats	143

CONCLUSÕES FINAIS	150
-------------------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
ANEXOS	
Apêndice I	165
Apêndice II.....	167
Apêndice III.....	169
Apêndice IV	170
Autorização para captura IBAMA Nº 127 de 29/12/2004	171
Autorização para captura IBAMA/SISBIO Nº 10085-1 de 28/10/2007	172
Autorização para captura IBAMA/ICMBio/SISBIO Nº 15068-1 - 11/07/08 ...	173

LISTA DE FIGURAS

PARTE I INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de Potamotrygonidae utilizados neste estudo 6

Figura 2. (a) Hipótese filogenética e (b) biogeografia histórica das arraias de água doce, segundo Lovejoy et al. (1998). 7

CAPITULO 1

Figura 1. Localização dos três rios (Amazonas, Negro e Tapajós) analisados neste estudo. Os detalhes dos pontos amostrados em cada rio estão descritos nos apêndices I, II e III (Anexos). 12

Figura 2. Rio Amazonas: cor “barrenta” (água branca), rico em sedimentos andinos. As áreas inundadas pelas águas brancas são denominadas de Várzeas. Variação espacial nos valores (média±desvio padrão) de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Amazonas ao longo de um trecho de 1.540 km em Maio/2007 (linha azul e círculo preto) e Maio/2008 (linha vermelha e círculo claro). 16

Figura. 3. Variação diária do pH e condutividade elétrica da água na praia do Humaitá, Ilha de Colares, Baía de Marajó (estuário amazônico). Valores médios analisados no mês de Maio de 2007. 17

Figura 4. Variação do pH e condutividade elétrica da água durante a preamar e baixamar na praia do Humaitá, Ilha de Colares, Baía de Marajó (PA). Os valores representam a média de quatro dias de observação no mês de Maio de 2007. (*) indica diferença significativa (teste *t*-pareado de Student, $P < 0,05$). 18

Figura 5. Rio Negro: água preta, ácida, pobre em íons e rica em matéria orgânica dissolvida. As florestas inundadas pelas águas pretas são localmente denominadas de Igapós. Variação espacial (média±desvio padrão) nos valores de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Negro ao longo de um percurso de 480 km. Março/2007 (linha azul e círculo preto) e Abril/2008 (linha vermelha e círculo claro). 21

Figura 6. Rio Tapajós: água em tom verde-azulada. O ribeirão também denomina as áreas de florestas inundadas pelas águas claras de Igapós. Variação espacial nos valores de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Tapajós ao longo de um trecho de 320 km. Junho/2007 (linha azul e círculo preto) e Maio/2008 (linha vermelha e círculo claro). 23

Figura 7. Correlação entre os valores de pH e condutividade elétrica dos rios Amazonas (círculo vermelho); Negro (triângulo invertido preto) e Tapajós (quadrado azul) nas amostragens realizadas em abril-junho/2007 (A) e abril-maio/2008 (B). Notar que as características físicas e químicas do Rio Tapajós são

intermediárias entre as dos rios Amazonas e Negro. Observar também uma tendência para redução da condutividade elétrica, na medida em que aumenta o pH da água do Rio Negro. Esta correlação foi fortemente negativa nas amostragens realizadas em Março/2007 ($n=15$; $r^2=0,80$; $P < 0,05$) e em Abril/2008 ($n=21$; $r^2=0,72$; $P < 0,05$). 24

PARTE II

CAPITULO 2

Figura 1. (A). Região ventral de um juvenil de *Potamotrygon aff. orbignyi*. (B) localização dos cinco pares de arcos branquiais, sendo o 1º arco denominado de arco hióideo; (C) sentido do fluxo de água dentro da cavidade orofaríngea; (D) câmara peribrânquial por onde a água flui entre as hemibrânquias até chegar à cavidade parabranquial (ponta da seta). Barras: 1 cm. 41

Figura 2. (A) Septo branquial demonstrando os raios cartilagosos (setas) e tecido conectivo que sustentam a holobrânquia. (B) detalhes da barra branquial e da câmara peribrânquial (seta) observados a partir da cavidade orofaríngea. (C) cavidade parabranquial. (D) canal septal (setas) entre as lamelas secundárias. Barras: (A) e (B) 2 mm; (C) 1,5 mm; (D) 1 mm. 42

Figura 3. (A) Disposição dos filamentos branquiais de *Paratrygon aiereba* demonstrando a presença de uma “protuberância” em cada filamento. (B) Detalhes das protuberâncias nos filamentos observados em Microscopia Eletrônica de Varredura. (C) e (D) demonstram que a protuberância é revestida por células pavimentosas. (E) Protuberância observada em microscopia de luz e corada com Alcian blue+PAS (pH 2,5) sugerindo a presença de tecido conjuntivo mucoso (verde). (F) Detalhes do tecido conjuntivo mucoso com células semelhantes aos fibroblastos (seta). Barras= (A) 5 mm; (B) 100 µm; (C) 25 µm; (D) 10 µm; (E) 40 µm; (F) 5 µm. 44

Figura 4. Comprimento dos filamentos das hemibrânquias anteriores (A) e posteriores (B) de três potamotrigonídeos: *Paratrygon aiereba* (largura do disco, LD= 17,5 cm; peso= 210 g), *Potamotrygon sp.* (LD = 14 cm; peso= 345 g) e *Potamotrygon orbignyi* (LD= 17,1 cm; peso= 245 g). 45

Figura 5. (A) Corte transversal ao filamento branquial de *Paratrygon aiereba* mostrando as lamelas secundárias. (B) Detalhes da região aferente do filamento branquial de *Potamotrygon orbignyi* indicando a artéria filamentar aferente (seta). (C) Microscopia eletrônica de varredura de *P. motoro* mostrando em um fragmento branquial a distribuição das lamelas, a localização das artériolas lamelares aferente (ALA) e eferente (AFE), o sentido do fluxo de água (seta contínua) e do fluxo de sangue (seta tracejada). (D) Em detalhes, a região eferente das lamelas. (E) Componentes das lamelas branquiais (seta) e do espaço interlamelar (ponta de seta) de *Potamotrygon sp.* (arraia cururu). Barras: (A) 200 µm; (B) 20 µm; (C) 250 µm; (D) 25 µm; (E) 20 µm. 46

Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de varredura da superfície do filamento e das lamelas mostrando as células pavimentosas (CPVs) e célula cloreto (seta) de *Potamotrygon motoro*. (B) Em detalhes, os possíveis morfotipos de CPVs em relação à morfologia superficial e electrondensidade; em muitos casos, as CPVs são semelhantes às células cloreto (setas). Barras: (A) 20 µm; (B) 10 µm. 48

- Figura 7. (A) Fotomicroscopia eletrônica de varredura mostrando as células epiteliais da lamela secundária de *Paratrygon aiereba*. (B e C) Detalhes dos poros observados na superfície apical das células pavimentosas. Barras: (A) 10 μm ; (B) 2 μm ; (C) 1 μm . 49
- Figura 8. (A) Microscopia eletrônica de transmissão de uma célula pavimentosa demonstrando a presença de inúmeras vesículas sub-apicais. (B) Corte transversal do filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (cururu) indicando que as células pavimentosas (CPVs) das lamelas possuem reação Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas. (C) Microscopia de luz demonstrando que as CPVs do filamento são Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas. (D) Os detalhes da região sub-apical da CPV com forte reação com o PAS. Barras: (A) 2 μm ; (B) 40 μm ; (C) 20 μm ; (D) 5 μm . 50
- Figura 9. Microscopia de luz mostrando as numerosas células mucosas no filamento branquial de *Potamotrygon motoro* (A) e *P. schroederi* (C). Detalhes das células mucosas Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas de *P. motoro* (B) e de *Paratrygon aiereba* coradas em azul de toluidina (D). Fotomicroscopia eletrônica de varredura mostrando as prováveis células mucosas gigantes (setas) do filamento branquial de *P. motoro* (E) Detalhes da superfície apical de uma célula mucosa (F). Barras: (A) 20 μm ; (B) 10 μm ; (C) 40 μm ; (D) 10 μm ; (E) 50 μm ; (F) 5 μm . 51
- Figura 10. Corte transversal ao filamento branquial mostrando a distribuição das células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase nas lamelas e no filamento do 4º arco branquial de diferentes espécies de arraias de água doce: (A) *Potamotrygon schroederi*, (B) *Potamotrygon* sp., (C) *P. orbigny*, (D) *P. scobina*, (E) *P. motoro*, (F) *Paratrygon aiereba*. Barras: 10 μm . 53
- Figura 11. Variação (média \pm erro padrão), N=3 para cada espécie) no número de células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) por milímetro de filamento (EI) ou por lamela secundária (LS) nos arcos branquiais dos potamotrigonídeos. (*) significativamente diferente ($P<0,05$) dos demais arcos branquiais. (a) indica diferença ($P<0,05$) dos arcos II, III e IV. (b) diferente significativamente ($P<0,05$) dos arcos III, IV e V. (c) indica diferença ($P<0,05$) dos arcos I e II. 54
- Figura 12. (A) Corte sagital ao filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) demonstrando que o complexo multicelular é constituído por células cloreto imuno-positivas para Na^+/K^+ -ATPase. (B) Detalhes dos complexos multicelulares nos espaços interlamelares. (C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando as prováveis aberturas dos canais (setas) dos complexos multicelulares localizados entre os espaços interlamelares. (D) Em detalhes, a abertura de um dos complexos multicelulares. Barras: (A) 20 μm , (B) 10 μm , (C) 25 μm , (D) 2 μm . 55
- Figura 13. (A) Células imuno-positivas para células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase em *P. schroederi*. Notar maior intensidade de imuno-localização na região basolateral da célula cloreto (seta). (B) Células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase presentes na lamela de *P. schroederi*. Barras indicam: 10 μm . 56

Figura 14. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando a ausência de um sistema membranoso labirinto-tubulo-vesicular no citoplasma das células cloreto de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). (B) Detalhes das invaginações próximas à região sub-apical das células cloreto. (C) Detalhes em MET do complexo multicelular de células cloreto de *Potamotrygon* sp. (D) Detalhes em MET da região sub-apical e apical das células cloreto demonstrando a presença de mitocôndrias e microvilosidades apicais curtas. (E) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das brânquias de *Potamotrygon* sp. mostrando uma célula cloreto na lamela secundária. 57

CAPÍTULO 3

Figura 1. Comprimento dos filamentos das hemibrânquias anterior e posterior nos cinco arcos branquiais de (A) *Paratrygon aiereba* (LD= 18,2 cm; peso= 230 g) e (B) *Potamotrygon* sp. (largura do disco= 17 cm; peso= 345 g). 73

Figura 2. Variação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e do número de célula cloreto imuno-positivas para a NKA no espaço interlamelar (EL= barras escuras) e na lamela secundária (LS= barras claras) em cada arco branquial da arraia (A) *Paratrygon aiereba* e (B) *Potamotrygon* sp. (*) indica diferença significativa em relação aos demais arcos branquiais. (#) diferença significativa em relação aos arcos branquiais II, III e IV. (&) significativamente diferente em relação ao arco branquial IV. (ANOVA não-paramétrica, Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). 75

Figura 3. Correlação entre atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{moles Pi/mg proteína/h}$) e o somatório das células cloreto imuno-reativas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) por milímetro de filamento+lamela em *Paratrygon aiereba* (A) e *Potamotrygon* sp. (B). Os arcos branquiais estão indicados em algarismos romanos. 76

Figura 4. (A e B) células cloreto imuno-positivas para Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) nos espaços interlamelares e nas lamelas de *Paratrygon aiereba*. Fotomicrografias em secções longitudinal (C) e sagital (D) ao filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). Notar que nos espaços interlamelares do filamento branquial de *Potamotrygon* sp. as CCs-NKA se organizam em complexos multicelulares. Barras: (A) e (C) 40 μm ; (B) 10 μm ; (D) 20 μm . 77

PARTE III CAPÍTULO 4

Figura 1. Concentração de íons (média \pm erro padrão) plasmáticos (preto) e do fluido perivisceral (branco) em Potamotrygonidae coletados no Arquipélago de Mariuá, Rio Negro (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. schroederi*, *P. aff. orbigny*, *Potamotrygon* sp.) e na Ilha de Colares, Baía de Marajó, estuário amazônico (*P. scobina* e *P. orbigny*). (*) Indica diferença significativa entre valores do plasma e do fluido perivisceral, test t -pareado ($P < 0,05$). 89

Figura 2. Níveis de uréia e osmolalidade (média \pm erro padrão) do plasma (preto) e fluido perivisceral (branco) em Potamotrygonidae coletados nas água pretas, ácidas e pobres em íons da bacia do Rio Negro (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. schroederi*, *P. aff. orbigny* e *Potamotrygon* sp.) e na Ilha de Colares, no estuário do Rio Amazonas com o Oceano Atlântico (*P. scobina* e *P. orbigny*). (*) Indica diferença significativa entre valores do plasma e do fluido 90

perivisceral, test *t*-pareado de Student ($P < 0,05$).

Figura 3. Correlação entre a média dos valores de osmolalidade *versus* somatório da $[Na^+]$ e $[Cl^-]$ no plasma (○) e do fluido perivisceral (●) dos potamotrigonídeos coletados na bacia do Rio Negro e no estuário amazônico (Ilha de Colares): 1. *P. aff. orbigny*; 2. *Potamotrygon* sp. (cururu); 3. *P. motoro*; 4. *P. schroederi*; 5. *Paratrygon aiereba*; 6. *Potamotrygon orbigny* e 7. *P. scobina*, sendo que os números em azul correspondem aos valores para o plasma e em vermelho para o fluido perivisceral. 91

Figura 4. A. Valores representativos de osmolaridade (mOsmol/L) e teor de uréia plasmática (mmol/L); B. Concentração de íons Na^+ e Cl^- plasmáticos (mmol/L) de vários elasmobrânquios marinhos, eurialinos, potamotrigonídeos e teleósteos de água doce. Em Potamotrygonidae e em teleósteos de água doce, os teores de uréia no plasma são geralmente < 5 mM. No geral, as características do sangue dos potamotrigonídeos são similares àquelas encontradas nos teleósteos de água doce. Valores adaptados de Evans et al. (2005). 94

PARTE IV CAPÍTULO 5

Figura 1. (A) Fotografias do sítio de coleta de água no Rio Branco. (B) O encontro das águas ocorre na altura das coordenadas S01°23'25" W61°50'89". (C) Sítio de coleta de água e dos exemplares de *Potamotrygon* sp. no Rio Negro. 104

Figura 2. Valores (média ± erro padrão) da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) das brânquias (A) e dos rins (B) de *Potamotrygon* sp. mantidos na água nativa do Rio Negro e exposto à água do Rio Branco. O asterístico indica diferença estatística ($P < 0,05$). $N=6$ para ambos os grupos. 108

Figura 3. Correlação entre as atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) branquial e renal de *Potamotrygon* sp. expostos à água do Rio Branco. A equação da regressão é $NKA_{\text{renal}} = 15,76 - (5,98 \times NKA_{\text{branquial}})$, onde $r^2 = 0,73$ ($P = 0,03$). 109

CAPÍTULO 6

Figura 1. Mapa indicando os locais de coleta das arraias (*Paratrygon aiereba*) no Rio Negro (água preta do Arquipélago de Mariuá, Barcelos) e Rio Amazonas/Solimões (água branca do Lago Janauacá). Imagem do satélite JERS-1 (NASDA) do "Global Rain Forest Mapping Project South America", setembro/dezembro de 1995, volume AM2. 117

Figura 2. Valores médios ± erro padrão da concentração de uréia e osmolalidade no plasma (barras pretas) e no fluido perivisceral (barras claras) de exemplares juvenis de *P. aiereba* de água preta (Rio Negro, $N=8$) e água branca (Rio Solimões/Amazonas, $N=6$). (*) diferença significativa entre arraias de água preta e água branca. (#) indica diferença significativa entre plasma e fluido perivisceral ($P < 0,05$). 122

Figura 3. Concentração média ± erro padrão dos íons no plasma (barras escuras) e fluido perivisceral (barras claras) em exemplares de *P. aiereba* de água preta (Rio Negro, $N=8$) e água branca (Rio Solimões/Amazonas, $N=6$). (*) indica diferença

entre das duas populações. (#) diferença significativa entre plasma e fluido perivisceral ($P < 0,05$). 123

Figura 4. Atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias (barras escuras) e nos rins (barras claras) de exemplares juvenis de *P. aiereba* da água preta (Rio Negro, N=8) e da água branca (Rio Solimões/Amazonas, N=6). (*) indica diferença significativa entre os valores das duas populações de arraias ($P < 0,05$). 124

PARTE V

CAPÍTULO 7

Figura 1. Venda de *Potamotrygon scobina* no Mercado Municipal de Colares, Estado do Pará. O valor comercializado em maio de 2007 foi de R\$ 1,00/kg. 135

Figura 2. “Bóia” de uma arrastadeira na calha do Rio Negro em Mariuá, Barcelos, AM. 136

Figura 3. Percentual das espécies de Potamotrygonidae provavelmente capturadas da natureza para fins de ornamentação (percentual de captura espécie-específica foi baseado nos dados estimados a partir da Tabela 2). 138

Figura 4. Percentual do faturamento pelo comércio de arraias de água doce (Potamotrygonidae) em cada um dos três segmentos do setor produtivo ao longo das 8 safras com exportação legalizada pelo IBAMA. O movimento no comércio internacional nesse período foi estimado em cerca de US\$ 17 milhões (ver apêndice IV para valor individual/espécie em dólares). 145

Figura 5. Exemplares de *Potamotrygon aff. orbigny* mortos, provavelmente durante a operação “limpeza das praias” no Médio Rio Negro, Amazônia Central. 147

Figura 6. As areias retiradas das praias do Arquipélago de Mariuá (Estado do Amazonas), habitats preferencial das espécies *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon aff. orbigny* e *P. schroederi*. 148

Figura 7. Região de Cachoeiras de São Luís no Rio Tapajós, no município de Itaituba (Estado do Pará), ameaçada pela construção de uma UHE planejada para gerar 11 mega-watts de energia, principalmente para alimentar as máquinas das gigantescas mineradoras que exploram bauxita e calcário na região. 148

Figura 8. Registo de ocorrência de *Potamotrygon aff. motoro* (A) à jusante da UHE de Ilha Solteira (B), Alto Rio Paraná (Estado de São Paulo). Há relatos de introdução no lago à montante da UHE, situação potencialmente perigosa, pois é uma área muito freqüentada pelos banhistas (C). 149

LISTA DE TABELAS

PARTE I

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Algumas características biológicas dos potamotrigonídeos utilizados neste estudo.	5
---	---

CAPITULO 1

Tabela 1. Resumo dos valores (média±desvio padrão; min-max; número amostral) das variáveis físico-químicas da água do Rio Amazonas, Rio Negro e Rio Tapajós e as espécies de Potamotrygonidae que ocorrem em suas respectivas bacias hidrográficas.	14
---	----

Tabela 2. Resumo dos principais sítios de pesca, variáveis físico-químicas dos locais de captura e habitats preferenciais dos juvenis de cinco espécies de arraiais de água doce (Potamotrygonidae).	22
--	----

PARTE II

CAPITULO 2

Tabela 1. Biometria: peso (média±erro padrão) e largura do disco, LD), número amostral (N) e local de captura das espécies de Potamotrygonidae.	37
---	----

CAPITULO 3

Tabela 1. Morfometria de alguns dos componentes branquiais de <i>Paratrygon aiereba</i> (N=4; 176,7±26,7 g; largura do disco= 16,5±3,4 cm) e <i>Potamotrygon</i> sp. (N=3; 390,0±29,3g; largura do disco= 19,3±1,5 cm).	72
---	----

PARTE III

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Número amostral (N), valores médios±erro padrão do peso (g), largura do disco (LD, cm) das espécies de Potamotrygonidae coletados no arquipélago de Mariuá (Rio Negro) e na Ilha de Colares (Baía de Marajó, estuário Amazônico).	85
---	----

Tabela 2. Valores das variáveis físico-químicas e concentração dos íons Na ⁺ e K ⁺ (média±erro padrão) nos habitats (local de captura e aclimatização) das arraiais do Rio Negro (N=96; exceto íons, onde N=14) e da Baía de Marajó (N=144).	86
--	----

Tabela 3. Atividade específica da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (µmoles Pi/mg proteína/h) branquial e renal em alguns Potamotrygonidae.	92
---	----

PARTE IV

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Variáveis físico-químicas da água do Rio Negro (S00°40'628" W63°03'506") e do Rio Branco (Boca do Rio Branco, S01°23'248" W61°50'887"). (*) Indica diferença significativa. N=6 para cada grupo experimental. 103

Tabela 2. Valores (média±erro padrão) da concentração dos íons Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Ca⁺², uréia e osmolalidade no plasma e fluido perivisceral da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. 107

Tabela 3. Valores (média±erro padrão) do número de células cloreto imuno-positivas para a Na⁺/K⁺ -ATPase (No. de CC-NKA/mm de lamela ou de filamento branquial) da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro. 107

CAPÍTULO 6

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas (media±erro padrão) do Rio Negro (água preta) e Rio Solimões/Amazonas (água branca). *Indica diferença significativa entre os rios (P<0,05). 120

Tabela 2. Variáveis hematológicas (media±erro padrão), hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos circulantes (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de exemplares de *P. aiereba* do Rio Negro (água preta, N=8) e Rio Solimões/Amazonas (água branca, N=6). 120

Tabela 3. Proteínas totais (g/100 mL), albumina (g/100 mL) e concentração de glicose (mmol/L) no plasma e no fluido perivisceral de exemplares de *P. aiereba* do Rio Negro (água preta, N=8) e Rio Solimões/Amazonas (água branca, N=6). 121

PARTE V

CAPÍTULO 7

Tabela 1. Número de exemplares/espécie de Potamotrygonidae permitidos para exportação conforme legislações (portarias e instrução normativa) do IBAMA. 139

Tabela 2. Número total de Potamotrygonidae exportados ao longo das safras, considerando que todas as empresas de exportação de peixes ornamentais utilizaram suas cotas 141

Tabela 3. Estimativa das principais espécies de Potamotrygonidae retiradas da bacia Amazônica durante a vigência das legislações que regulamentavam a exportação de arraias de água doce para fins ornamentais. 142

Tabela 4. Valor comercializado em US\$ por exemplar/espécie de Potamotrygonidae em cada segmento do setor produtivo. 144

Tabela 5. Valores estimados (US\$) pelo faturamento em cada segmento do setor produtivo a partir da Tabela 4 durante o período de vigência das legislações 1998-2006. 144

RESUMO

Foram analisadas as relações entre a morfologia funcional das brânquias, fisiologia osmorregulatória e habitats das arraias de água doce da família Potamotrygonidae. A organização geral das brânquias dos potamotrigonídeos é semelhante aos demais elasmobrânquios. As hemibrânquias dos potamotrigonídeos possuem entre 74 a 103 filamentos. Em cada filamento observa-se uma protuberância, cujo epitélio é constituído pelas mesmas células diferenciadas que revestem os filamentos e as lamelas dos demais elasmobrânquios: células pavimentosas, células mucosas e células cloreto. As células pavimentosas (CPVs) são PAS-positivas evidenciando a síntese de mucosubstâncias neutras. Estudos em microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciam a presença de pequenas vesículas subapicais contendo material electrodensito nas CPVs. As células mucosas são grandes e possuem reação Alcian blue e PAS-positivas sugerindo produção de mucosubstâncias ácidas e neutras, respectivamente. As células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) são mais freqüentemente nos espaços interlamelares principalmente no 4º arco branquial. A intensa imunomarcagem na periferia citoplasmática das CCs-NKA e os estudos em MET demonstram a presença de moderadas invaginações na região basolateral das células cloreto. Em *Potamotrygon* sp. (≈arraia cururu, espécie nova) as CCs-NKA agrupam-se em complexos multicelulares, os quais podem ser importantes sítios para absorção de íons a partir de um ambiente extremamente ácido e pobre em sais, como as águas do Rio Negro. As concentrações dos íons e uréia nos compartimentos corporais suportam a semelhança entre o “sangue” dos potamotrigonídeos e dos teleósteos de água doce. Estes resultados foram analisados com base na natureza da interação organismo-ambiente dos potamotrigonídeos, pois muitos dos rios amazônicos (Amazonas, Negro e Tapajós) são espacialmente heterogêneos do ponto de vista físico-químico devido às suas origens geológicas. Sugere-se que os padrões de distribuição das arraias de água doce podem estar associados ao tipo água (branca, preta e clara). Com base nas diferenças físicas e químicas entre os rios, a hipótese da barreira hidrográfica foi testada em *Potamotrygon* sp., uma espécie endêmica do Rio Negro. Esta arraia quando exposta às águas do Rio Branco apresenta redução significativa nas $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$, osmolalidade e atividade da Na^+/K^+ -ATPase renal. A redução na NKA renal pode ter provocado a perda desnecessária de íons, e conseqüentemente uma falha nos processos osmorregulatórios. No contexto biogeográfico, explorar um ambiente que impõe limites fisiológicos poderá se tornar uma barreira geográfica para a distribuição dessa espécie. Por outro lado, exemplares de *Paratrygon aiereba* coletados no Rio Negro e Rio Solimões/Amazonas sugerem a presença de estratégias diferenciais (plasticidade fenotípica) para adaptação em diferentes habitats, os quais incluem ajustes osmorregulatórios de acordo com as características físicas e químicas da água.

Palavras-chave: bacia Amazônica, Potamotrygonidae, arraias de água doce, morfologia branquial, osmorregulação

ABSTRACT

Habitat, functional morphology and osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). The relationship between functional morphology of the gills, osmoregulatory physiology, and habitats of the freshwater stingrays (family Potamotrygonidae) was investigated. Potamotrygonid gills have a rather unique external and internal anatomy and organization compared with other marine and/or euryhaline rays. The filaments on the hemibranchs are usually longer and numerous in the second arch. A protuberance was observed on the leading edge of the filaments. The epithelium that covers the gill filaments and lamellae is composed primarily of pavement cells (PVCs), mucous cells (MCs) and chloride cells (CCs). The PVCs showed PAS-positive reactivity. In addition, studies using transmission electron microscopy (TEM) indicate that PVCs possess sub-apical secretory granules or vesicles that contain mucous material. Large mucous cells were observed with Alcian blue and PAS reaction suggesting the presence of acid and neutral mucopolysaccharides, respectively. Particular attention was focused on the chloride cells. Na^+/K^+ -ATPase-rich cells (chloride cell, CC-NKA) were frequently found on the trailing edge and in the interlamellar spaces. They were also found on the lamellae, although generally towards the base. The number of CC-NKA and Na^+/K^+ -ATPase activity were greatest in arch IV compared with the other branchial arches. The basolateral membrane of the chloride cell does has moderate infoldings, and they are likely the site of Na^+/K^+ -ATPase activity. A surprising result was observed in *Potamotrygon* sp., in which chloride cells were arranged in large groups in the interlamellar region, not observed in other potamotrygonid species. This multicellular complex of chloride cell is certainly unusual, and may provide a micro-environment suitable to ion uptake from the acidic and ion-poor water of the Rio Negro basin. Potamotrygonid stingrays exhibit typical “teleostean” body fluid chemistry. These results were analyzed based on the organism-environment interaction. Amazonian rivers, such as Rio Amazonas, Rio Negro, and Rio Tapajós are spatially heterogeneous in their physical and chemical features. In this regard, it is apparent that some distribution patterns of the family Potamotrygonidae may be related to the type of water (e.g white, black and clearwater). The hydrographic barrier hypothesis was tested in *Potamotrygon* sp. In this ray, plasma $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$, osmolality and kidney Na^+/K^+ -ATPase activity decreased after acclimatization to water of the Rio Branco compared to Rio Negro-acclimatized animals. These findings suggest that whitewater-associated changes on the ion and plasma osmolality are due to reduction in the renal Na^+/K^+ -ATPase activity resulting in an ion loss to the environment. In our biogeographic scenario, some water types may act as an expressive hydrographic barrier for the isolation of endemic potamotrygonid species. On the other hand, *Paratrygon aiereba*, a widespread stingray that lives in white, clear and blackwaters in the Amazon basin exhibited some physiological differences related to the aquatic environment. Plasma osmolality, urea and ion concentration were higher in whitewater, as compared to blackwater rays. This fact may be explained as an example of phenotypic plasticity, usually expressed in aquatic animals in environments with different aquatic compositions.

Key words: Amazon basin, Potamotrygonidae, freshwater stingrays, gill morphology, osmoregulation

ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO

Considerando a ampla abordagem do tema proposto esta tese foi estruturada em 5 partes com um total de 7 capítulos. Cada Capítulo foi estruturado como artigo a ser submetido para posterior publicação.

A Parte I inclui a Introdução geral com uma breve descrição da literatura dos principais conhecimentos pré-existentes sobre biologia geral, osmorregulação de potamotrigonídeos e das hipóteses testadas neste estudo. São definidos os objetivos da tese e, posteriormente é apresentado o Capítulo 1. Neste capítulo são descritas algumas variáveis físico-químicas (pH, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos) ao longo do canal principal de três importantes rios da bacia amazônica: Rio Negro, Rio Tapajós e Rio Amazonas, com ênfase sobre os padrões biogeográficos dos potamotrigonídeos.

A Parte II trata da descrição morfofuncional das brânquias dos potamotrigonídeos. Aqui estão incluídos dois capítulos. No Capítulo 2, descrevem-se alguns aspectos da morfometria branquial (número e comprimento dos filamentos branquiais), da morfologia funcional (filamentos e lamelas), com ênfase na descrição morfofuncional das principais células diferenciadas do epitélio branquial: célula pavimentosa, célula mucosa e célula cloreto. No Capítulo 3, são descritas as variações na morfometria branquial, no número de células cloreto e na atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase individualmente em cada arco branquial de *Paratrygon aiereba* (ampla distribuição geográfica) e *Potamotrygon* sp. (endêmica da bacia do Rio Negro). Discute-se o compromisso osmorregulatório dos arcos branquiais dessas espécies.

A Parte III trata dos aspectos osmorregulatórios de vários potamotrigonídeos, os quais estão incluídos num único capítulo. No Capítulo 4, descreve-se a fisiologia osmorregulatória (osmólitos do plasma, fluido perivisceral e atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal) de vários potamotrigonídeos coletados na bacia do Rio Negro (águas pretas, ácidas e pobres em íons) e no estuário do Rio Amazonas (água branca, pH próximo à neutralidade e rica em sais).

Na Parte IV são apresentados dois estudos de casos, onde se discute duas hipóteses: a teoria da barreira hidrográfica e a plasticidade fenotípica dos componentes osmorregulatórios. No Capítulo 5, a teoria da barreira hidrográfica é

testada sob o ponto de vista fisio-ecológico. A arraia cururu (*Potamotrygon* sp.) é endêmica da bacia do Rio Negro e ocasionalmente é capturada no Rio Branco, um importante tributário do Rio Negro, porém com característica limnológica distinta dos habitats preferenciais desta espécie. No Capítulo 6, discute-se a teoria da plasticidade fenotípica em *Paratrygon aiereba*. Esta espécie tem ampla distribuição na bacia amazônica. A plasticidade adaptativa em exemplares de populações coletados no Rio Negro e no Rio Solimões/Amazonas é descrita sob o ponto de vista da interação organismo-ambiente. Os resultados deste capítulo serão publicados no **Journal of Fish Biology** (2009, v.74, doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02156.x) como trabalho intitulado “Ionic regulation and Na⁺/K⁺ -ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) living in white and blackwaters in the Amazon basin”.

A Parte V intitulada “Considerações finais” é constituída por um capítulo e as conclusões finais: No Capítulo 7, discute-se um relato sobre os principais entraves para a biologia da conservação dos potamotrigonídeos, tais como a complexa e caótica sistemática, os conflitos pelo uso do recurso e atividades antropogênicas que comprometem as ações conservacionistas das arraias de água doce, e finalmente são apresentadas as conclusões finais e as implicações dos resultados da tese.

PARTE I



Aspectos gerais e habitats

INTRODUÇÃO GERAL

As arraias de água doce da família Potamotrygonidae estão representadas em três gêneros descritos (*Paratrygon*, *Potamotrygon* e *Plesiotrygon*) e um quarto em processo de descrição (MARTIN, 2004; 2005). Os gêneros *Paratrygon* e *Plesiotrygon*, por enquanto são monotípicos (McEACHRAN & ASCHLIMAN, 2004). Das 19 a 21 espécies de potamotrigonídeos consideradas válidas cerca de 17 espécies ocorrem no Brasil (COMPAGNO & COOK, 1995; CARVALHO et al., 2003; ROSA et al., 2008).

Na Amazônia, algumas espécies como *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *P. schroederi* são endêmicas e adaptadas às águas pretas e ácidas do Rio Negro e seus tributários (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a). No entanto, *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon motoro* têm ampla distribuição geográfica e podem ser encontradas nas águas brancas do estuário do Rio Amazonas (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a), nas águas claras da foz do Rio Tocantins (RINCON, 2006a), e até nas águas pobres em íons do Arquipélago de Mariuá no Rio Negro (ver Fig. 1).

As diferenças nas águas da bacia amazônica vão além das cores. Rios de águas pretas como o Rio Negro são ácidos (pH 4-5), pobres em íons e ricos em matéria orgânica dissolvida (KÜCHLER et al., 2000; AUCOUR et al., 2003). Rios de águas brancas, como o Rio Solimões/Amazonas têm pH próximo à neutralidade (pH 6-7) são ricos em sais e em partículas minerais em suspensão (FURCH et al., 1982; KONHAUSER et al., 1994; AUCOUR et al., 2003). Porém, rios de águas claras (Rio Tapajós, por exemplo) têm valores de pH 6-7, são altamente transparentes, possuem baixa condutividade elétrica (<20 $\mu\text{S}/\text{cm}$) são pobres em íons (SANTOS & RIBEIRO, 1988; KONHAUSER et al., 1994). Como resultados destas diferenças físicas e químicas, alguns rios provavelmente criam barreiras geográficas determinantes da distribuição espacial das espécies endêmicas, possivelmente, porque afetam os processos orgânicos que mantêm à homeostasia do animal. Por outro lado, espécies de ampla distribuição podem exibir traços fisiológicos plásticos que podem ter sido importantes ao longo da história de vida da espécie.

A distribuição geográfica das arraias de água doce é similar como a de muitos invasores marinhos (ver Fig. 2). A mais recente hipótese sobre a origem e evolução da família Potamotrygonidae foi proposta por Lovejoy et al. (1998). Segundo a hipótese de Lovejoy et al. (1998), o ancestral dos Potamotrygonidae pode ter sido um grupo irmão do gênero *Himantura* (Dasyatidae), uma vez que vários membros desse gênero são encontrados tanto em águas salobras, quanto em ambiente de água doce.

Os potamotrigonídeos são estenoalinos e hiper-osmóticos em relação ao meio, mas não concentram uréia e nem trimetilaminas como fazem seus parentes marinhos ou eurialinos, que são iso-osmóticos ou ligeiramente hiperosmóticos em relação ao meio (THORSON et al. 1967; GRIFFITH et al. 1973; TREBERG et al., 2006). Recentemente, Tam et al. (2003) demonstraram que a arraia dulciaquícola, *Himantura signifer* (Dasyatidae) encontrada na bacia Hari (Sumatra) apresenta capacidade para sintetizar uréia e mantém a osmolalidade plasmática acima de 400 mOsmol/kg. Se considerarmos este aspecto, *H. signifer* parece estar mais adaptada ao ambiente de água doce que *Dasyatis sabina*, uma arraia euri-halina que habita as águas do Rio St. Johns (Florida, EUA). Segundo Piermarini & Evans (1998) esta espécie também acumula elevado teor de uréia (~200 mmol/L) e regula a osmolalidade do plasma acima de 620 mOsmol/kg. A distinção entre arraias de água doce esteno-halinas e euri-halinas é descrita pelas suas diferenças osmorregulatórias. Tanto *H. signifer* (TAM et al., 2003) quanto *D. sabina* (PIERMARINI & EVANS, 1998) são diferentes de qualquer membro da família Potamotrygonidae, porque a osmolalidade plasmática dos potamotrigonídeos é geralmente menor que 350 mOsmol/kg e com teor de uréia <2 mmol/L (THORSON et al., 1967; GRIFFITH et al., 1973; BITTNER & LANG, 1980; WOOD et al., 2002; TAM et al., 2003).

Para que os peixes se adaptem à vida no ambiente de água doce são necessários mecanismos especializados de tomada de íons da água pelo epitélio branquial. As células cloreto são os principais sítios de absorção iônica em peixes teleósteos e elasmobrânquios (EVANS et al., 2004; 2005). Nestas células, a enzima Na^+/K^+ - ATPase localiza-se em uma vasta área tubular, a qual é contínua com a região basolateral (PIERMARINI & EVANS, 2000; EVANS et al., 2005). Em

teleósteos de água doce, a atividade da Na^+/K^+ - ATPase cria um gradiente eletroquímico para que o Na^+ e Cl^- possam ser absorvidos pela região apical das células cloreto (MARSHALL & BRYSON, 1998). Nos elasmobrânquios, Piermarini & Evans (1998) identificaram células cloreto ricas em Na^+/K^+ - ATPase na arraia euri-halina, *Dasyatis sabina*. Estes autores observaram que a densidade destas células estava relacionada ao teor de sais na água. Em estudos subseqüentes, estes autores notaram que a densidade de células ricas em Na^+/K^+ - ATPase e células ricas em V- H^+ - ATPase aumentou quando as arraias foram aclimatadas na água doce (PIERMARINI & EVANS, 2000; 2001). Baseando-se nestes resultados, foi proposto um modelo não usual para a troca iônica no epitélio branquial das arraias euri-halinas. Nas brânquias de elasmobrânquios existem dois tipos de células cloreto: um tipo rico em Na^+/K^+ - ATPase que fornece energia para absorção de Na^+ via excreção de H^+ (prótons), enquanto outro tipo rico em V- H^+ - ATPase que favorece a tomada de cloreto eliminando HCO_3^- via co-transporte antiporte (EVANS et al., 2004). Recentemente Wood et al. (2002) demonstraram que os mecanismos de regulação iônica da arraia cururu, *Potamotrygon* sp. são concordantes com o modelo proposto por Piermarini & Evans (2001). Porém, até o presente momento não existem dados da atividade específica da Na^+/K^+ - ATPase nos órgãos-chave dos processos osmorregulatórios (brânquias e rins), e também não há relato sobre a identificação de células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase ou qualquer aspecto morfofuncional das brânquias dos potamotrigonídeos.

OBJETIVOS

Geral

Descrever os aspectos da fisiologia osmorregulatória e da morfologia funcional dos elementos branquiais dos potamotrigonídeos sob o ponto vista da interação organismo-ambiente.

Específicos

- (a) Descrever as características físicas e químicas dos principais rios da bacia Amazônica: Rio Amazonas, Rio Negro e Rio Tapajós, considerados como rios de água branca, preta e clara, respectivamente;
- (b) Descrever a morfologia branquial (interna e externa) das arraias de água doce da família Potamotrygonidae (Tabela 1);
- (c) Descrever a fisiologia osmorregulatória de potamotrigonídeos coletados no Rio Negro e no estuário do Rio Amazonas;
- (d) Testar a teoria da barreira hidrográfica sob o ponto vista de fisio-ecológico: investigar se as características físicas e químicas da água do Rio Branco atuam como determinantes na distribuição geográfica da arraia cururu (*Potamotrygon* sp.);
- (e) Testar a teoria da plasticidade fenotípica em potamotrigonídeos: descrever os parâmetros osmorregulatórios de *Paratrygon aiereba* capturadas em diferentes tipos de água (Rio Negro, água preta e Rio Solimões/Amazonas, água branca).
- (f) Descrever e discutir os principais entraves relacionados à biologia da conservação dos potamotrigonídeos.

Tabela 1. Algumas características biológicas dos potamotrigonídeos utilizados neste estudo.

Classe Chondrichthyes Ordem Myliobatiformes Subordem Myliobatoidei Superfamília Dasyatoidea Família Potamotrygonidae		Características biológicas das espécies
<i>Paratrygon aiereba</i>		L.D 60-72 cm (~60 kg), F.U (~2) e gestação: ~9 meses ¹ . Cauda e ferrão curtos, olhos pequenos ² . Distribuição: bacia Amazônica e bacia do Orinoco ³ . (Exemplar do Rio Negro).
<i>Potamotrygon motoro</i>		L.D 39-44 cm, F.U (~7) e gestação: ~6 meses ¹ . Disco sub-circular de cor marrom com ocelos ² . Distribuição: bacia Amazônica, Orinoco e Paraná ³ . (Exemplar do Rio Negro)
<i>Potamotrygon orbignyi</i>		L.D 39-44 cm, F.U (~2) e gestação: ~6 meses ¹ . Sulco labial profundo e trabéculas brancas e pretas na cauda ⁴ . Distribuição: bacia Amazônica e Orinoco ³ . (Exemplar de Colares).
<i>Potamotrygon aff. orbignyi</i>		L.D 39-44 cm, F.U (~2) e gestação: ~6 meses ¹ . Disco sub-circular com retículos hexagonais ² . Distribuição: bacia Amazônica e Orinoco ³ . (Exemplar capturado em Mariuá, no Rio Negro).
<i>Potamotrygon sp. (cururu)</i>		L.D 16-17 cm, F.U (~2) e gestação: ~3 meses ¹ . Disco sub-circular de cor marrom e pigmentação preta na forma de letra ômega invertida ² . Endêmica na bacia do Rio Negro ² .
<i>Potamotrygon schroederi</i>		L.D 42-44 cm, F.U (~2) e gestação: ~6 meses ¹ . Disco oval de cor marrom com pintas amarelas ou laranjas ² . Endêmica das bacias do Rio Negro e Orinoco ³ . (Exemplar do Rio Negro).
<i>Potamotrygon scobina</i>		L.D 35-40 cm e F.U (~6) ¹ . Disco circular com coloração na forma de spot ou roseta ⁴ . Distribuição: bacia Amazônica ^{3,4} . (Exemplar capturado em Colares, Baía de Marajó).

L.D= largura (diâmetro) do disco na maturidade sexual (macho-fêmea); F.U= fecundidade uterina. ¹Charvet-Almeida et al. (2005a); ²Araújo et al. (2004b); ³Martin (2005); ⁴Almeida (2003).

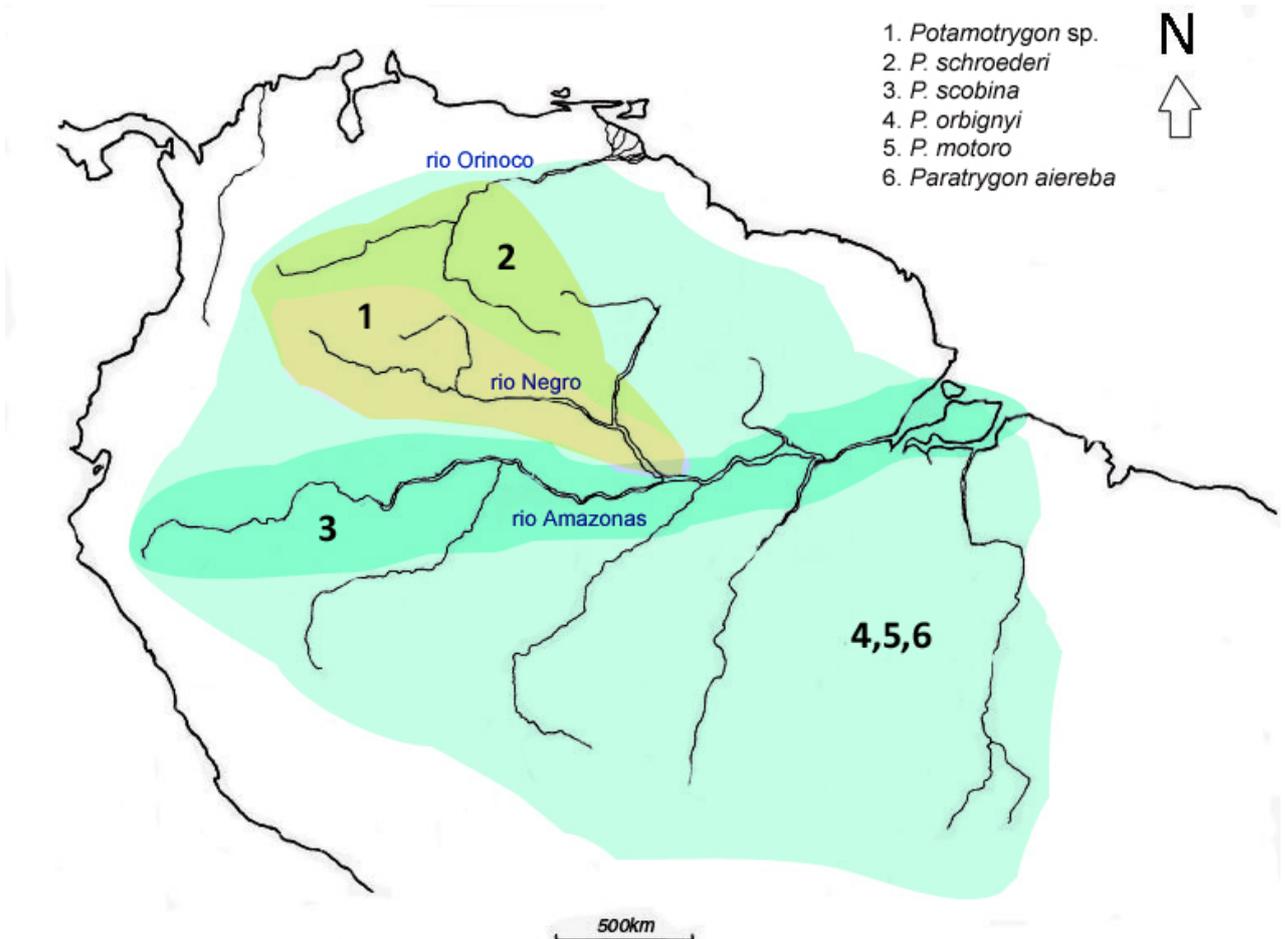
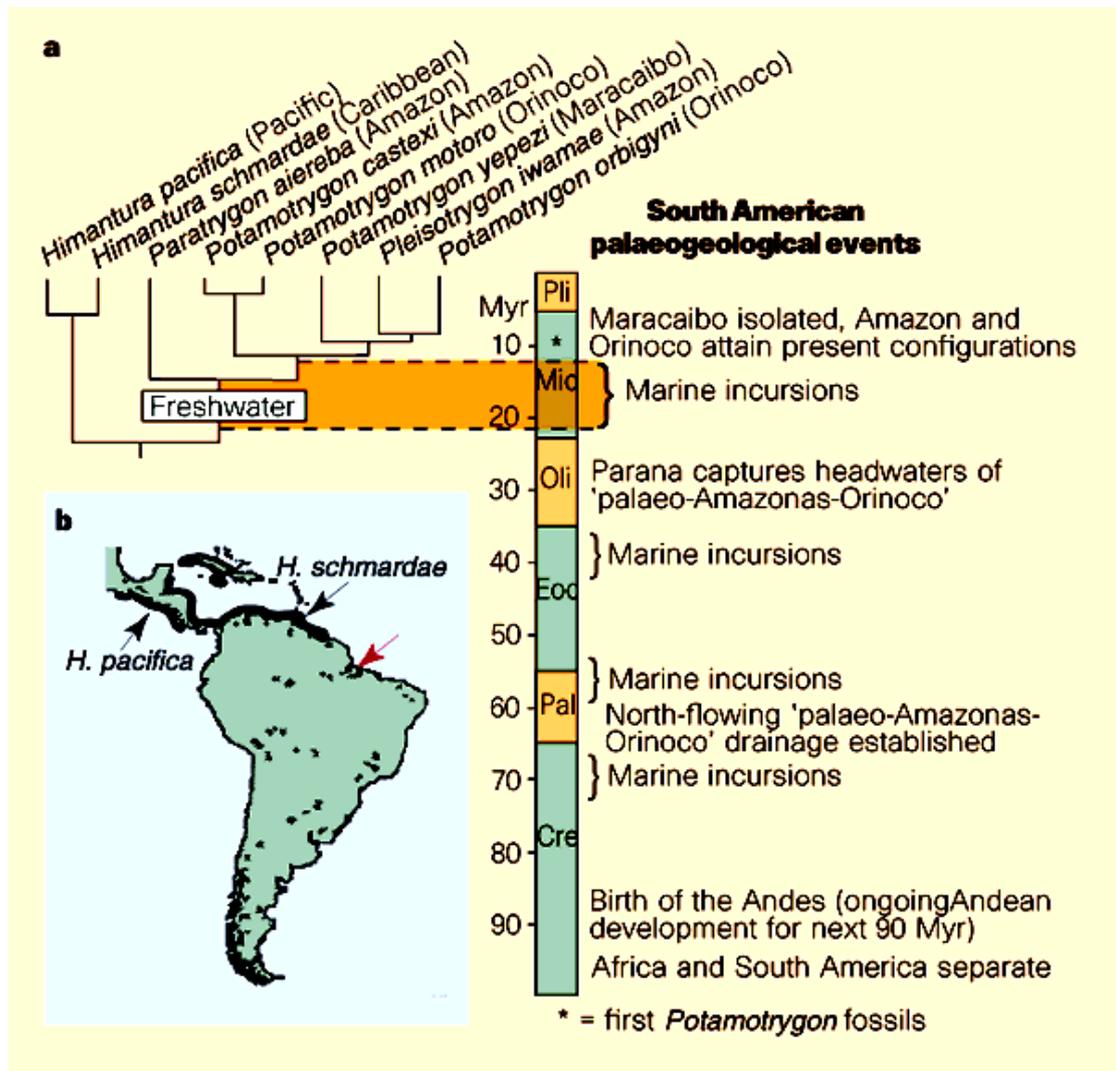


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de Potamotrygonidae utilizados neste estudo: 1. *Potamotrygon* sp. - arraia cururu (endêmica da bacia do Rio Negro); 2. *Potamotrygon schroederi* - arraia schoederi (bacias do Rio Negro e do Orinoco); 3. *Potamotrygon scobina* (sistema Solimões/Amazonas); 4. *Potamotrygon orbignyi* – arraia branca, arraia de praia (bacia Amazônica); 5. *Potamorygon motoro* – arraia motoro (bacias Amazônica, do Orinoco e do Paraná); 6. *Paratrygon aiereba* – arraia nari-nari (bacias Amazônica e do Orinoco).



(Retirado de Lovejoy et al., 1998)

Figura 2. (a) Hipótese filogenética e (b) biogeografia histórica das arraias de água doce, segundo Lovejoy et al. (1998). Os autores propõem que sucessivas incursões marinhas podem ter favorecido o estabelecimento de peixes invasores marinhos na América do Sul. Sendo que, para os ancestrais dos Potamotrygonidae, a invasão pôde ter ocorrido pelo mar do Caribe, provavelmente pelo estreito onde hoje é a bacia do Orinoco e seguiu até ao antigo mar Pebasiano, na atual Amazônia Ocidental.

CAPÍTULO 1

A BACIA AMAZÔNICA: HETEROGENEIDADE DE HABITATS E SUAS IMPLICAÇÕES PARA BIOGEOGRAFIA DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE

Palavras-chave: Rio Amazonas, Rio Negro, Rio Tapajós, Variáveis físicas e químicas da água, Zoogeografia de Potamotrygonidae

INTRODUÇÃO

A bacia hidrográfica do Rio Amazonas é reconhecidamente uma das maiores da Terra em área de drenagem ($>7 \times 10^6$ km²), volume de água (175.000 m³/s), extensão (7.025 km), e descarrega $5,5 \times 10^9$ m³/ano de água no oceano. Isto representa cerca de 20% de toda a descarga de água doce do planeta (GIBBS, 1972; MOLINIER et al., 1997). Ao longo de seu curso, o Rio Amazonas é alimentado por mais de 1.000 tributários provenientes de diferentes regiões geológicas. Do ponto de vista hidrogeoquímico, as águas da bacia amazônica são consideradas bastante heterogêneas (SALATI & VOSE, 1984; KONHAUSER et al., 1994).

As primeiras tentativas para classificar as águas amazônicas foram baseadas na sua coloração: águas brancas, pretas e claras foram as denominações iniciais, as quais, posteriormente foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico. Os rios de águas brancas (por exemplo, Rio Solimões/Amazonas e Rio Madeira) são altamente turbidos devido às altas concentrações de sedimentos (>100 mg/L) provenientes dos Andes (RICKEY et al., 1990; AUCOUR et al., 2003). Além disso, são ricos em íons ($[Na^+]$ e $[Ca^{+2}]$ ambos ~ 200 μ M; $[K^+]$ e $[Mg^{+2}]$ ambos ~ 40 μ M) (KONHAUSER et al., 1994; AUCOUR et al., 2003) e com pH próximo da neutralidade (SANTOS & RIBEIRO, 1988). Rios de águas pretas (por exemplo, Rio Negro e rio Uatumã) são extremamente pobres em íons ($[Na^+] < 30$ μ M; $[K^+]$, $[Ca^{+2}]$ e $[Mg^{+2}]$ todos < 8 μ M), ácidos (\sim pH 4-6) e caracterizados pela baixa carga de sedimentos (< 14 mg/L) e altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (~ 12 mg/L) (ver RICKEY et al., 1990; KLÜCHLER et al., 2000; AUCOUR et al., 2003). Finalmente, os rios de águas claras, embora, muitos apresentam coloração verde-azulada (Rio Tapajós, por exemplo) são altamente transparentes, possuem baixa condutividade elétrica (< 20 μ S/cm) e são pobres em íons ($[Na^+] < 50$ μ M; $[K^+]$, $[Ca^{+2}]$ e $[Mg^{+2}]$ todos < 20 μ M) (SANTOS & RIBEIRO, 1988; KONHAUSER et al., 1994). No entanto, a classificação quanto ao padrão de cor só faz sentido quando se comparam os grandes rios amazônicos que apresentam tipicamente estes padrões limnológicos, uma vez que, existem diversos corpos de água com padrões intermediários de difícil classificação (SIOLI, 1984; FURCH, 1984).

Embora muitos sistemas aquáticos tenham sido bem caracterizados limnologicamente, poucos estudos descrevem a variabilidade espacial dessas

variáveis ao longo da calha principal dos maiores rios amazônicos. Santos & Ribeiro (1988) relataram as variações espaciais nos valores de pH, condutividade elétrica e dos principais nutrientes ao longo de um trecho de 2.457 km no rio Solimões. Segundo estes autores, a variabilidade físico-química pode ser atribuída às descargas dos principais tributários que alimentam o canal principal do rio. Essa hipótese foi confirmada posteriormente por Konhauser et al. (1994). Estes autores demonstraram que as diferenças físicas e químicas entre os tributários são influenciadas pela litologia e geoquímica do solo da província onde a sub-bacia se localiza.

A evolução e a diversificação da ictiofauna amazônica estão associadas à história da formação da sua bacia hidrográfica (LUNDBERG et al., 1998). A heterogeneidade ambiental, em parte causada pelo pulso hidrológico e pelas diferenças físicas e químicas tem sido considerada como a principal força seletiva que impulsionou as recentes radiações adaptativas da ictiofauna na Amazônia (JUNK, 1997).

A ictiofauna amazônica é uma das mais ricas do planeta. De acordo com Lundberg et al. (1998), a diversidade íctia na bacia amazônica também pode ser, parcialmente, explicada pelas mudanças paleo-hidrológicas dos rios amazônicos que promoveram a dispersão seguida de especiação alopátrica e/ou por adaptação divergente. Esta teoria é atualmente conhecida como hipótese hidrogeológica (MONTROYA-BURGOS, 2003). Esta hipótese tem sido usada atualmente para explicar os atuais padrões de distribuição de peixes da América Central (BERMINGHAM & MARTIN, 1998) e da América do Sul (LOVEJOY & ARAÚJO, 2000; HUBERT & RENNO, 2006), e também tem sido usada para compreender a história evolutiva das arraias de água doce da família Potamotrygonidae (MARQUES, 2000; TOFOLLI, 2006).

Os potamotrigonídeos têm ampla distribuição na bacia Amazônica e são encontrados em todos os tipos de águas, desde aquelas extremamente diluídas como as do Rio Negro até as águas salobras da plataforma continental no estuário amazônico. Algumas espécies são endêmicas de uma determinada bacia, enquanto outras possuem ampla distribuição (MARTIN, 2004). Portanto, este trabalho descreve a heterogeneidade espacial das variáveis físicas e químicas no pico da cheia dos três mais importantes rios da bacia Amazônica: Rio Amazonas, Rio Negro

e Rio Tapajós (água branca, preta e clara, respectivamente), com implicações sobre o atual padrão de distribuição geográfica das arraias de água doce (Potamotrygonidae). Tais informações podem servir de base para a compreensão dos mecanismos adaptativos da interação organismo-ambiente, além de servir como fundamentação científica para entender os processos de especiação por adaptação divergente ao longo da história evolutiva de algumas espécies de Potamotrygonidae.

MATERIAL E MÉTODOS

Sítios de amostragens

No período de cheia dos rios amazônicos (abril-junho/2007 e abril-maio/2008) foram realizadas excursões em três rios: Amazonas, Negro e Tapajós (Fig. 1). O transecto fluvial seguiu o percurso dos barcos da frota comercial da região. De cada ponto foram coletadas quatro subamostras de água da coluna superficial com auxílio de uma garrafa de polietileno. Cada subamostra estava separada espacialmente em aproximadamente 1 km uma da outra. As variáveis físicas e químicas: pH, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos (TDS) foram imediatamente analisados por meio de sondas de um multiparâmetro CONSORT C535. Todos os pontos de coleta foram georreferenciados e a distâncias relativas à foz (ou ao estuário, no caso do Rio Amazonas) foram calculadas utilizando um GPS da marca GARMIN PLUS III.

No apêndice I estão apresentadas as informações adicionais sobre os pontos de coleta ao longo do Rio Amazonas (pontos analisados, georreferência e distância da foz do rio). O trecho estudado foi da cidade de Manaus, na foz do Rio Negro (Estado do Amazonas) até a ilha de Colares, no estuário amazônico, na Baía de Marajó (Estado do Pará). O percurso estudado compreende cerca 1.540 km de extensão do Rio Amazonas. O transecto fluvial no Rio Negro com um percurso de 480 km de extensão foi realizado do Arquipélago de Mariuá, Médio Rio Negro (Barcelos, Estado do Amazonas) até a foz do Rio Negro em frente à cidade de Manaus (ver apêndice II para detalhes dos pontos analisados). O percurso de 320 km no Rio Tapajós compreende desde as cachoeiras da comunidade de São Luís

do Tapajós (Itaituba, PA) até a cidade de Santarém, na foz do Rio Tapajós (ver apêndice III para detalhes dos pontos estudados).

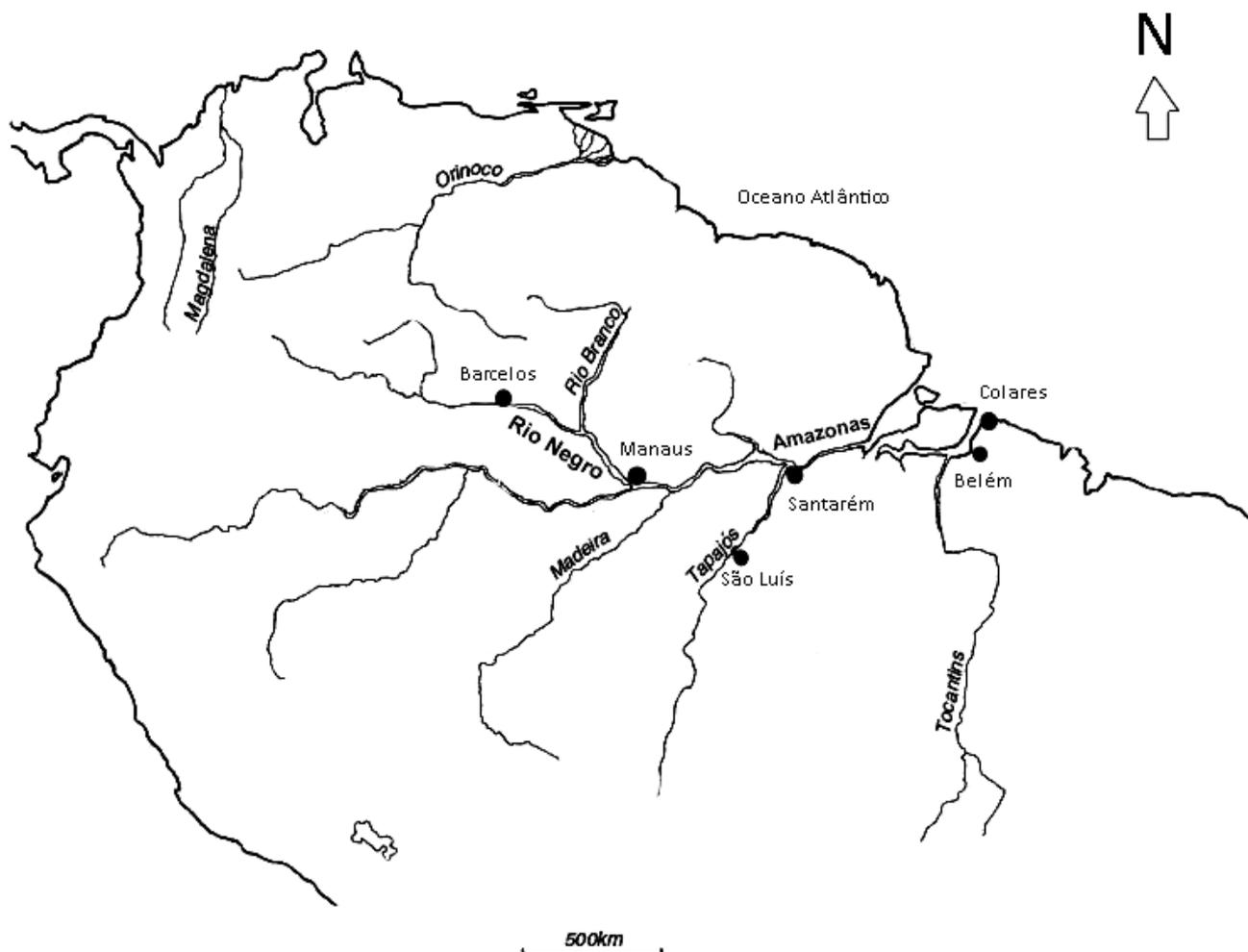


Figura 1. Localização dos três rios (Amazonas, Negro e Tapajós) analisados neste estudo. Os detalhes dos pontos amostrados em cada rio estão descritos nos apêndices I, II e III (Anexos).

Coleta dos animais

As arraias de água doce foram capturadas no Médio Rio Negro (S00°58'/W62°53'; região de Barcelos, AM); no Rio Solimões/Amazonas (S03°51'/W62°45'; Lago Janauacá, no município de Manaquiri); no Rio Tapajós (S04°16'/W55°59'; região de São Luís do Tapajós, no município de Itaituba-PA) e na Baía de Marajó (S00°55'/W48°17'; no estuário amazônico, região de Colares-PA).

Os animais foram coletados durante o período noturno com uso de rapichés, puçás e espinhéis. Na Baía de Marajó, no estuário Amazônico (Ilha de Colares), as arraias também foram coletadas na praia do Humaitá no final da tarde durante a vazante da maré por meio de rede de arrasto. Em todos os locais, após as capturas foram realizadas biometrias e identificação dos animais. Os demais dados sobre distribuição biogeográfica dos potamotrigonídeos foram baseados nos estudos de Martin (2004).

Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média±D.P (desvio padrão). Uma análise de correlação foi feita entre os valores de pH e condutividade elétrica das águas dos três rios amostrados. O teste *t*-pareado de Student foi utilizado para testar as diferenças entre os valores de pH e condutividade elétrica da água durante a preamar e baixamar na Praia do Humaitá, Ilha de Colares, Baía de Marajó. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados descrevem a variabilidade longitudinal dos valores de pH, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água dos rios Amazonas, Negro e Tapajós. Porém, é importante lembrar que estes dados representam um retrato espacial das variáveis físicas e químicas no período da cheia (abril-junho/2007 e abril-maio/2008). Portanto, não descrevem as variações durante o pulso hidrológico, além disso, não descrevem a variabilidade lateral do canal principal, tampouco, as estratificações verticais na coluna de água. Um resumo geral das características físicas e químicas, bem como da ocorrência de Potamotrygonidae nos rios estudados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos valores (média±desvio padrão; min-max; número amostral) das variáveis físicas e químicas da água do Rio Amazonas, Rio Negro e Rio Tapajós e as espécies de Potamotrygonidae que ocorrem em suas respectivas bacias hidrográficas.

Rios	pH	Condutividade (µS/cm)	TDS (mg/L)	Potamotrygonidae
Rio Amazonas	6,6±0,2	44,8±24,8	23,9±17,8	<i>Paratrygon aiereba</i> [#]
	(6,0-6,8)	(17,4-104,3)	(8,8-55,0)	<i>Plesiotrygon iwamae</i> [*]
	N=40	N=40	N=40	<i>Potamotrygon motoro</i> [#]
				<i>P. orbigny</i> ^{#&}
				<i>P. scobina</i> ^{#&}
				<i>P. ocellata</i> [*]
				<i>P. humerosa</i> [*]
			<i>P. constellata</i> [*]	
Rio Negro	4,5±0,9	17,0±15,2	7,1±6,7	<i>Paratrygon aiereba</i> [#]
	(3,7-6,4)	(7,7-35,4)	(4,4-19,4)	<i>P. motoro</i> [#]
	N=15	N=15	N=15	<i>P. aff. orbigny</i> [#]
				<i>P. sp. (arraia cururu) (sp. n.)</i> [#]
				<i>P. schroeder</i> [#]
Rio Tapajós	6,5±0,4	14,4±13,1	7,7±5,6	<i>Paratrygon aiereba</i> [#]
	(6,0-8,0)	(11,7-25,2)	(6,2-13,3)	<i>Potamotrygon</i> sp1, sp. n. (arraia P14-Itaituba) [¥]
	N=23	N=23	N=23	<i>Potamotrygon</i> sp2, sp. n. (arraia jabuti) [¥]
				<i>Potamotrygon</i> sp3, sp. n. ^{#@}
				<i>P. motoro</i> [¥]
				<i>P. orbigny</i> [#]

[#]Exemplares capturados *in situ*; ^{*}Registro de ocorrência segundo Martin (2004); [&]Exemplares capturados no estuário amazônico; [¥]Maria Lúcia Góes Araújo, comunicação pessoal; [@]Espécie nova (Marcelo de Carvalho, comunicação pessoal).

Rio Amazonas

O Rio Amazonas é um típico rio de água branca e ao entrar em território brasileiro recebe o nome de rio Solimões, após receber as águas do Rio Negro passa a ser chamado de Rio Amazonas até seu estuário no Arquipélago de Marajó. Na Fig. 2 estão apresentadas as variações espaciais das variáveis físicas e químicas de um trecho no Rio Amazonas, desde a cidade de Manaus (Foz do Rio Negro) até a Ilha de Colares (na Baía de Marajó, estuário amazônico). Nas duas amostragens (maio/2007 e maio/2008) as flutuações das variáveis físicas e químicas da água tendem a ser semelhantes; porém, os valores de condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos (TDS) no ano de 2008 estão ligeiramente mais baixos que no ano anterior. Dentre as variáveis analisadas, o pH tende a ser o mais estável ao longo do percurso estudado, porém, o Rio Negro e rio Guamá tendem a reduzir o pH das águas do Rio Amazonas nas margens esquerda e direita, respectivamente. Por outro lado, a condutividade e TDS apresentam uma tendência para redução em direção ao estuário amazônico. Na Ilha de Colares, a influência da maré altera diariamente as variáveis físicas e químicas da água (ver Fig. 3), sendo que a condutividade elétrica foi o parâmetro físico-químico mais afetado pela dinâmica das marés (Fig. 4). A condrofauna do sistema Solimões/Amazonas é diversa. O canal principal possui uma espécie típica da calha do rio, *Plesiotrygon iwamae* (M.L.G. Araújo, comunicação pessoal). Porém, durante as campanhas foram capturados apenas exemplares de *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* no Lago Janauacá, um lago que recebe regularmente água do canal principal do rio Solimões durante o período da cheia. Além disso, foram capturadas as espécies *Potamotrygon scobina* e *P. orbignyi* no estuário amazônico na Baía de Marajó.



Várzea no Arquipélago de Marajó-PA

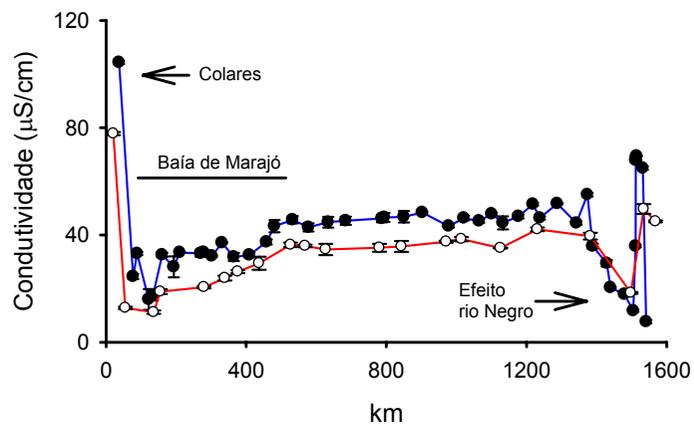
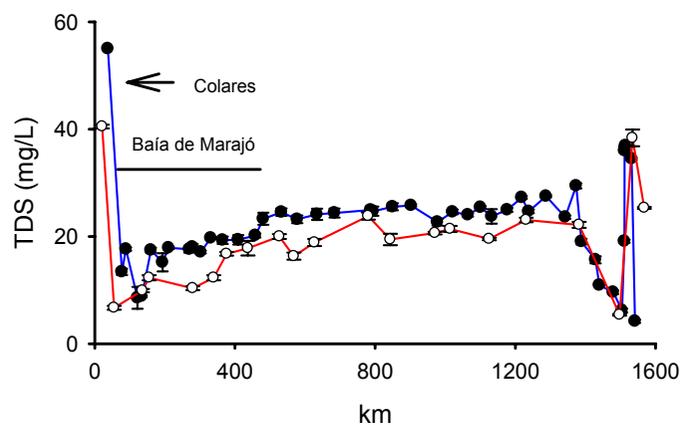
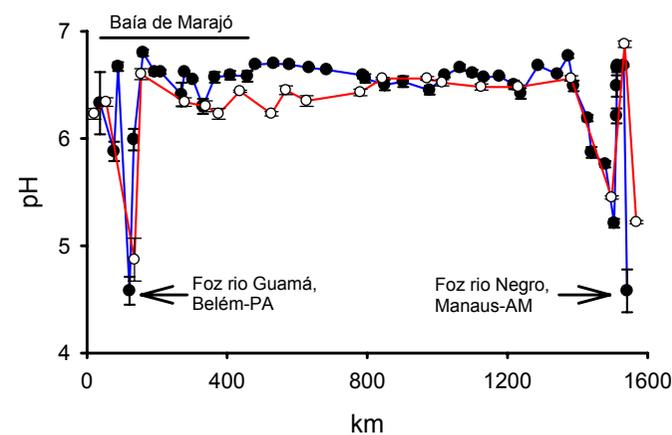


Figura 2. Rio Amazonas: cor “barrenta” (água branca), rico em sedimentos andinos. As áreas inundadas pelas águas brancas são denominadas de Várzeas. Variação espacial nos valores (média±desvio padrão) de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Amazonas ao longo de um trecho de 1.540 km em Maio/2007 (linha azul e círculo preto) e Maio/2008 (linha vermelha e círculo claro).

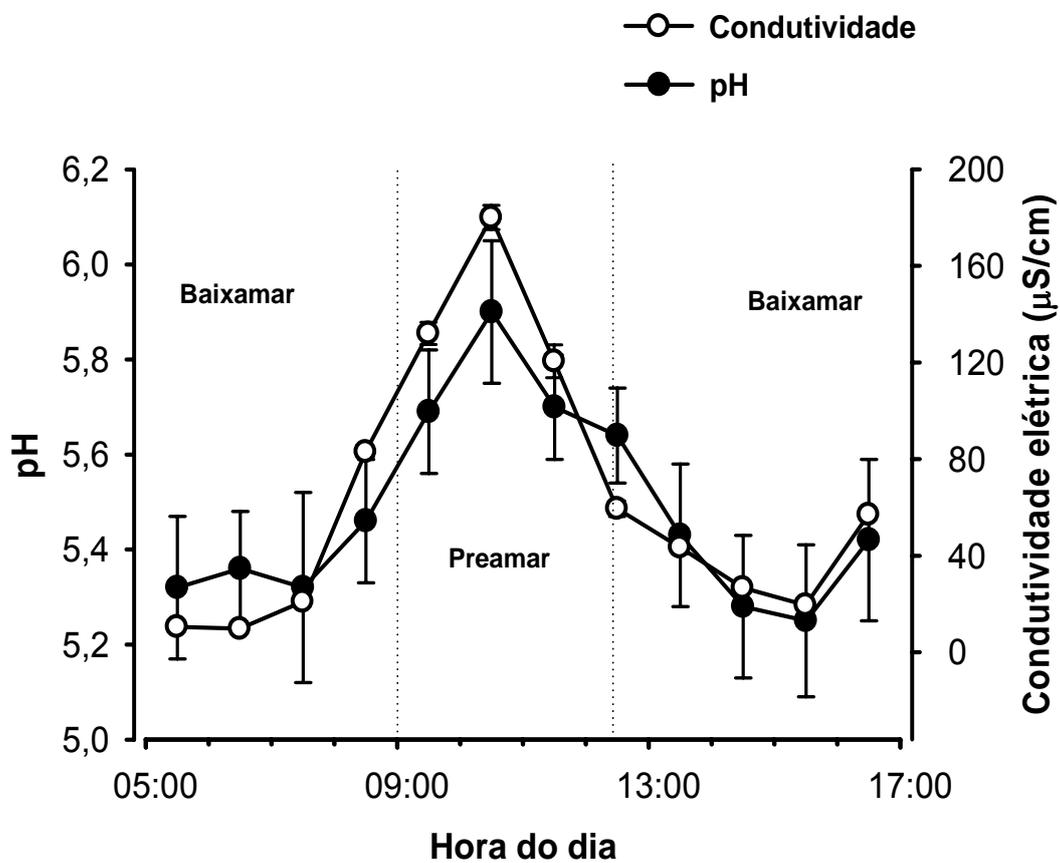


Figura 3. Variação diária do pH e condutividade elétrica da água na praia do Humaitá, Ilha de Colares, Baía de Marajó (estuário amazônico). Valores médios analisados no mês de Maio de 2007.

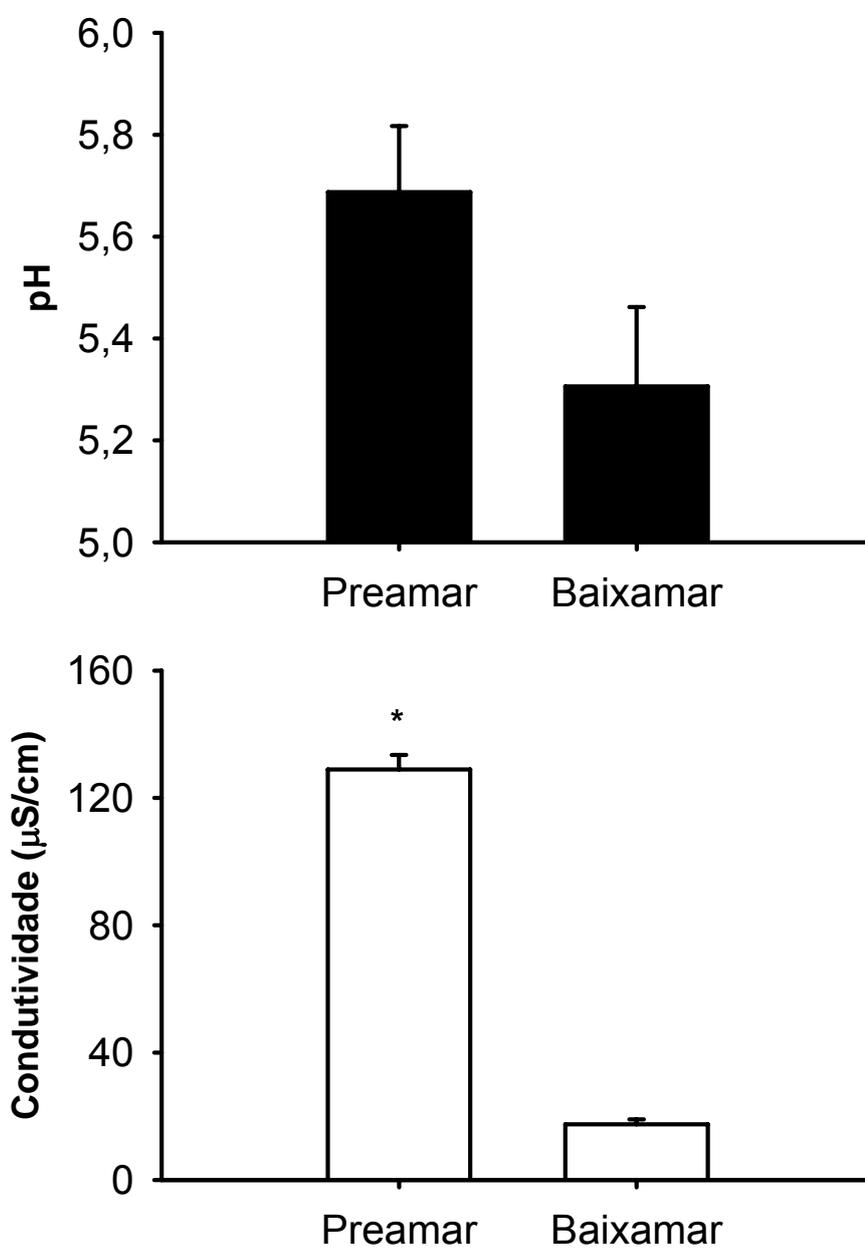


Figura 4. Variação do pH e condutividade elétrica da água durante a preamar e baixamar na praia do Humaitá, Ilha de Colares, Baía de Marajó (PA). Os valores representam a média de quatro dias de observação no mês de Maio de 2007. (*) indica diferença significativa (teste *t*-pareado de Student, $P < 0,05$).

Rio Negro

As variações longitudinais das características físicas e químicas das águas do Rio Negro em março de 2007 e abril de 2008 estão apresentados na Figura 5. O perfil longitudinal das variáveis limnológicas apresenta-se semelhante nos dois períodos de amostragens. Tipicamente, as águas do Rio Negro são ácidas, baixa condutividade elétrica (~17 $\mu\text{S/cm}$) e poucos sólidos totais dissolvidos (~7,1 mg/L). Estas duas variáveis estão ainda mais baixos no ano de 2008. Uma correlação entre pH e condutividade elétrica da água no arquipélago de Mariuá (ver Fig. 7) mostra uma tendência para aumento da condutividade elétrica na medida em que diminui o pH da água ($n=15$; $r^2=0,80$; $P<0,05$ – março/2007 e $n=21$; $r^2=0,72$; $P<0,05$ – abril/2008). Em Mariuá, o Rio Demini deságua na margem esquerda do Rio Negro (S00°46'720" e W62°56'609") alterando bruscamente as variáveis físicas e químicas. Após este trecho, o Rio Negro recebe nova descarga de água esverdeada proveniente do Rio Branco na altura das coordenadas S01°23'693" e W61°48'693". Neste local, observa-se uma brusca elevação do pH, da condutividade e TDS. No baixo curso do Rio Negro, próximo à cidade de Manaus, as variáveis físicas e químicas da água tendem a ser semelhantes àqueles encontrados no arquipélago de Mariuá.

No geral, os valores de pH, condutividade elétrica e TDS demonstram que os habitats no Médio Rio Negro são espacialmente heterogêneos. Um resumo dos principais sítios de pesca e dos habitats preferenciais para cada uma das cinco espécies de potamotrigonídeos comuns naquela região está apresentado na Tabela 2. As espécies *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon aff. orbignyi* são normalmente capturadas nos mesmos microhabitats, geralmente nas praias, em águas rasas, correntes, límpidas e com poucos solutos dissolvidos (TDS entre 2,4-9,1 mg/L) e acidez variando de pH 3,7-4,8. Por outro lado, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon sp.* (arraia cururu) são freqüentemente capturadas no mesmo microhabitat, normalmente em águas estagnadas dos igapós com liteira submersa, pH 4,4-5,5 e condutividade elétrica entre 16,3-35,4 $\mu\text{S/cm}$.

Rio Tapajós

O Rio Tapajós é o mais conhecido rio de água clara da bacia amazônica. As variações espaciais nos valores de pH, condutividade e TDS nos dois períodos de amostragens (junho/2007 e maio/2008) estão apresentados na Fig. 6. Na primeira amostragem (2007), próximo da foz com o Rio Amazonas as águas do Rio Tapajós demonstraram sofrer forte influência das águas brancas do Rio Amazonas. Neste local, as variáveis físicas e químicas da água do Rio Tapajós foram semelhantes aos encontrados no Rio Amazonas. Nas amostragens do ano de 2008, as variáveis limnológicas se apresentaram mais homogêneas ao longo do transecto, exceto os picos da condutividade e TDS observados no município de Aveiros (Estado do Pará). No geral, as águas do Rio Tapajós possuem características físicas e químicas intermediárias entre o Rio Amazonas e Rio Negro (Fig. 7). Nas campanhas realizadas neste rio foram capturadas apenas as espécies *Paratrygon aiereba* e *P. orbignyi*, além de uma espécie não identificada (sp. n.) *Potamotrygon* sp.3 (Marcelo de Carvalho, comunicação pessoal). Duas espécies novas ainda sem descrição nominal (*Potamotrygon* sp.1, “pretinha”-P14 Itaituba; *Potamotrygon* sp.2, arraia-jabuti) são comuns naquela área (Maria Lúcia Góes Araújo, comunicação pessoal). No entanto, estas espécies não foram capturadas durante as campanhas ao Rio Tapajós.



Igapó no Arquipélago de Mariuá-AM

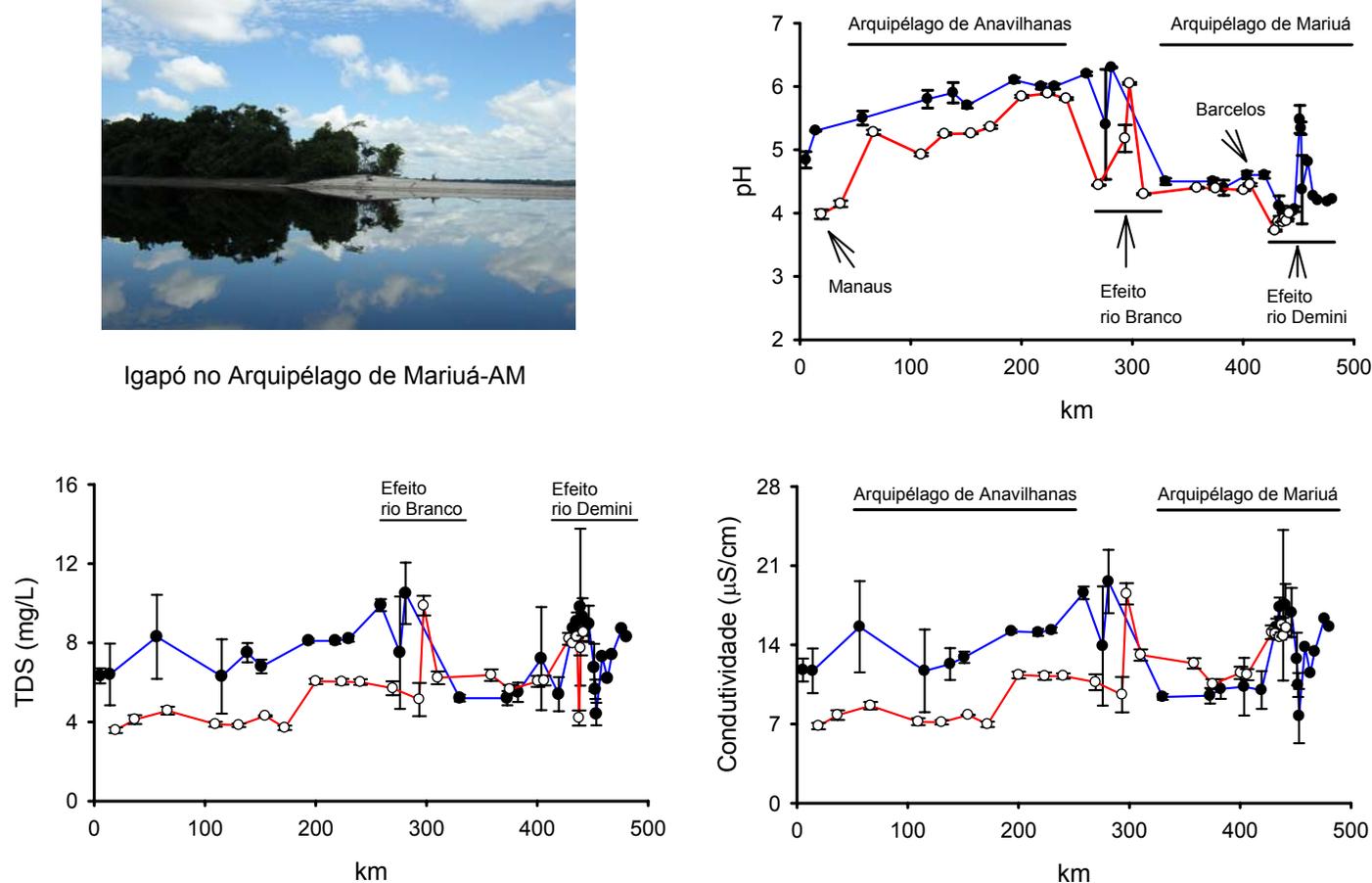


Figura 5. Rio Negro: água preta, ácida, pobre em íons e rica em matéria orgânica dissolvida. As florestas inundadas pelas águas pretas são localmente denominadas de Igapós. Variação espacial (média \pm desvio padrão) nos valores de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Negro ao longo de um percurso de 480 km. Março/2007 (linha azul e círculo preto) e Abril/2008 (linha vermelha e círculo claro).

Tabela 2. Resumo dos principais sítios de pesca, variáveis físicas e químicas dos locais de captura e habitats preferenciais dos juvenis de cinco espécies de arraias de água doce (Potamotrygonidae) encontradas no Médio Rio Negro, Arquipélago de Mariuá.

Sítios de coleta	pH	Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	TDS (mg/L)	Habitats	Substrato	Potamotrygonidae
Praia do Uiripipi	4,4 \pm 0,2	17,1 \pm 0,9	9,1 \pm 0,8			
Canal do Palataqui	3,9 \pm 0,3	4,2 \pm 2,3	2,4 \pm 1,3	Praia	Arenoso	<i>Paratrygon aiereba</i>
Ilha do Aracu	4,3 \pm 0,3	9,4 \pm 1,2	5,2 \pm 1,1	Lótico		
Ilha do Cururu	4,8 \pm 0,1	16,8 \pm 1,1	8,9 \pm 0,1			
Ig. Zamula	4,5 \pm 0,4	17,5 \pm 3,2	13,0 \pm 2,2			
Rio Itu	4,9 \pm 0,5	35,4 \pm 10,1	17,2 \pm 7,9		Liteira	
Rio Cuiuni	5,3 \pm 0,1	26,3 \pm 0,5	12,8 \pm 0,2	Igapó	submersa	
Rio Arirahá	4,3 \pm 0,4	16,5 \pm 3,4	9,1 \pm 2,1	Lêntico	Areno-	<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)
Ig. Daraquá	5,5 \pm 0,7	33,6 \pm 9,7	19,4 \pm 8,3		lodoso	
Ig. Zalala	4,4 \pm 0,1	16,3 \pm 1,7	8,7 \pm 0,9			
Ilha do Aracu	4,2 \pm 0,3	17,4 \pm 2,2	9,3 \pm 0,2			
Paraná do Curupira	4,8 \pm 0,4	18,6 \pm 2,1	9,9 \pm 0,5	Praia	Arenoso	<i>Potamotrygon schroederi</i>
Paraná do Peixe-Boi	4,5 \pm 0,2	17,1 \pm 3,8	8,9 \pm 2,0	Lótico		
Boca do Rio Demini	6,4 \pm 0,1	20,9 \pm 0,1	11,1 \pm 0,1		Liteira	
Ig. Zamula	4,6 \pm 0,3	18,7 \pm 1,2	17,3 \pm 1,0	Praia	Arenoso	<i>Potamotrygon motoro</i>
Ig. Daraquá	5,5 \pm 0,7	33,6 \pm 9,7	19,4 \pm 8,3	Igapó	Areno-	
Rio Itu	4,9 \pm 0,5	35,4 \pm 10,1	17,2 \pm 7,9	Lêntico/Lótico	lodoso	
Boca do Rio Cuiuni	4,8 \pm 0,1	18,6 \pm 0,9	9,9 \pm 0,5			
Cazurucu	4,3 \pm 0,4	9,7 \pm 3,2	6,7 \pm 0,8	Praia		<i>Potamotrygon</i> aff. <i>orbigny</i>
Ilha do Buxará	4,4 \pm 0,5	19,9 \pm 2,1	10,0 \pm 2,3	Lótico	Arenoso	
Ig. Baruri	4,8 \pm 0,1	20,3 \pm 2,5	10,6 \pm 1,1			



Cachoeiras de São Luís do Tapajós, Itaituba-PA

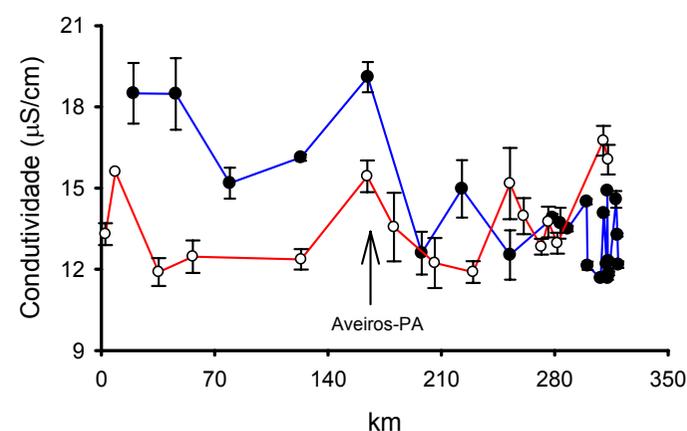
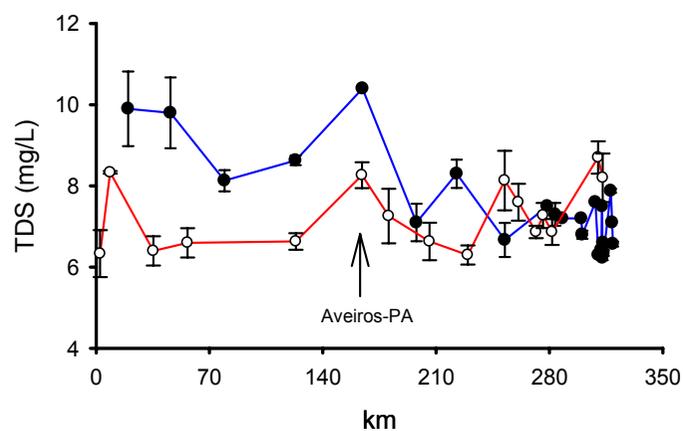
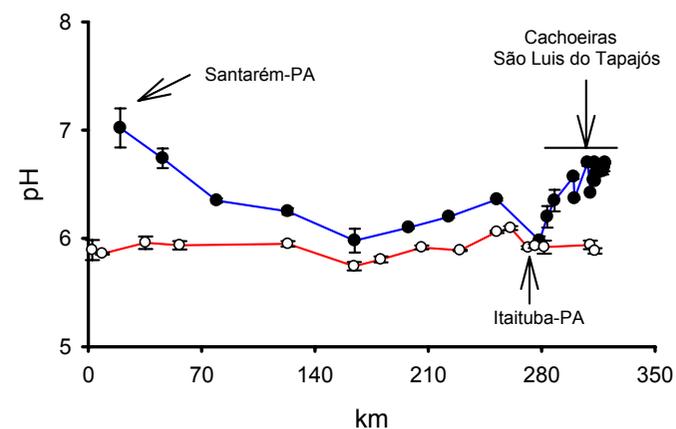


Figura 6. Rio Tapajós: água em tom verde-azulada. O ribeirinho também denomina as áreas de florestas inundadas pelas águas claras de Igapós. Variação espacial nos valores de pH, condutividade e sólidos totais dissolvidos (TDS) na superfície da água do Rio Tapajós ao longo de um trecho de 320 km. Junho/2007 (linha azul e círculo preto) e Maio/2008 (linha vermelha e círculo claro).

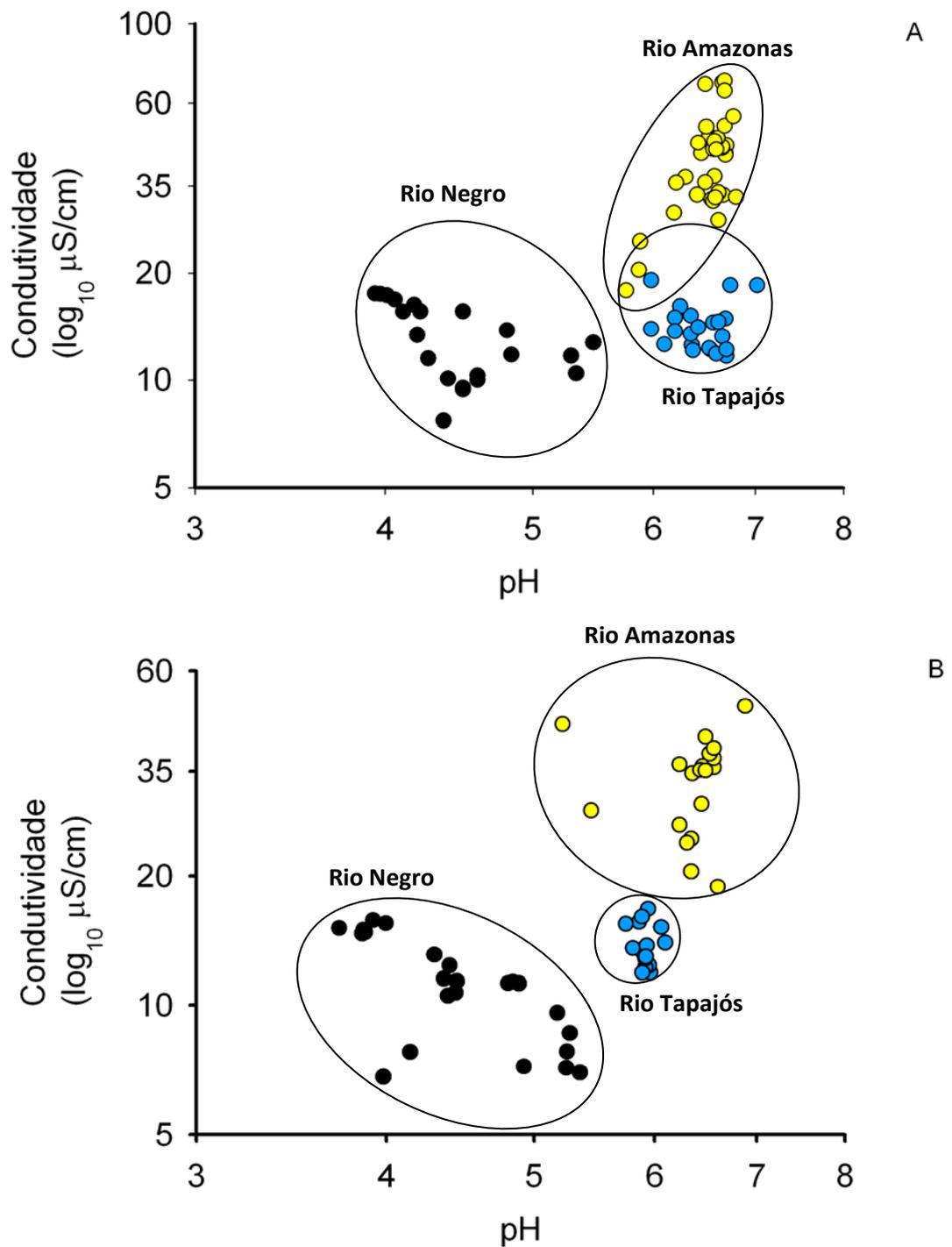


Figura 7. Correlação entre os valores de pH e condutividade elétrica (\log_{10}) dos rios Amazonas (círculo vermelho); Negro (triângulo invertido preto) e Tapajós (quadrado azul) nas amostragens realizadas em abril-junho/2007 (A) e abril-maio/2008 (B). Notar que as características físicas e químicas do Rio Tapajós são intermediárias entre as dos rios Amazonas e Negro. Observar também uma tendência para redução da condutividade elétrica, na medida em que aumenta o pH da água do Rio Negro. Esta correlação foi fortemente negativa nas amostragens realizadas em Março/2007 ($n=15$; $r^2=0,80$; $P < 0,05$) e em Abril/2008 ($n=21$; $r^2= 0,72$; $P < 0,05$).

DISCUSSÃO

A bacia hidrográfica do Amazonas, a maior do mundo, depende quase que exclusivamente do regime das chuvas para o enchimento. O pico da cheia ocorre normalmente no mês de junho. Nesse período, o rio Solimões/Amazonas recebe um enorme volume de água proveniente de cerca de mil afluentes (GIBBS, 1972). Com isso, cria-se um verdadeiro gradiente espacial em algumas variáveis físicas e químicas. Além do mais, nos anos em que as enchentes dos rios são mais intensas, o imenso volume de água provavelmente provoca uma diluição dos solutos e, conseqüentemente afeta as variáveis físicas e químicas. Possivelmente, por isso a condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos (TDS) na enchente de 2008 estão ligeiramente mais baixos do que aqueles analisados na cheia do ano anterior.

O Rio Amazonas recebe de vários tributários um grande volume de águas ácidas e diluídas, no entanto, observa-se uma tendência para estabilização do pH ao longo do trecho de 1.540 km. Por outro lado, há uma nítida tendência para redução da condutividade e sólidos dissolvidos totais em direção ao estuário. Santos & Ribeiro (1988) também observaram esta mesma tendência em um trecho de 2.457 km, das cidades de fronteira Letícia-Tabatinga (Colômbia-Brasil) até a cidade de Santarém (Estado do Pará). As descargas dos rios de água preta, como o Rio Negro, rio Urubu e rio Uatumã e aquelas provenientes dos rios de água clara, como o Rio Tapajós e Rio Xingu provocam uma gradual diluição das águas do Rio Amazonas até a sua desembocadura no arquipélago de Marajó. Rio de água preta e rio de água clara são relativamente pobres em íons e possuem baixa condutividade (FURCH et al., 1982). Apesar da gradual diluição do Rio Amazonas da nascente ao estuário, as águas do canal principal parecem “tamponar” o efeito do pH das águas dos tributários fortemente ácidos. No geral, há uma clara tendência para estabilização do pH ao longo da calha do Rio Amazonas. Provavelmente, isto pode estar associado à maior quantidade de metais alcalinos e alcalinos terrosos, como sódio (181,7 μM), potássio (27,9 μM), cálcio (208,0 μM) e magnésio (43,2 μM) que o rio carrega quando comparados aos baixos valores encontrados para o Rio Negro (Na^+ 29,6; K^+ 7,4; Ca^{+2} 8,2 e Mg^{+2} 5,8 μM) (AUCOUR et al., 2003). Por isso, o rio Solimões é também classificado como rio de “água carbonatada” (FURCH, 1984; KONHAUSER et al., 1994). Embora o canal principal do rio não sofra profundas

modificações, alterações pronunciadas de pH só ocorrem nas margens do Rio Amazonas nos locais onde o rio recebe grande volume de águas ácidas, tais como na foz do Rio Negro (~pH 4,0-4,5), do rio Urubu, do rio Uatumã (~pH 5,0-5,5) e do rio Guamá (~pH 4,6-4,8) que deságua na Baía de Marajó, no estuário amazônico.

O estuário do Rio Amazonas tem duas partes: o canal do Norte e o do Sul. No canal do Sul, as águas do Rio Amazonas formam uma série de canais naturais (o Estreito de Breves) à Sudoeste do arquipélago de Marajó criando um antebraço do Rio Amazonas conhecido como Rio Pará. Este rio recebe água do rio Tocantins para formar a Baía de Marajó, e, finalmente, recebe descarga de águas ácidas e diluídas do rio Guamá. No período de cheia, as águas do Rio Xingu e Rio Tocantins diluem as águas do Rio Amazonas que forma o estuário amazônico na Baía de Marajó (CORDEIRO, 1987). Por isso, os valores de condutividade e TDS das águas do canal Sul são relativamente baixos quando comparados às águas que fluem pelo Estreito de Breves.

O Rio Pará sofre forte influência das marés, principalmente no período de estiagem (seca) quando a maré provoca inversão da corrente em toda extensão do Rio Pará (PINHEIRO, 1987). Nesta região, a influência salina impõe características típicas de manguezais, como pode ser observado em todas as margens ao longo da baía de Marajó. Mesmo no período de cheia dos rios amazônicos, as variações diárias da salinidade durante a amplitude de maré na Ilha de Colares sugerem que a condrofauna local pode ser fortemente influenciada pela língua salina. Interessante, mas essa região possui uma das maiores densidades populacional de arraiais de água doce da bacia Amazônica (CHARVET-ALMEIDA, 2001; ALMEIDA, 2003).

A ilha de Colares localiza-se na margem direita do canal sul do estuário amazônico. A condrofauna da região é representada pelas espécies: *Paratrygon aiereba*, *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon orbignyi* e *Potamotrygon scobina*, sendo que as duas últimas espécies compreendem 90% do total de arraiais capturadas naquela área (CHARVET-ALMEIDA, 2001). Durante a seca dos rios amazônicos, a língua salina que se desloca para o interior da Baía de Marajó aumenta a salinidade das águas de Colares de 0,1 ppm para 7 ppm (ALMEIDA, 2003). Ainda assim, os potamotrigonídeos não desaparecem completamente (CHARVET-ALMEIDA, 2001; ALMEIDA, 2003). Provavelmente, *Potamotrygon orbignyi*, *P. scobina* e *Plesiotrygon iwamae* estão adaptados às fortes variações

diárias de salinidade. As características morfofuncionais das brânquias de *P. orbignyi* e *P. scobina* estão discutidas no Capítulo 2 deste estudo, enquanto os aspectos osmorregulatórios estão abordados no Capítulo 4. No caso de *Paratrygon aiereba*, embora fisiologicamente plástica (ver Capítulo 6), há evidências de que seja a espécie de arraia da Baía de Marajó mais sensível às variações extremas de salinidade (CHARVET-ALMEIDA, 2001).

A aparente ausência de representantes dos gêneros *Potamotrygon* e *Paratrygon* em São Caetano de Odivelas (distante 37 km de Colares) indica que a região de Colares parece ser o limite máximo da tolerância à salinidade, e conseqüentemente o extremo da distribuição geográfica para estes dois gêneros. As águas estuarinas em São Caetano de Odivelas são extremamente salobras (>18 ppm) para os gêneros *Potamotrygon* e *Paratrygon*. Porém, há registro de captura de *Plesiotrygon iwamae* na plataforma continental do estuário amazônico, em ambiente cuja salinidade pode chegar a 25 ppm no período de estiagem (TORRES, 1999).

Estudos sobre história evolutiva dos potamotrigonídeos sugerem que *Plesiotrygon iwamae* é espécie-irmã de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) (Marques, 2000) e de *Potamotrygon schroederi* (TOFOLLI, 2006). Na Amazônia, *Plesiotrygon iwamae* é restrita à calha (e lagos) do sistema Solimões/Amazonas (água branca), enquanto *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *P. schroederi* são endêmicas de rios de água preta, como o Rio Negro e os tributários da bacia do Orinoco (MARTIN, 2004). Recentemente Tofolli (2006) sugeriu que as diferenças físicas e químicas entre os dois tipos de águas podem ter favorecido a especiação por adaptação divergente. Existem evidências fisiológicas que suportam tal teoria, por exemplo, peixes teleósteos como os caracídeos *Gymnocorymbus ternetzi*, *Paracheirodon innesi* (GONZALEZ et al., 1997; GONZALEZ & PREEST, 1999), *Paracheirodon axelroldi* (GONZALEZ & WILSON, 2001) e o elasmobrânquio, *Potamotrygon* sp. (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003; ver Capítulo 5 deste estudo) nativos do Rio Negro possuem especializações fisiológicas que lhes permitem manter um eficiente transporte iônico nessas águas ácidas e extremamente diluídas.

Na América do Sul, *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro* têm ampla distribuição geográfica. *P. motoro* é encontrada desde a bacia do Orinoco até a bacia do Paraná, enquanto que *Paratrygon aiereba* ocorre em todos os rios da bacia Amazônica e na bacia do Orinoco (MARTIN, 2004). *P. aiereba* possui algumas

estratégias osmorregulatórias que podem ter sido importantes para esta espécie colonizar diferentes ambientes aquáticos na Amazônia (ver Capítulo 6).

O Rio Negro é o maior rio de água preta da bacia Amazônica. Este rio possui uma das águas mais ácidas e diluídas que se conhece. De fato, em algumas amostragens foram registrados valores de pH 3,7 e TDS <3 mg/L. Entretanto, em algumas áreas a condutividade elétrica não era tão baixa como esperado para um rio pobre em eletrólitos. Sugere-se que neste local a condutividade elétrica possa estar associada à concentração de H⁺ da água. Por exemplo, habitats mais ácidos, como os igapós localizados nas ilhas do meio do Rio Negro, a condutividade elétrica foi mais elevada do que se poderia esperar de locais com baixos valores de TDS. Esta característica também foi observada por Furch et al. (1982) em vários corpos de água preta na bacia Amazônica. O perfil limnológico longitudinal da calha do Rio Negro revela a extrema heterogeneidade de suas águas. Grande parte desta variabilidade deve-se às descargas dos rios Demini e Branco. Na foz destes rios, na margem esquerda do Rio Negro os valores de pH da água estão próximos da neutralidade. Por outro lado, ao longo do canal principal do Rio Negro os valores de pH, condutividade elétrica e TDS são normalmente baixos (<pH 4,5; <17 µS/cm e <7,1 mg/L, respectivamente). Por causa deste perfil limnológico, alguns autores o consideram como um rio de “água destilada ligeiramente contaminada com nutrientes” (SIOLI, 1984; JUNK, 1997). Segundo Konhauser et al. (1994), a precipitação é a principal fonte de muitos metais dissolvidos. Além disso, o Rio Negro tem sido comumente denominado de “rio faminto” devido à reduzida densidade de peixes. No entanto, o Rio Negro possui uma das mais ricas ictiofaunas da Amazônia, inclusive maior que a do Rio Amazonas/Solimões (JUNK, 1997).

A condrofauna do Rio Negro é particularmente interessante para estudos sobre Zoofisiologia e Biogeografia histórica da família Potamotrygonidae. *Paratrygon aiereba* é a espécie mais basal do grupo (LOVEJOY, 1996), além disso, como já mencionado, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *P. schroederi* são espécies associadas à *Plesiotrygon iwamae*. A especiação entre elas pode ter ocorrido entre 7,7 a 6,8 milhões de anos atrás (LOVEJOY et al., 1998; MARQUES, 2000; TOFOLLI, 2006), enquanto que as demais espécies do gênero *Potamotrygon* que ocorrem nas demais bacias, incluindo o sistema Solimões/Amazonas, Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia tiveram origem mais recente entre 2,0 a 1,8 milhões de

anos atrás (TOFOLLI, 2006). Isto significa dizer que a condrofauna do Rio Negro é marcada pela presença de espécies basais. Com base nisso, pode-se deduzir que: (i) as estratégias osmorregulatórias de *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) e *P. schroederi* ainda podem ter componentes fisiológicos do ancestral dos potamotrigonídeos, i.é, assumindo que o grupo seja monofilético (LOJEVOY et al., 1998; MARQUES, 2000); (ii) os habitats do Rio Negro podem representar relíquias hidrográficas das paleodrenagens do Proto-Amazonas/Orinoco, onde o provável ancestral dos potamotrigonídeos adaptou-se à vida no ambiente de água doce entre 23 e 15 milhões de anos atrás (LOVEJOY et al., 1998; MARQUES, 2000) durante o Mioceno, após as transgressões marinhas que ocorreram na bacia Amazônica, as quais levaram à formação de grande lagos, mares continentais, além de um amplo espectro de situações aquáticas que incluíam ambientes estuarinos até habitats que foram progressivamente dessalinizados tornando-se extremamente diluídos (HOORN, 1994), ou seja, corpos d'águas similares aos encontrados na atual bacia do Rio Negro; (iii) a presença de espécies como *Potamotrygon* aff. *orbignyi* e *P. motoro* na bacia do Rio Negro pode representar casos de colonização pelas espécies do grupo denominado roseta-ocelado por Tofolli (2006). Segundo este autor, estas espécies teriam se originado entre 2,04 milhões anos atrás a partir de ancestrais que viviam na calha do Rio Amazonas e nas partes baixas dos afluentes e, que teriam colonizado os trechos à montante de regiões com descontinuidades geológicas, tais como áreas acima do Arco de Purus no Médio-Alto Rio Negro.

No arquipélago de Mariuá, os juvenis de *P. aff. orbignyi* e *Paratrygon aiereba* são espécies simpátricas e sintópicas, assim também como *Potamotrygon* sp. (cururu) e *P. motoro*. As duas primeiras são encontradas em microhabitats de águas ácidas, levemente correntes, límpidas e rasas nas praias arenosas comuns nas ilhas no meio do Rio Negro. Por outro lado, *Potamotrygon* sp. e *P. motoro* são freqüentes nas áreas de igapós, com liteira e vegetação submersa e, normalmente, em águas estagnadas com substrato areno-lodoso. Levando-se em consideração a hipótese da colonização dos habitats do Rio Negro pelas duas espécies do grupo roseta-ocelado (*P. aff. orbignyi* e *P. motoro*), pode-se deduzir que estas espécies representam casos de convergência adaptativa para o clado mais ancestral do gênero *Potamotrygon* (*Potamotrygon* sp. e *P. schroederi*). Assim, espera-se que as estratégias osmorregulatórias dessas espécies sejam similares àquelas observadas

para os demais potamotrigonídeos do Rio Negro (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon* sp. e *P. schroederi*). De fato, todas as espécies de arraias do Rio Negro possuem valores de eletrólitos (Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{+2}) e níveis de atividade da Na^+/K^+ -ATPase renal muito semelhantes. Muito embora com balanço iônico negativo em relação ao ambiente estas arraias possuem um ativo mecanismo renal para reabsorver eletrólitos e evitar perdas ainda maiores para o meio (ver Parte III e IV deste estudo).

A condrofauna da bacia do Rio Tapajós ainda é desconhecida. Foi registrada a ocorrência para as espécies *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon orbignyi*, e duas espécies novas endêmicas, *Potamotrygon* sp.1 “pretinha-P14-Itaituba” e *Potamotrygon* sp.2 “arraia jabuti” (Maria Lúcia Góes de Araújo, comunicação pessoal). Exemplares de uma espécie não identificada, aqui denominada de *Potamotrygon* sp.3 foram encontrados entre os municípios de Itaituba e Aveiros. Esta nova espécie encontra-se em fase de estudo (Marcelo de Carvalho, comunicação pessoal). A diversidade de espécies de Potamotrygonidae no Rio Tapajós pode estar associada às feições geológicas comuns naquela área. A região de Itaituba, no Estado do Pará, possui inúmeras cachoeiras e corredeiras. Algumas das espécies do grupo roseta-ocelado (*Potamotrygon* sp.1, P14-Itaituba e *Potamotrygon* sp.2, arraia-jabuti) parece não ocorrer à jusante dessas cachoeiras (M.L.G. Araújo, comunicação pessoal), e *Potamotrygon* sp.3 pode não ocorrer à montante das cachoeiras existentes entre São Luís do Tapajós e Pimental (observação pessoal; Marcelo de Carvalho, comunicação pessoal). De maneira similar à condrofauna da bacia do Tocantins-Araguaia (ver RINCÓN, 2006), as cabeceiras dos tributários do Rio Tapajós podem conter inúmeras espécies novas. Por exemplo, os povos indígenas Mundurucus da região de Jacareacanga (Alto Rio Tapajós) relatam a presença de uma arraia sem ferrão comum nos igarapés e nas margens do Rio Tapajós daquela região.

Atualmente, o regime pluvial da região Norte governa o pulso hidrológico dos rios amazônicos. A alternância de períodos chuvosos na parte meridional e setentrional da bacia Amazônica garante uma alimentação diferenciada dos afluentes do Rio Amazonas (SIOLI, 1984). Uma antecipação ou um prolongamento das enchentes nas duas vertentes provocam o chamado “fenômeno de interferência”, responsável pela subida extraordinária das águas do Rio Amazonas

em quase toda a sua extensão (SALATI & VOSE, 1984). Nessas condições os afluentes são represados na sua foz fazendo com a água do rio principal adentre vários quilômetros alterando significativamente as variáveis abióticas (SANTOS & TOFOLLI, 1988). É o que acontece com o Rio Tapajós. A foz desse rio é afogada pelo Rio Amazonas formando uma ria. Embora o Rio Tapajós seja classificado como um rio de água clara este possui coloração verde-azulada. Em geral, possui baixa condutividade elétrica ($\sim 14 \mu\text{S}/\text{cm}$) e TDS ($\sim 8 \text{ mg}/\text{L}$) semelhantes aos valores observados no Rio Negro. Entretanto, os valores de pH ficam próximos aos valores registrados para o Rio Amazonas ($\sim \text{pH } 6,5$). Próximo da foz desse rio, as algas formam um “*bloom*” de consistência viscosa, provavelmente, indicando forte influência do Rio Amazonas e/ou fonte de poluição naquele trecho (observação pessoal). Ao longo de três décadas, as intensas atividades antrópicas (extração de ouro e calcário) modificaram drasticamente a qualidade da água do Rio Tapajós. Provavelmente, os picos nos valores de condutividade elétrica e TDS observados no município de Aveiros podem estar associados à poluição local. No geral, na região estudada o Rio Tapajós parece ser bem mais homogêneo físico-quimicamente do que os trechos estudados no Rio Amazonas e no Rio Negro. Provavelmente, isto se deve à ausência de grandes tributários neste trecho. Sugere-se que nessas condições, a área estudada no Rio Tapajós tende a formar habitats estáveis favorecendo o endemismo das espécies supramencionadas. Com base nisso, podemos inferir que os limites da distribuição geográfica das espécies endêmicas daquela região são: (i) A foz do Rio Tapajós, onde as bruscas diferenças físico-químicas entre este rio e o Rio Amazonas limitam a distribuição de muitas espécies e; (ii) as inúmeras cachoeiras entre São Luís do Tapajós e Pimental onde o substrato rochoso, correnteza e geomorfologia local dificultam colonização à montante.

Em síntese, a flutuação espacial nas variáveis físicas e químicas das águas dos grandes rios amazônicos se deve às descargas dos afluentes que abastecem o canal principal. Embora heterogêneos, os rios Amazonas, Negro e Tapajós conservam características físicas e químicas peculiares ao tipo água onde são classificados: água branca, preta e clara, respectivamente. Estas diferenças físicas e químicas provavelmente impõem barreiras hidrográficas, as quais podem ter

favorecido os processos de especiação por adaptação divergente, ou ainda mantendo os focos de endemismo para várias espécies de arraiais de água doce.

PARTE II

Morfologia Funcional



CAPÍTULO 2

MORFOLOGIA FUNCIONAL DAS BRÂNQUIAS DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE: ELASMOBRANCHII)

Palavras-chave: Morfologia branquial, Potamotrygonidae, Células pavimentosas, Células mucosas, Células cloreto.

INTRODUÇÃO

As brânquias são os mais importantes sítios de troca gasosa, regulação iônica e manutenção do equilíbrio ácido-base em teleósteos. Para vários autores, as brânquias dos elasmobrânquios são consideradas o principal sítio para a respiração e regulação ácido-base relacionada ao transporte de íons (HUGHES et al., 1986; PIERMARINI et al., 2002). No entanto, inicialmente foi sugerido que as brânquias destes peixes tivessem um papel secundário na regulação iônica devido a presença da glândula rectal, que secreta ativamente NaCl (BURGER & HESS, 1960), porém, recentemente foi observado que a remoção da glândula rectal do tubarão *Squalus acanthias* não altera o balanço iônico. Wilson et al. (2002) sugeriram que as brânquias dos elasmobrânquios têm papel importante na regulação iônica.

Na década de 1980, a maioria dos estudos sobre morfologia das brânquias de elasmobrânquios enfatizou a descrição da vascularização arterio-arterial nos filamentos branquiais de tubarões e arraias marinhas (HUGHES, 1984; HUGHES et al., 1986). Recentemente, tem sido dada ênfase à identificação das células ricas em mitocôndrias (ou células cloreto) e localização de trocadores iônicos em elasmobrânquios marinhos eurialinos e estenoalinos (WILSON et al., 2002; PIERMARINI et al., 2002; EVANS et al., 2005, CHOE et al., 2007), entretanto são poucos os estudos com elasmobrânquios estenoalinos de água doce (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003; IP et al., 2003; TAM et al., 2003)

As arraias da família Potamotrygonidae são os únicos elasmobrânquios de água doce restritas às bacias hidrográficas da América do Sul (COMPAGNO & COOK, 1995) e são consideradas esteno-halinas. A distinção entre arraias de água doce esteno-halinas e euri-halinas pode ser descrita pelas suas diferenças osmorregulatórias. Por exemplo, as arraias euri-halinas da família Dasyatidae, *Himatura signifer* (TAM et al., 2003) e *Dasyatis sabina* (PIERMARINI & EVANS, 1998) são diferentes dos membros da família Potamotrygonidae devido aos valores de uréia > 200 mmol/L, e pelos valores de osmolalidade plasmática >600 mOsmol/kg. Os potamotrigonídeos possuem

características únicas relacionadas à evolução no ambiente de água doce, as quais incluem a supressão do acúmulo de uréia no sangue, a atrofia da glândula retal e a utilização de eletrólitos como solutos osmorreguladores (THORSON et al., 1967; THORSON et al., 1978; MARTIN, 2004).

Considerando que estudos morfofuncionais das brânquias de teleósteos marinhos e de água doce têm revelado características interessantes quanto à adaptação aos diferentes ambientes aquáticos (HUGHES, 1984; EVANS et al., 1999; EVANS et al., 2005; FERNANDES et al., 2007), o estudo da morfologia branquial das arraias de água doce pode contribuir para uma melhor compreensão da função dessas estruturas, bem como os mecanismos de adaptação aos diferentes ambientes aquáticos da bacia Amazônica.

Portanto, o presente estudo descreve a morfologia das brânquias de seis espécies de arraias de água doce da família Potamotrygonidae, com uma abordagem morfofuncional dos principais componentes do tecido branquial.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Espécimes de arraias da família Potamotrygonidae foram capturados na bacia do Rio Negro (S0°49'; W62°51'), Arquipélago de Mariuá, próximo da cidade de Barcelos (Estado do Amazonas) e na Ilha de Colares (S0°55'; W48°17'), Baía de Marajó (Estado do Pará), estuário amazônico com o Oceano Atlântico (Tabela 1). Na bacia do Rio Negro, as arraias foram coletadas no período noturno, nas praias e/ou igapós, com auxílio de rapichés e/ou puçás e mantidas na água do local de coleta por um período de 24-72 horas. Em Colares, as arraias foram coletadas por meio de arrasto de praia (praia do Humaitá) durante a vazante; e mantida na mesma água aerada e renovada constantemente por um período de até 24 horas.

Tabela 1. Biometria: peso (média±erro padrão) e largura do disco, LD), número amostral (N) e local de captura das espécies de Potamotrygonidae.

Espécies	N	Peso (g)	LD (cm)	Local
<i>Paratrygon aiereba</i>	4	176,7 ± 26,7	16,5 ± 3,4	Rio Negro
<i>Potamotrygon</i> sp. (cururu)	3	390,0 ± 29,3	19,3 ± 1,5	Rio Negro
<i>Potamotrygon schroederi</i>	3	388, 8 ± 47,4	20,1 ± 5,7	Rio Negro
<i>Potamotrygon motoro</i>	3	377,9 ± 61,8	19,6 ± 6,2	Rio Negro
<i>Potamotrygon obignyi</i>	3	206,3 ± 12,4	16,5 ± 0,8	Ilha de Colares
<i>Potamotrygon scobina</i>	3	254,7 ± 25,9	17,6 ± 1,5	Ilha de Colares

As arraias foram irreversivelmente anestesiadas com MS-222 (Sigma Co.) tamponado (pH 7,4). Os arcos branquiais foram cuidadosamente retirados e separados individualmente. Os arcos do lado direito foram fixados em solução Bouin (48h) e mantidos em etanol 70% após remoção do excesso da solução fixadora; os do lado esquerdo foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado com 100 mM de tampão fosfato pH 7,4 e armazenados em glutaraldeído 0,5% tamponado com a mesma solução tampão.

Após fixação, o número de filamentos das hemibrânquias de cada arco branquial foi contado e o comprimento dos filamentos foi medido.

Microscopia de Luz

Amostras de cada um dos arcos branquiais fixadas com Bouin foram desidratadas em série crescente de etanol (70 a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em historesina (Leica), seccionada (3 μm), coradas com azul de Toluidina e observadas em um microscópio de luz (OLYMPUS BX51) com uma câmera de vídeo acoplada a um microcomputador.

Para análise histoquímica e imuno-histoquímica, as amostras de cada um dos arcos branquiais foram desidratadas em série crescente de etanol (70 a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Cortes (6 μm) sagitais ao filamento branquial foram corados com Alcian Blue pH 2,5 e Peridic Acid of Schiff (PAS) para localização e identificação de células mucosas (CMs), ricas em mucosubstâncias ácidas e neutras, respectivamente e observados em um microscópio de luz (OLYMPUS BX51) descrito acima.

A localização das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase (CCs-NKA) foi realizada por método imuno-citoquímico. Após a remoção da parafina, os cortes foram lavados em tampão fosfato de potássio-salino (TPS, 10 mM, pH 7,4). As ligações não específicas foram bloqueadas após a adição de H_2O_2 10% durante 20 min, seguido de soro de cabra (20% com Triton X-100, 0,1%) durante 20 min. Os cortes foram incubados durante 12h (“overnight”) com o anticorpo primário anti- Na^+/K^+ -ATPase (IgG α 5, desenvolvido pelo Dr. DOUGLAS FRAMBOUGH, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, USA) diluído 1:100 em TPS com Triton X-100, 0,1%. O excesso de anticorpo foi removido em duas lavagens de TPS durante 10 min cada. O segundo anticorpo conjugado com a peroxidase anti-peroxidase (IgG goat anti-mouse Peroxidase, GAMPO) diluído 1:150 em TPS foi adicionado, sendo que os cortes foram incubados durante 1 h. O excesso foi retirado por meio de duas lavagens em TPS (10 min cada). Todas as incubações foram realizadas em baixa temperatura ($\sim 10^\circ\text{C}$) em câmara úmida e escura. A identificação das CCs-NKA imunoreativas foi realizada com solução de DAB (0,05 mg L^{-1} de 3-3-diaminobenzidina diluído

em TPS, pH 7,4) com sulfato de níquel II amônio (0,25%) em H₂O₂ (0,015%). A coloração apareceu entre 5 a 10 min. A reação foi interrompida com água destilada. Os cortes foram desidratados em série crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck). Controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário (IgG α 5), seguido de incubação com o 2º anticorpo e coloração como descrita acima. A quantificação das CCs-NKA foi realizada em perfis de 3 cortes/arco branquial em 3 indivíduos/espécie em cada um dos cinco arcos branquiais. As contagens das CCs-NKA foram efetuadas aleatoriamente em 50 campos nos espaços interlamelares (filamento) e nas lamelas. As lamelas e os espaços interlamelares de cada arco branquial foram mensurados para evitar efeito do comprimento desses componentes sobre o número de CCs-NKA. O número de CC-NKA é expresso por milímetro de espaço interlamelar ou por lamela. Todas as medidas foram realizadas em um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera de vídeo e um microcomputador com o software C.A.S.T. System (Olympus, Denmark).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras aleatórias de filamentos branquiais foram fixadas em glutaraldeído (GTA)-tamponado (2,5%) em 100 mM de tampão fosfato pH 7,4. As amostras pré-fixadas foram submetidas ao tratamento para retirada do excesso de muco por meio de imersão em glicerol 16% por 24 h seguido de etanol 20% por mais 24 h, e lavagens sucessivas em tampão fosfato 100 mM pH 7,4. Em seguida, as amostras foram desidratadas em solução crescente de etanol: 50, 70, 80, 90, 95 e 100% e em 2 banhos de HMDS (1,1,1,2,2,2-hexamethydisilazani) e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram fixadas em suporte com cola da prata, metalizadas com ouro 99% e examinadas em um MEV FEG Philips (em 5 kV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA/UFSCar).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras aleatórias dos filamentos branquiais fixadas em glutaraldeído (GTA) 2,5% tamponado em 100 mM de tampão fosfato pH 7,4 foram pós-

fixadas com tetróxido de ósmio 1,0% tamponado em 100 mM de tampão fosfato pH 7,3, contrastadas em bloco com acetato de uranila com sacarose (10,5%), desidratadas em solução crescente (30-100%) e embebidas em resina SPURR Low Viscosity-Embedding Kit (EMS). Cortes semi-finos (0,5 μm) foram obtidos com o ultra-micrótomo Leica UltraCut, em seguida corados com azul de toluidina. Os cortes ultra-finos (60-90 nm) foram contrastados com acetato de uranila saturada e citrato de chumbo (solução de Reynolds) e observados em um MET Philips CM 120 em 80 kV.

Análises estatísticas

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado *a priori* para analisar a distribuição normal dos dados (número de CCs-NKA). Em alguns casos, os dados foram log-transformados para que fossem submetidas à análise de variância (ANOVA) paramétrica seguida de um teste *pos hoc*, teste de Tukey para determinar as diferenças no número de CCs-NKA entre os arcos branquiais. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

O corpo das arraias é achatado dorso-ventralmente (Fig. 1A), e as brânquias possuem a mesma organização básica dos elasmobrânquios marinhos, constituídas por cinco pares de arcos branquiais (Figuras 1B). A água que entra tanto pelo espiráculo quanto pela boca chega à cavidade orofaríngea (Fig. 1C) é forçada a passar pelas brânquias até a câmara parabranquial (Fig. 1D). O primeiro arco branquial (arco hióideo) possui apenas uma fileira de filamentos branquiais (hemibrânquia posterior) e os demais arcos possuem duas hemibrânquias (holobrânquias) que se projetam a partir da barra branquial sendo separadas pelo septo interbranquial. A sustentação do septo interbranquial é efetuada pelos tecidos muscular, conjuntivo e pelos raios cartilagosos (Fig. 2A) que se estendem da barra branquial (Fig. 2B) até a parede corporal na fenda branquial formando a câmara parabranquial (Fig. 2C). As fileiras de filamentos branquiais que estão dispostas paralelamente ao

septo interbranquial e são contínuas a ele formando o canal septal entre as lamelas e o septo interbranquial (Fig. 2D).

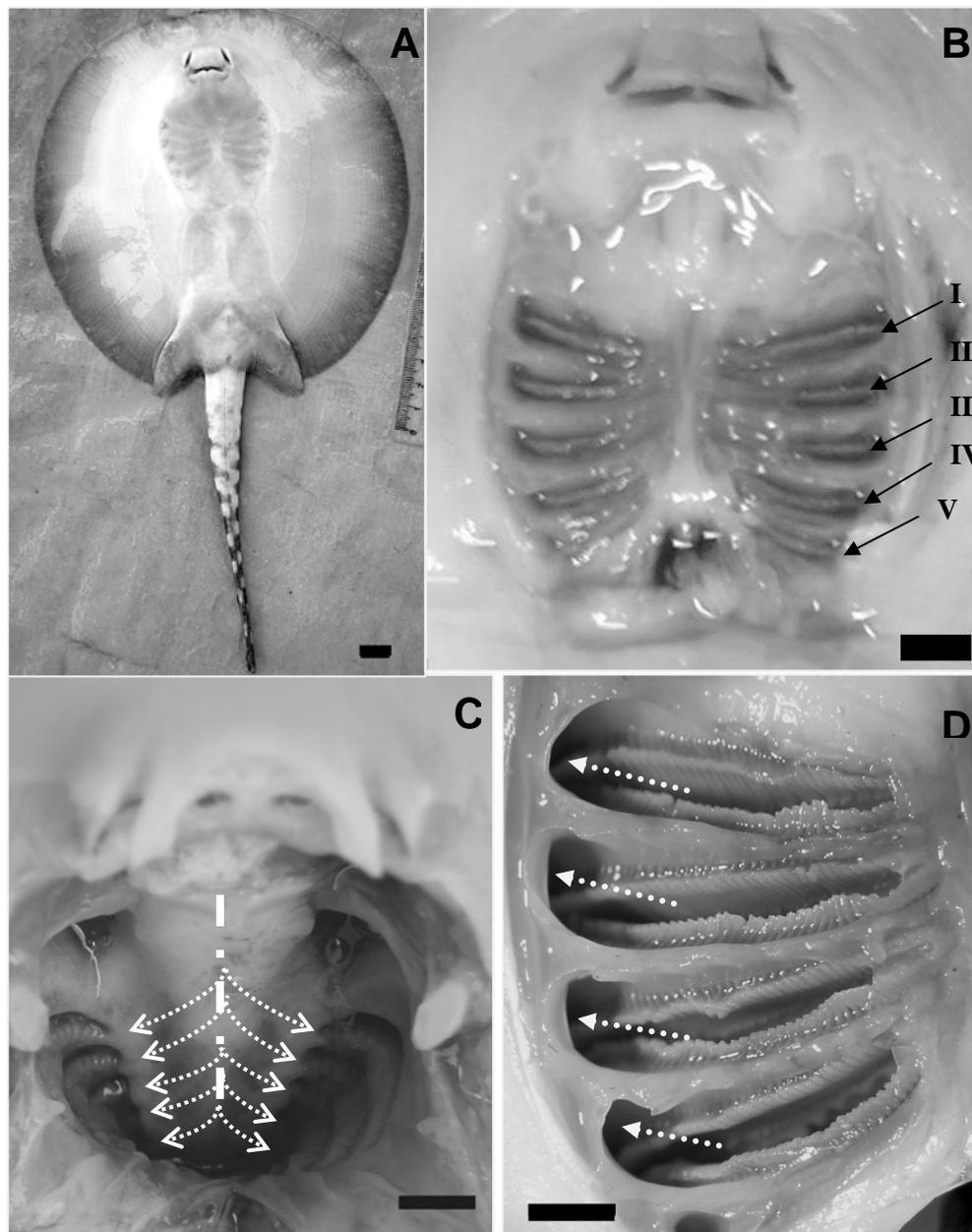


Figura 1. (A). Região ventral de um juvenil de *Potamotrygon aff. orbignyi*. (B) localização dos cinco pares de arcos branquiais, sendo o 1º arco denominado de arco hióideo; (C) sentido do fluxo de água dentro da cavidade orofaríngea; (D) câmara peribranquial por onde a água flui entre as hemibrânquias até chegar à cavidade parabrânquial (ponta da seta). Barras: 1 cm.

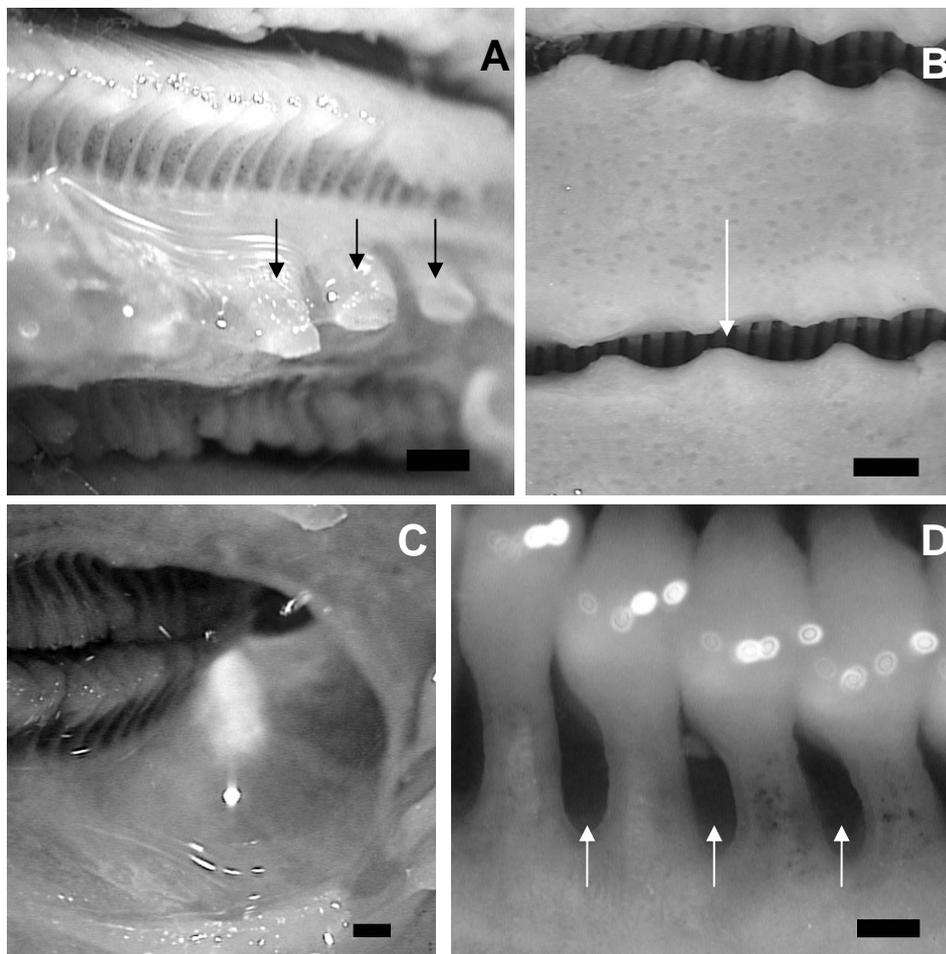


Figura 2. (A) Septo branquial demonstrando os raios cartilagosos (setas). (B) detalhes da barra branquial e da câmara peribranquial (seta) observados a partir da cavidade orofaríngea. (C) cavidade parabranchial. (D) canal septal (setas) entre as lamelas secundárias. Barras: (A) e (B) 2 mm; (C) 1,5 mm; (D) 1 mm.

Em todas as hemibrânquias observa-se uma “protuberância” localizada na primeira metade do comprimento do filamento formando um arranjo paralelo ao arco branquial (Fig. 3A e B). O número de “protuberâncias” em cada filamento varia de indivíduo para indivíduos, e também entre diferentes espécies. A protuberância é revestida pelos mesmos tipos celulares que constituem o epitélio do filamento. Podem ser observadas numerosas células pavimentosas, e raramente células mucosas e células cloreto (Fig. 3C e D). Internamente a protuberância é constituída por tecido conjuntivo mucoso, com células semelhantes aos fibroblastos que estão imersos em uma extensa matriz extracelular alcian blue-positiva (Fig. 3E e F).

A morfometria dos componentes branquiais (número e comprimento dos filamentos) de alguns representantes da família Potamotrygonidae está representado na Fig. 4. O número de filamentos em cada holobrânquia varia entre os arcos branquiais (74-103 filamentos/hemibrânquia). Geralmente, a hemibrânquia posterior do 2º e a anterior do 3º arco branquial possuem mais filamentos que as hemibrânquias dos demais arcos branquiais. O número e o comprimento do filamento variam entre as espécies estudadas. O comprimento do filamento ao longo do comprimento do arco apresenta um padrão assimétrico nas diferentes regiões da hemibrânquia (ventral, mediana e dorsal). Os filamentos são curtos nas extremidades dos arcos branquiais e na região mediana do arco branquial, e são longos nas hemibrânquias posteriores.

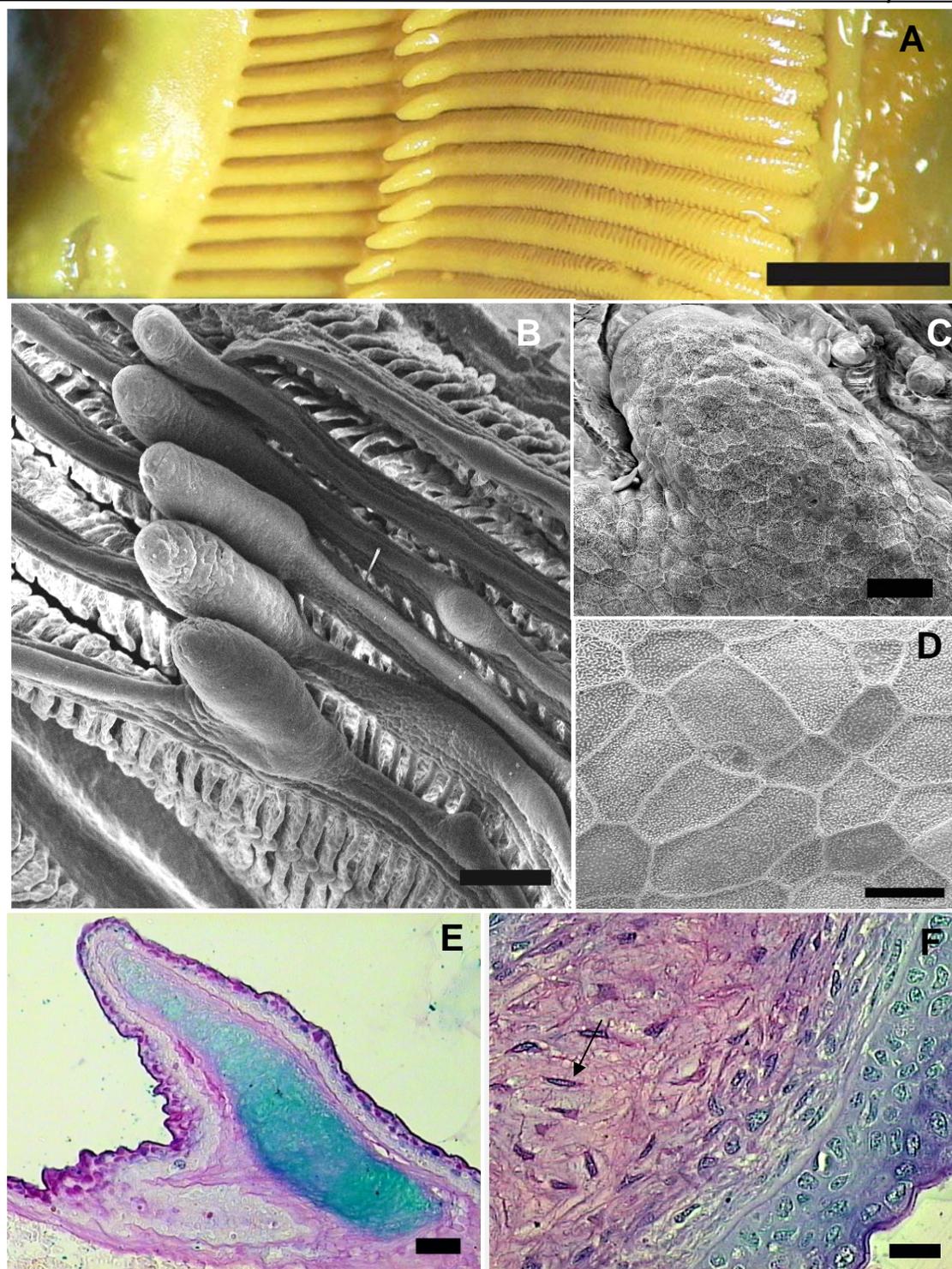


Figura 3. (A) Disposição dos filamentos branquiais de *Paratrygon aiereba* demonstrando a presença de uma “protuberância” em cada filamento. (B) Detalhes das protuberâncias nos filamentos observados em Microscopia Eletrônica de Varredura. (C) e (D) demonstram que a protuberância é revestida por células pavimentosas. (E) Protuberância observada em microscopia de luz e corada com Alcian blue+PAS (pH 2,5) sugerindo a presença de tecido conjuntivo mucoso (verde). (F) Detalhes do tecido conjuntivo mucoso com células semelhantes aos fibroblastos (seta). Barras= (A) 5 mm; (B) 100 μ m; (C) 25 μ m; (D) 10 μ m; (E) 40 μ m; (F) 5 μ m.

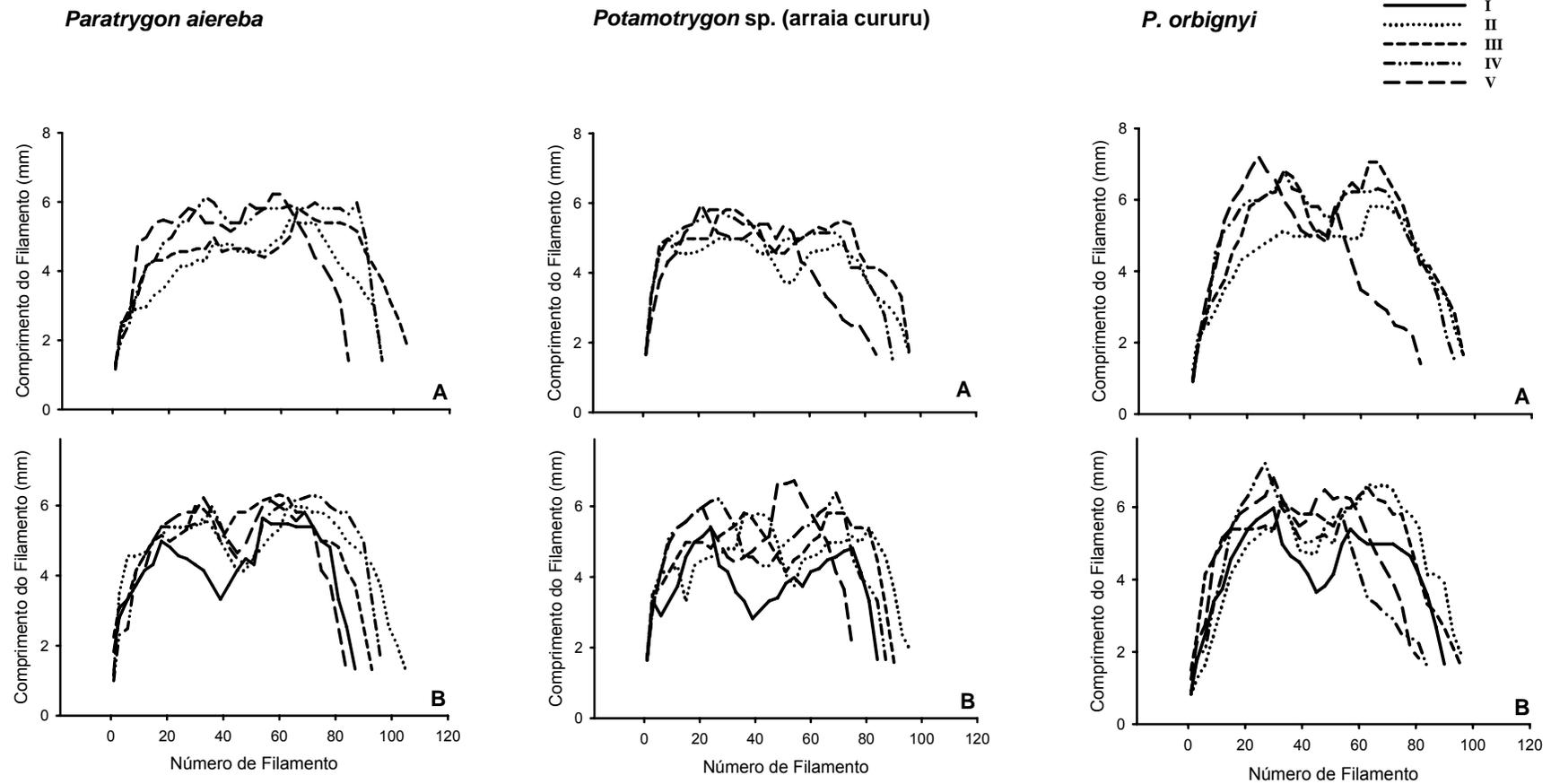


Figura 4. Comprimento dos filamentos das hemibrânquias anteriores (A) e posteriores (B) de três potamotrigonídeos: *Paratrygon aiereba* (largura do disco, LD= 17,5 cm; peso= 210 g), *Potamotrygon* sp. (LD = 14 cm; peso= 345 g) e *Potamotrygon orbignyi* (LD= 17,1 cm; peso= 245 g).

Os filamentos que se estendem da barra branquial (Fig. 5A) têm sua região aferente (“trailing edge”) inseridas no septo interbranquial (Fig. 5B). Nessa região, localiza-se a artéria filamentar aferente que se ramifica em arteríola e preenche o espaço com sangue no interior das lamelas (Fig. 5C, D,

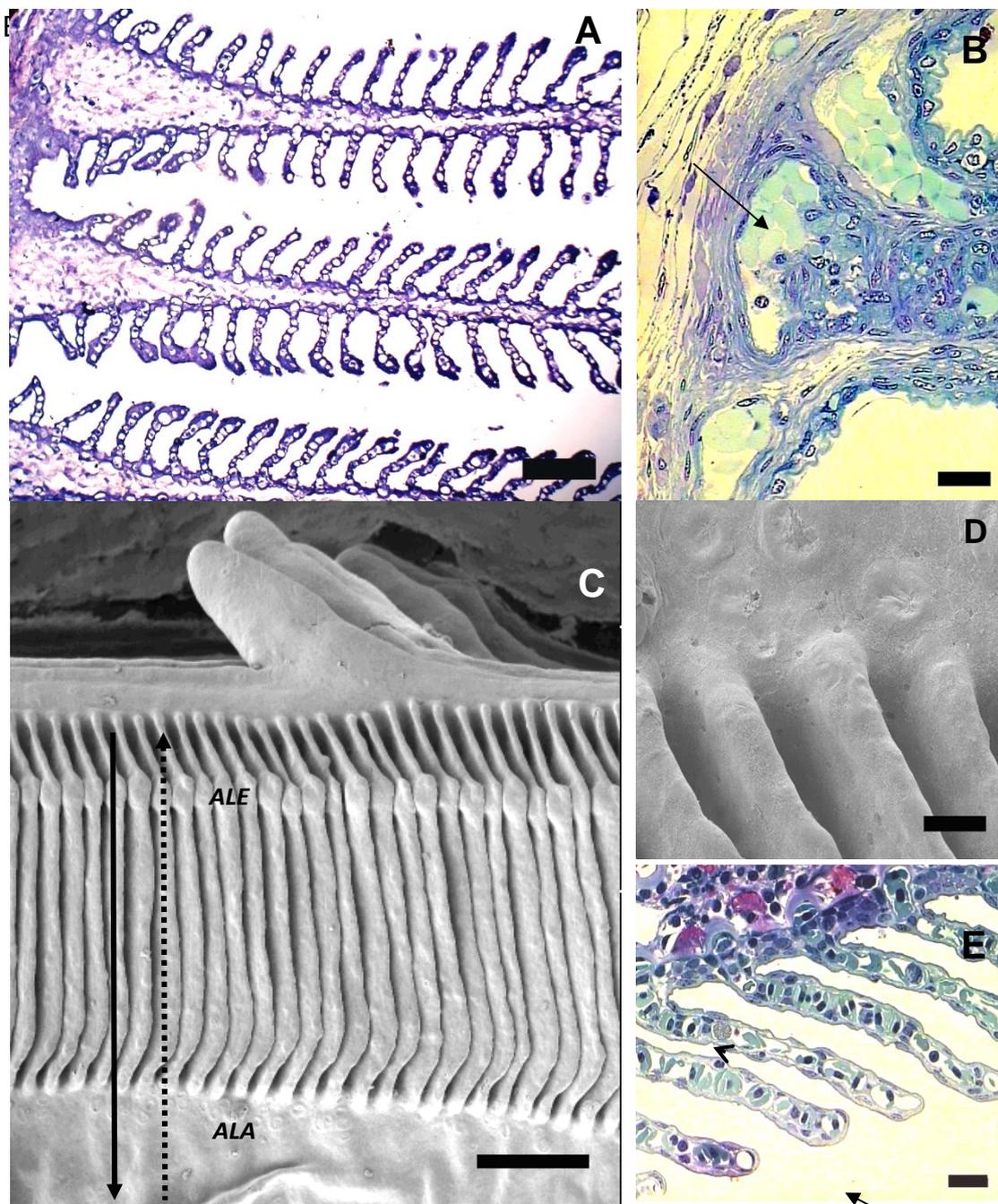


Figura 5. (A) Corte transversal ao filamento branquial de *Paratrygon aiereba* mostrando as lamelas secundárias. (B) Detalhes da região aferente do filamento branquial de *Potamotrygon orbignyi* indicando a artéria filamentar aferente (seta). (C) Microscopia eletrônica de varredura de *P. motoro* mostrando em um fragmento branquial a distribuição das lamelas, a localização das artériolas lamelares aferente (ALA) e eferente (AFE), o sentido do fluxo de água (seta contínua) e do fluxo de sangue (seta tracejada). (D) Em detalhes, a região eferente das lamelas. (E) Componentes das lamelas branquiais (seta) e do espaço interlamelar (ponta de seta) de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). Barras: (A) 200 μm ; (B) 20 μm ; (C) 250 μm ; (D) 25 μm ; (E) 20 μm .

O epitélio do filamento branquial é formado por multicamadas de células (4-6 camadas). As células pavimentosas (CPVs) revestem a camada mais superficial e são as mais numerosas (3.257,3 células/mm²). Em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as CPVs de *Paratrygon aiereba* possuem normalmente microvilosidades na superfície apical, enquanto nas demais espécies observam-se comumente microdobras curtas. Em algumas CPVs de *P. motoro*, as microvilosidades são similares às encontradas nas células cloreto da região da “trailing edge” do filamento branquial. Em alguns casos, a distinção entre tais células torna-se difícil em pequenos aumentos (Fig. 6A e B). Em *Paratrygon aiereba* observam-se numerosos orifícios na superfície das CPVs (Fig. 7A, B e C). Em microscopia eletrônica de transmissão (MET), a região sub-apical das CPVs contém numerosas vesículas com material electrodense (Fig. 8A) que coincide com a mesma região sub-apical PAS-positiva (Fig. 8B, C e D) das CPVs analisadas em microscopia de luz (ML). Em ML, as camadas inferiores do epitélio do filamento apresentam células PAS e/ou azul de Alcian positiva. As células Alcian blue-positivas, em geral, são encontradas nas camadas logo abaixo da superfície do epitélio. As demais células são PAS e/ou azul de Alcian. As células da camada basal do filamento são Alcian blue e PAS-negativas (Fig. 8C).

As células mucosas (CMs) estão distribuídas nas bordas do filamento branquial (nas regiões aferente e eferente do filamento). As CMs são grandes e apresentam forte reação positiva com o PAS ou Alcian blue (Fig. 9A, B e C). A CM parece estar envolvida por células menores com núcleo fusiforme similares às células mio-epiteliais observada em vertebrados superiores. Além disso, a região apical das CMs tende a manter contato com a camada mais externa do epitélio branquial (Fig. 9 D). Em ML e em MEV, podem ser observadas numerosas CMs (199,4 células/mm²) na região aferente do filamento branquial de *P. motoro* (Fig. 9 A,E) sendo que todas as CMs apresentam orifícios na sua superfície apical (Fig. 9 E,F). Estas células são raramente encontradas na lamela e/ou no espaço interlamelar.

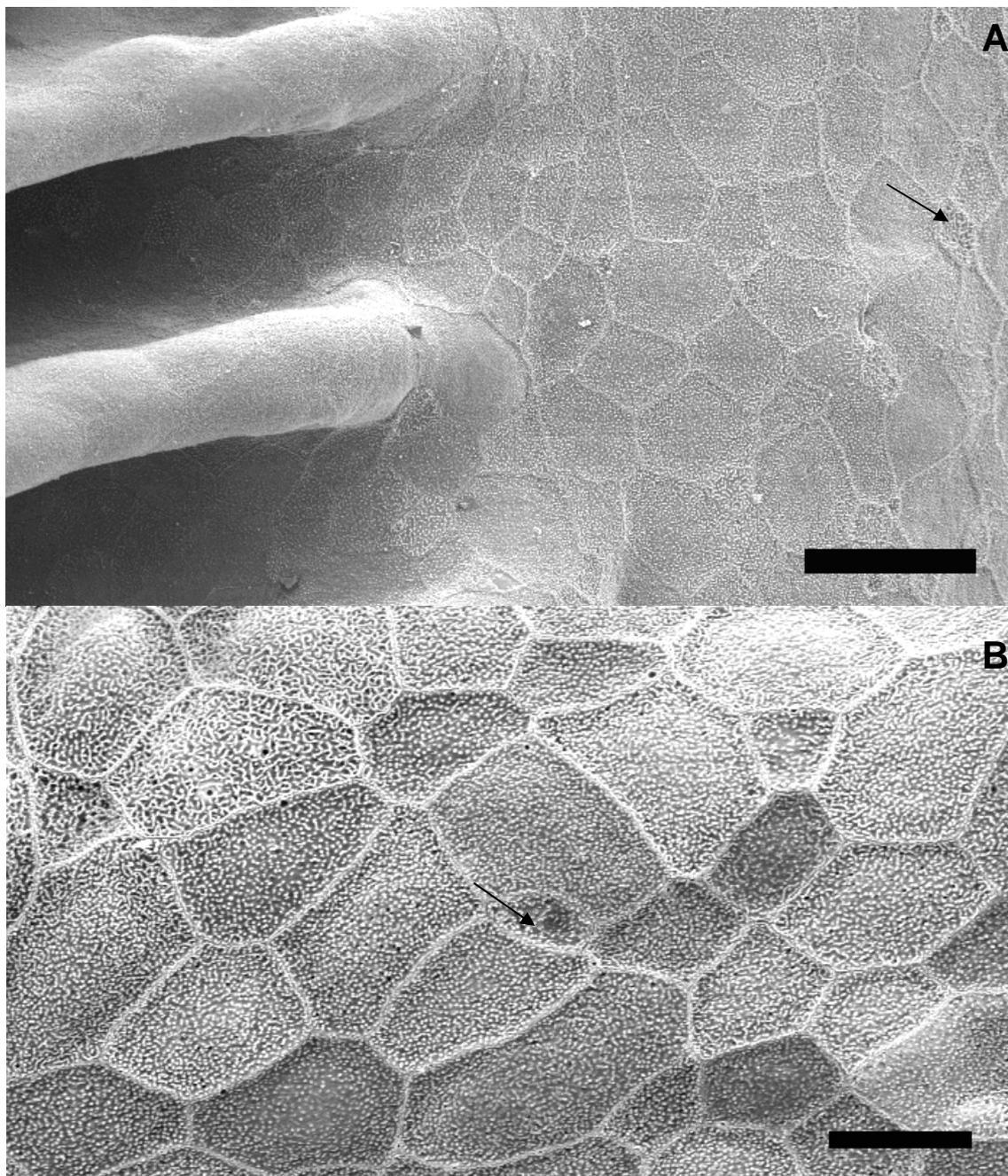


Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de varredura da superfície do filamento e das lamelas mostrando as células pavimentosas (CPVs) e célula cloreto (seta) de *Potamtrygon motoro*. (B) Em detalhes, os possíveis morfotipos de CPVs em relação à morfologia superficial e electrondensidade; em muitos casos, as CPVs são semelhantes às células cloreto (setas). Barras: (A) 20 μm ; (B) 10 μm .

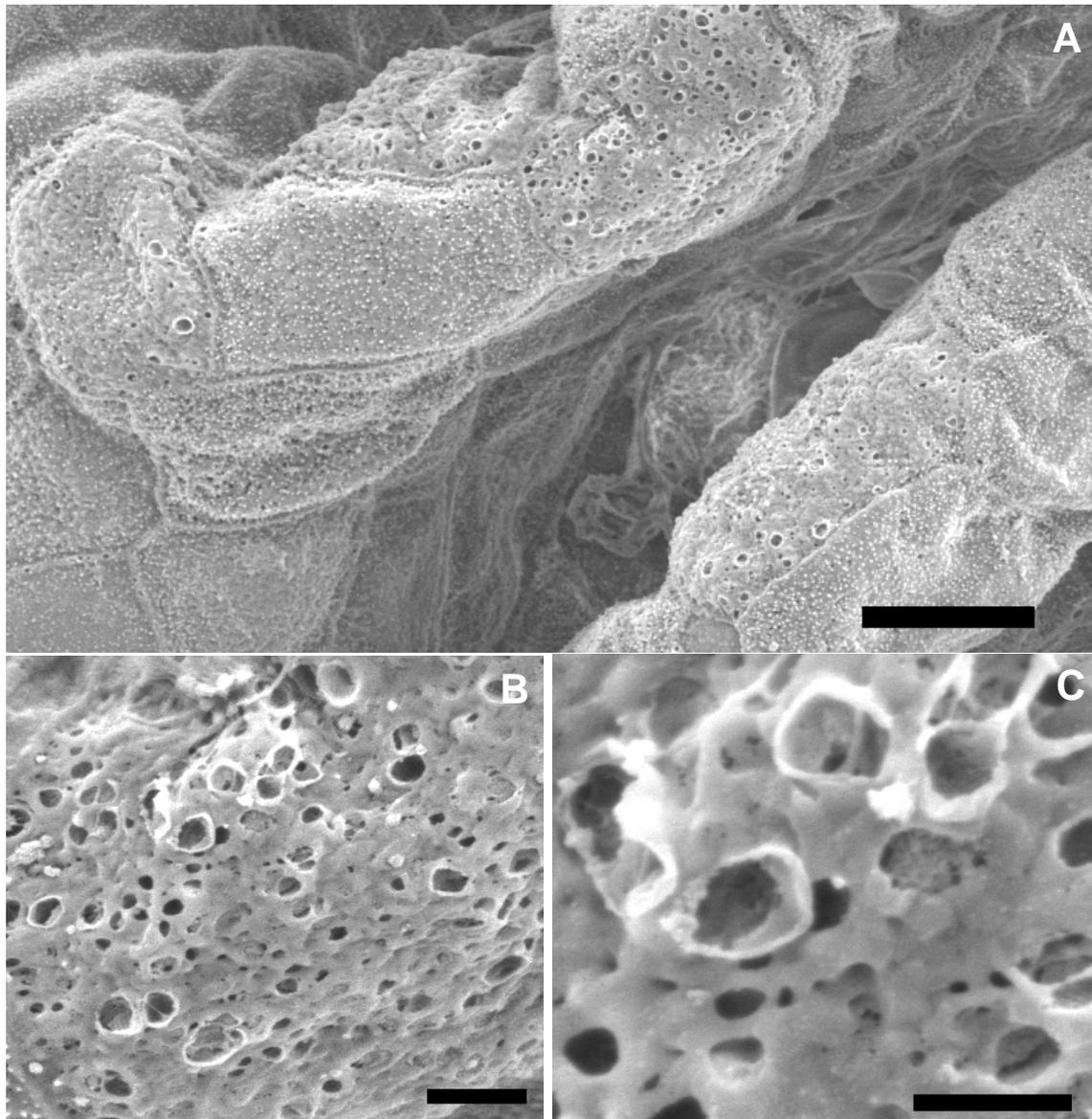


Figura 7. (A) Fotomicroscopia eletrônica de varredura mostrando as células epiteliais da lamela secundária de *Paratrygon aiereba*. (B e C) Detalhes dos poros observados na superfície apical das células pavimentosas. Barras: (A) 10 µm; (B) 2 µm; (C) 1 µm.

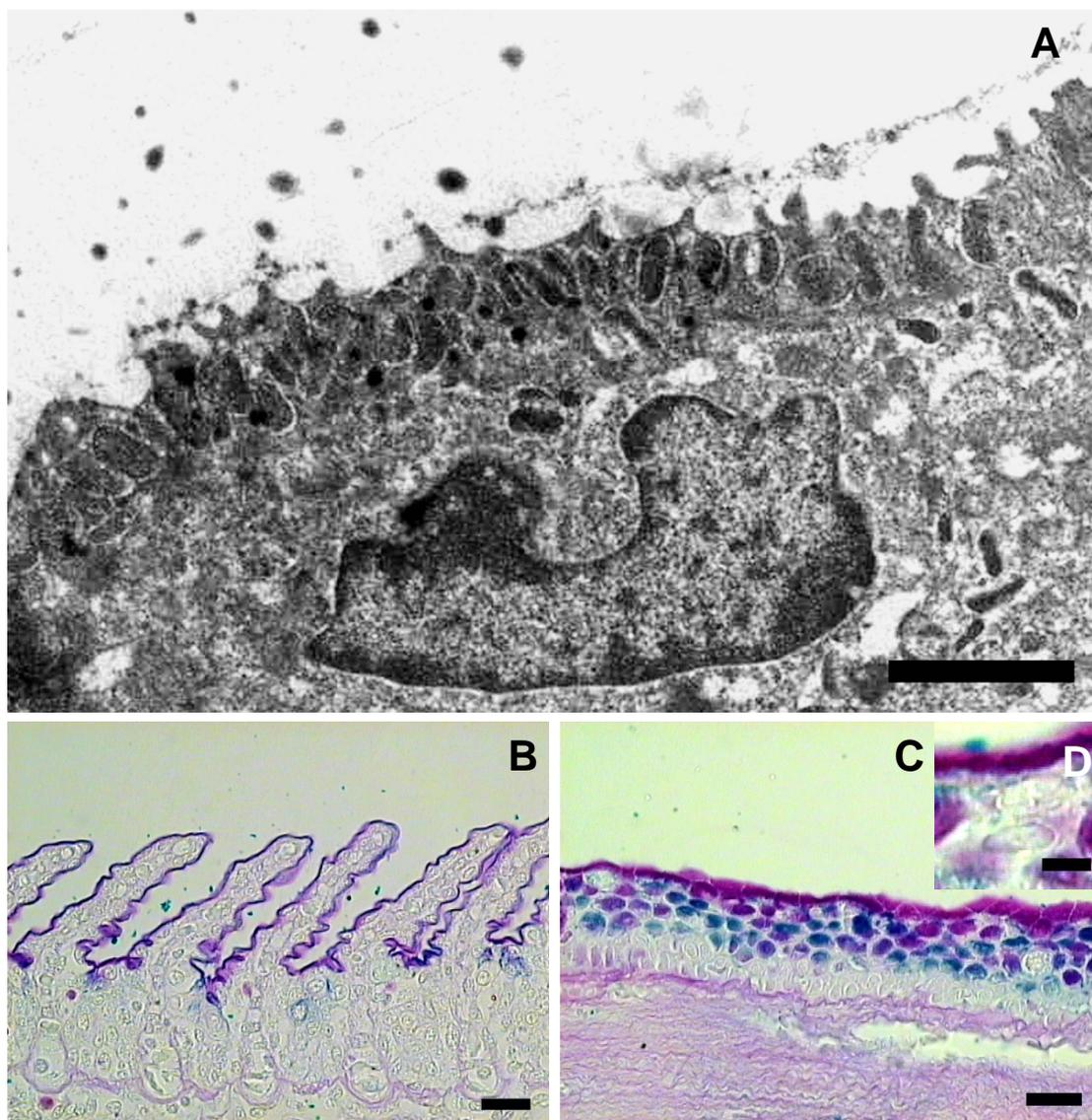


Figura 8. (A) Microscopia eletrônica de transmissão de uma célula pavimentosa demonstrando a presença de inúmeras vesículas sub-ápicas. (B) Corte transversal do filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (cururu) indicando que as células pavimentosas (CPVs) das lamelas possuem reação Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas. (C) Microscopia de luz demonstrando que as CPVs do filamento são Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas. (D) Os detalhes da região sub-ápica da CPV com forte reação com o PAS. Barras: (A) 2 μ m; (B) 40 μ m; (C) 20 μ m; (D) 5 μ m.

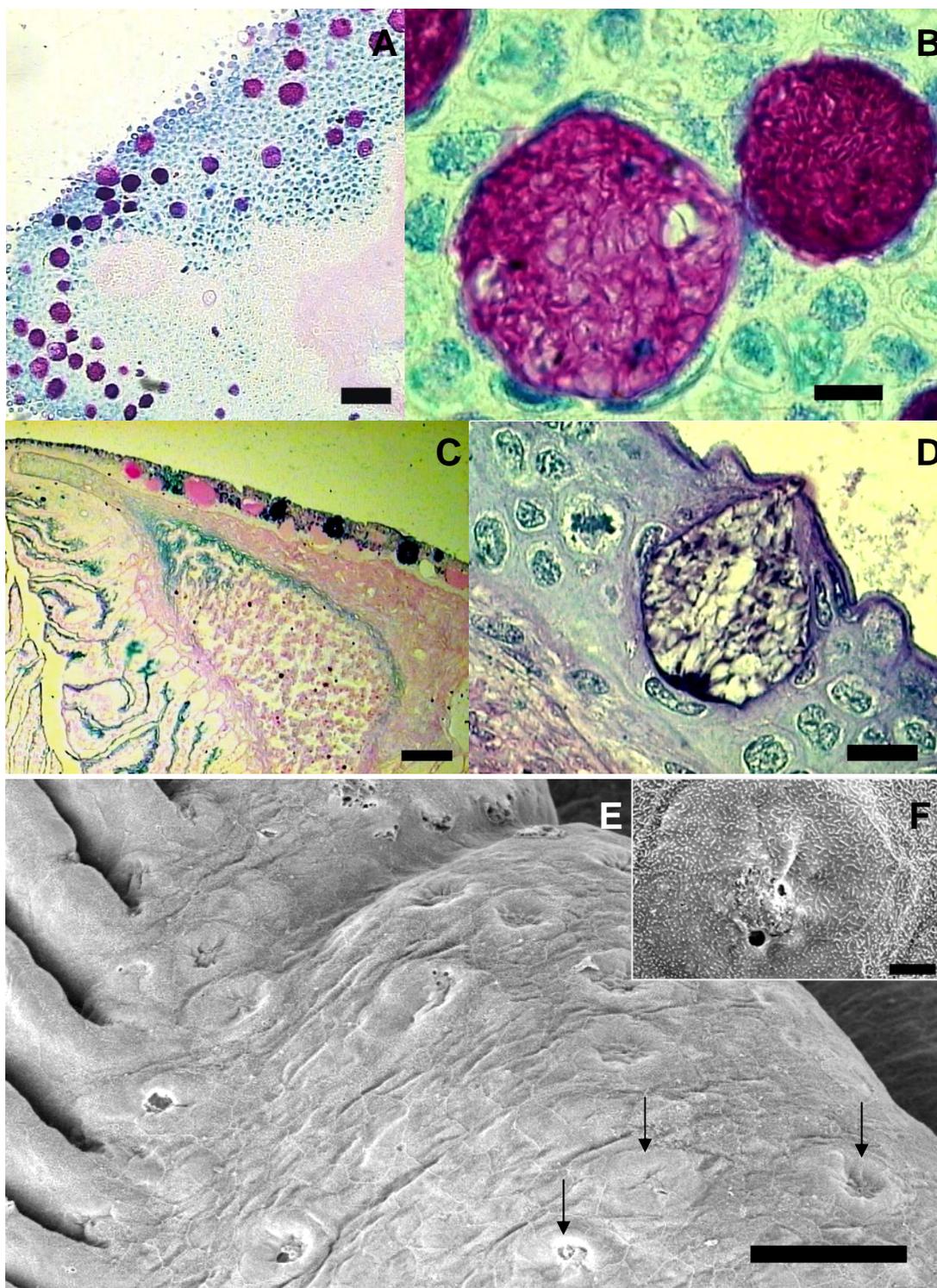


Figura 9. Microscopia de luz mostrando as numerosas células mucosas no filamento branquial de *Potamotrygon motoro* (A) e *P. schroderi* (C). Detalhes das células mucosas Alcian-blue (pH 2,5) + PAS-positivas de *P. motoro* (B) e de *Paratrygon aiereba* coradas em azul de toluidina (D). Fotomicroscopia eletrônica de varredura mostrando as prováveis células mucosas gigantes (setas) do filamento branquial de *P. motoro* (E) Detalhes da superfície apical de uma célula mucosa (F). Barras: (A) 20 μm ; (B) 10 μm ; (C) 40 μm ; (D) 10 μm ; (E) 50 μm ; (F) 5 μm .

As células cloreto imuno-positivas para a enzima Na^+/K^+ -ATPase podem ser encontradas tanto no filamento quanto nas lamelas das seis espécies de potamotrigonídeos estudadas (Fig. 10 A-F). Porém, as CCs-NKA são mais freqüentes no espaço interlamelar da região aferente (“trailing edge”) do filamento ($165\pm 13/\text{mm}$ em *P. schroederi*; $166\pm 17/\text{mm}$ em *Potamotrygon* sp.; $124\pm 18/\text{mm}$ em *P. orbigny*; $201\pm 16/\text{mm}$ em *P. scobina*; $81\pm 17/\text{mm}$ em *P. motoro* e $104\pm 10/\text{mm}$ de espaço interlamelar em *Paratrygon aiereba*), e em menor número nas lamelas ($2,3\pm 0,3/\text{mm}$ em *Potamotrygon* sp.; $12\pm 3/\text{mm}$ em *P. orbigny*; $28\pm 6/\text{mm}$ em *P. scobina*; $17\pm 3/\text{mm}$ em *P. motoro* e $14\pm 4/\text{mm}$ de lamela em *Paratrygon aiereba*), exceto em *Potamotrygon schroederi*, na qual há grande quantidade de CCs-NKA ($40\pm 7/\text{mm}$ de lamela) distribuídas em todo epitélio lamelar (Fig. 11).

Em *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), espécie endêmica das águas pretas, ácidas e pobre em íons do Rio Negro, as CCs-NKA encontradas nas lamelas são isoladas e distribuídas aleatoriamente no epitélio lamelar. No entanto, as CCs-NKA encontradas no filamento estão regularmente distribuídas formando complexos multicelulares (Fig. 12A) compostos por 7-8 células cuja superfície apical compartilha um pequeno canal com $7,6\pm 0,3 \mu\text{m}$ de diâmetro (Fig. 12B). Em MEV, as aberturas dos canais dos complexos multicelulares das CCs-NKA podem observadas entre os espaços interlamelares (Fig. 12C e D).

Em todas as espécies estudadas, a imuno-reatividade para a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) na célula cloreto é intensa na periferia do citoplasma sugerindo que as unidades da NKA estão localizadas na membrana basolateral da célula (Fig. 13 A,B). Estudos em MET evidenciam a ausência de sistema labirinto-tubular membranoso no citoplasma das células cloreto de *Potamotrygon* sp. Porém, demonstra a presença de moderadas invaginações entre as células cloreto que constituem o complexo multicelular. Ao contrario do que era esperado, estas células possuem apenas uma quantidade moderada de mitocôndrias, e em alguns casos, indicando a presença de material pouco electrodensso entre as cristas mitocondriais (Fig. 14 A,B). A região apical das células cloreto do complexo multicelular em *Potamotrygon* sp. possui numerosas microvilosidades, além disso, o contato célula-célula nessa região é

marcado pela presença de inúmeras invaginações de membrana (Fig 14 C,D). Em MEV, a região apical da célula cloreto localizadas na região basal da lamela de *Potamotrygon* sp. possui inúmeras microvilosidades (Fig. 14 E, F).

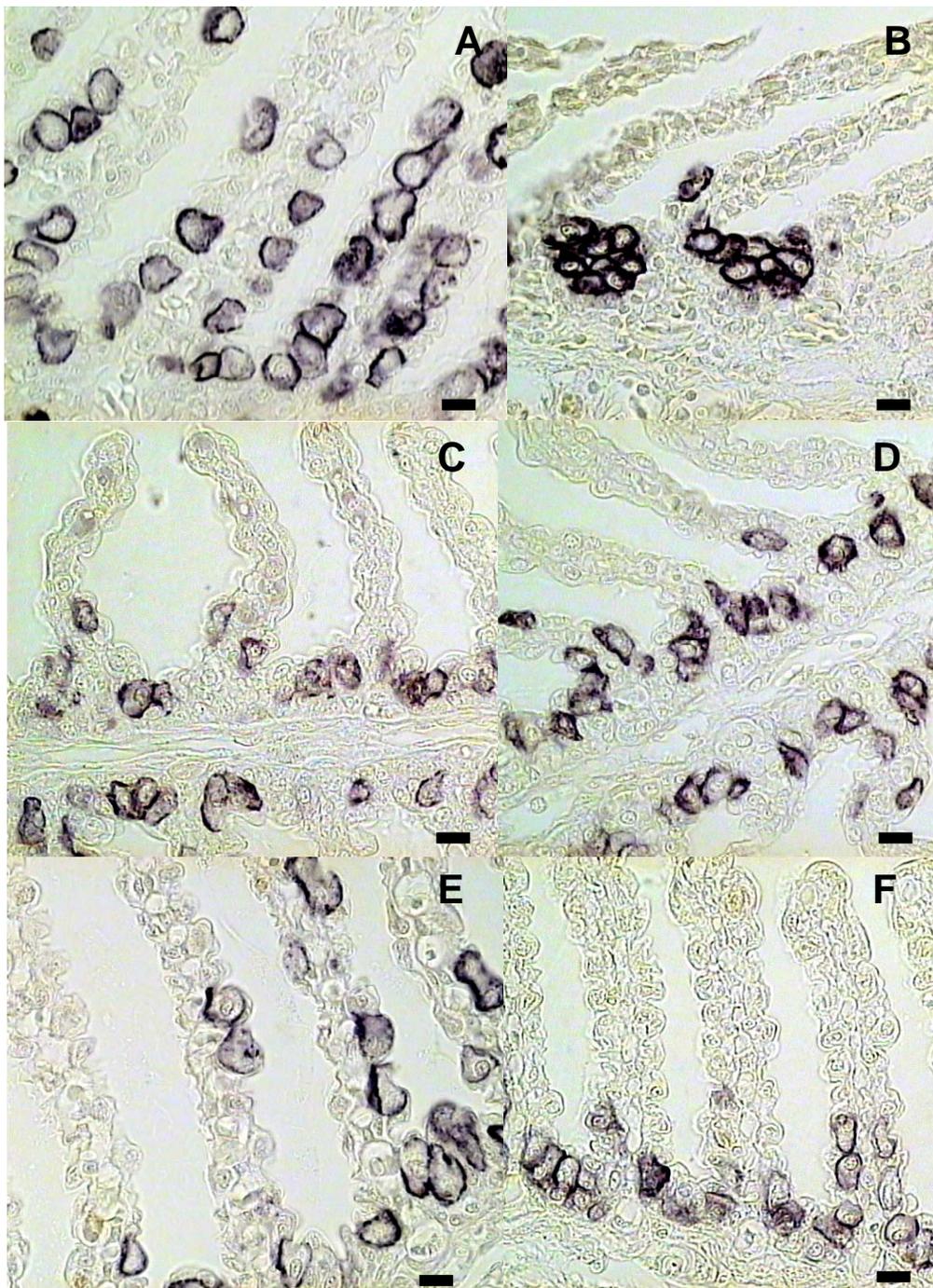


Figura 10. Corte transversal ao filamento branquial mostrando a distribuição das células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase nas lamelas e no filamento do 4º arco branquial de diferentes espécies de arraias de água doce: (A) *Potamotrygon schroederi*, (B) *Potamotrygon* sp., (C) *P. orbignyi*, (D) *P. scobina*, (E) *P. motoro*, (F) *Paratrygon aiereba*. Barras: 10 μm .

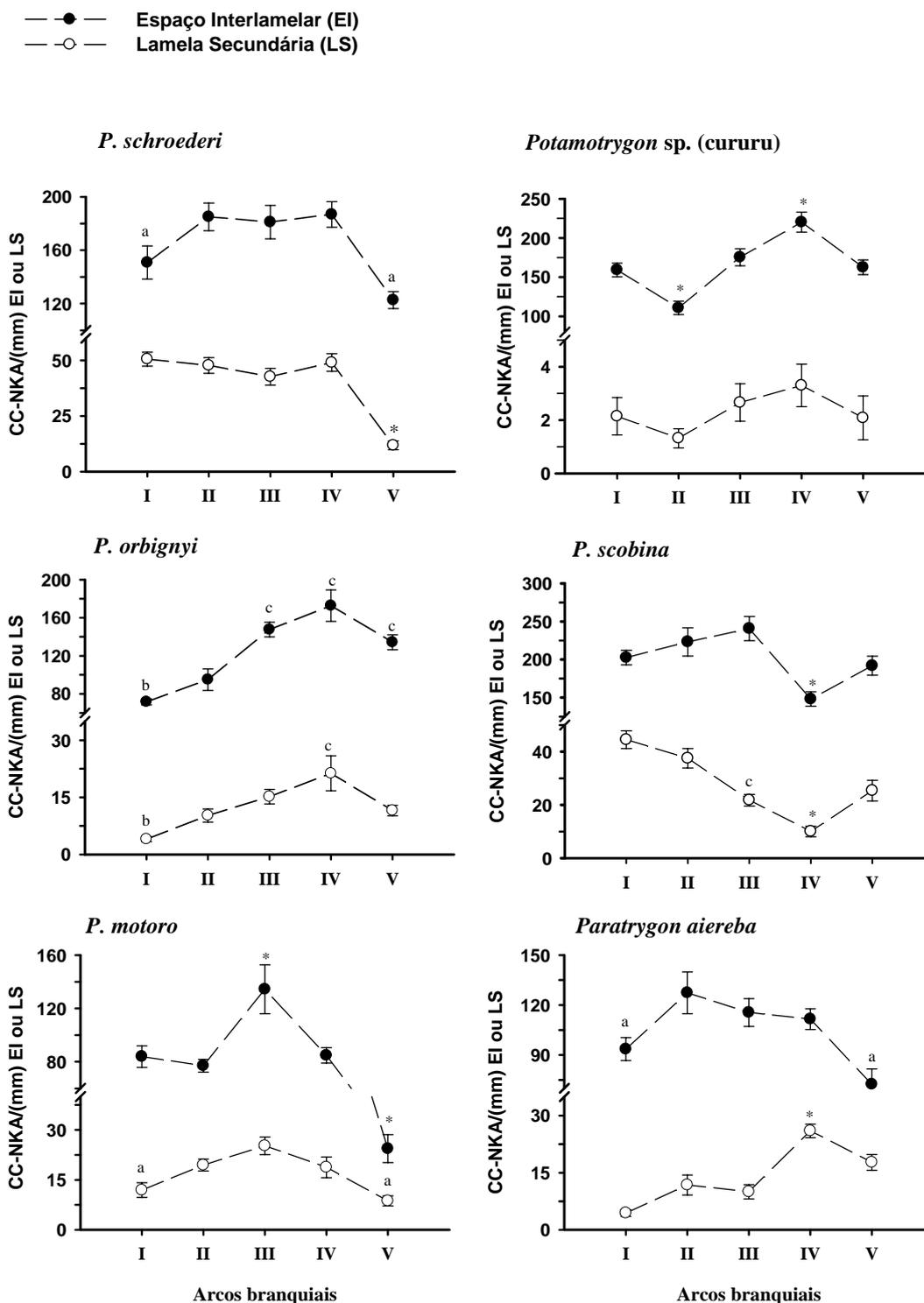


Figura 11. Variação (média±erro padrão, N=3 para cada espécie) no número de células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ - ATPase (CC-NKA) por milímetro de filamento de lamela (EI) ou por lamela secundária (LS) nos arcos branquiais dos potamotrigonídeos. (*) significativamente diferente ($P<0,05$) dos demais arcos branquiais. (a) indica diferença ($P<0,05$) dos arcos II, III e IV. (b) diferente significativamente ($P<0,05$) dos arcos III, IV e V. (c) indica diferença ($P<0,05$) dos arcos I e II.

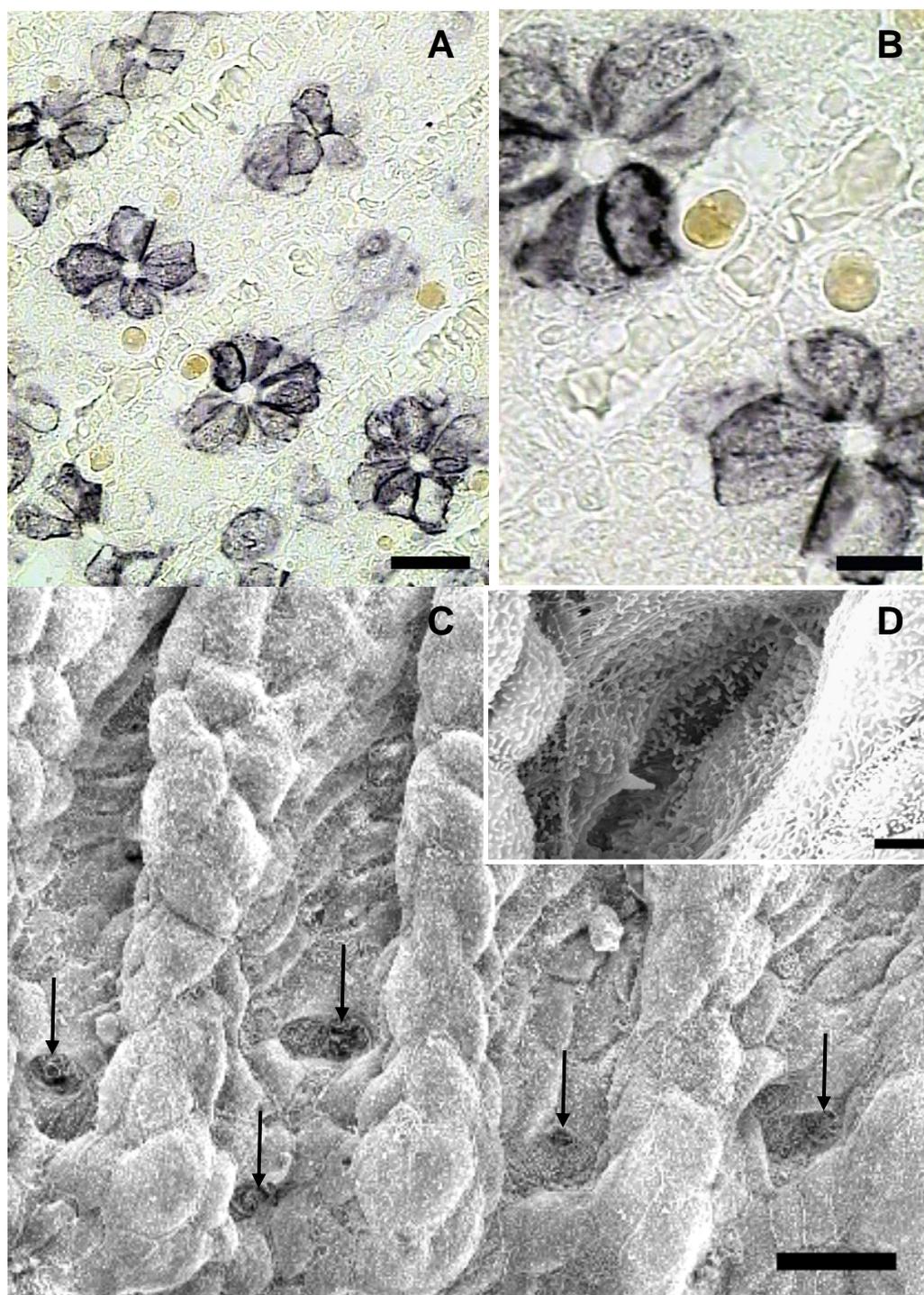


Figura 12. (A) Corte sagital ao filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) demonstrando que o complexo multicelular é constituído por células cloreto imuno-positivas para Na^+/K^+ -ATPase. (B) Detalhes dos complexos multicelulares nos espaços interlamelares. (C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando as prováveis aberturas dos canais (setas) dos complexos multicelulares localizados entre os espaços interlamelares. (D) Em detalhes, a abertura de um dos complexos multicelulares. Barras: (A) 20 μm , (B) 10 μm , (C) 25 μm , (D) 2 μm .

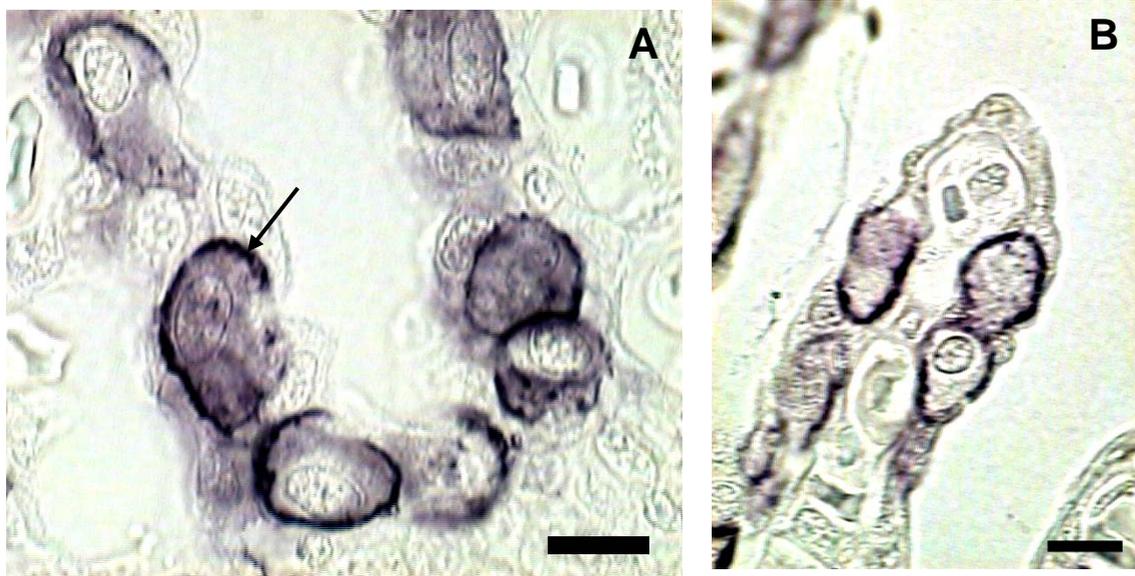


Figura 13. (A) Células imuno-positivas para células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase em *P. schroederi*. Notar maior intensidade de imuno-localização na região basolateral da célula cloreto (seta). (B) Células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase presentes na lamela de *P. schroederi*. Barras indicam: 10 μm .

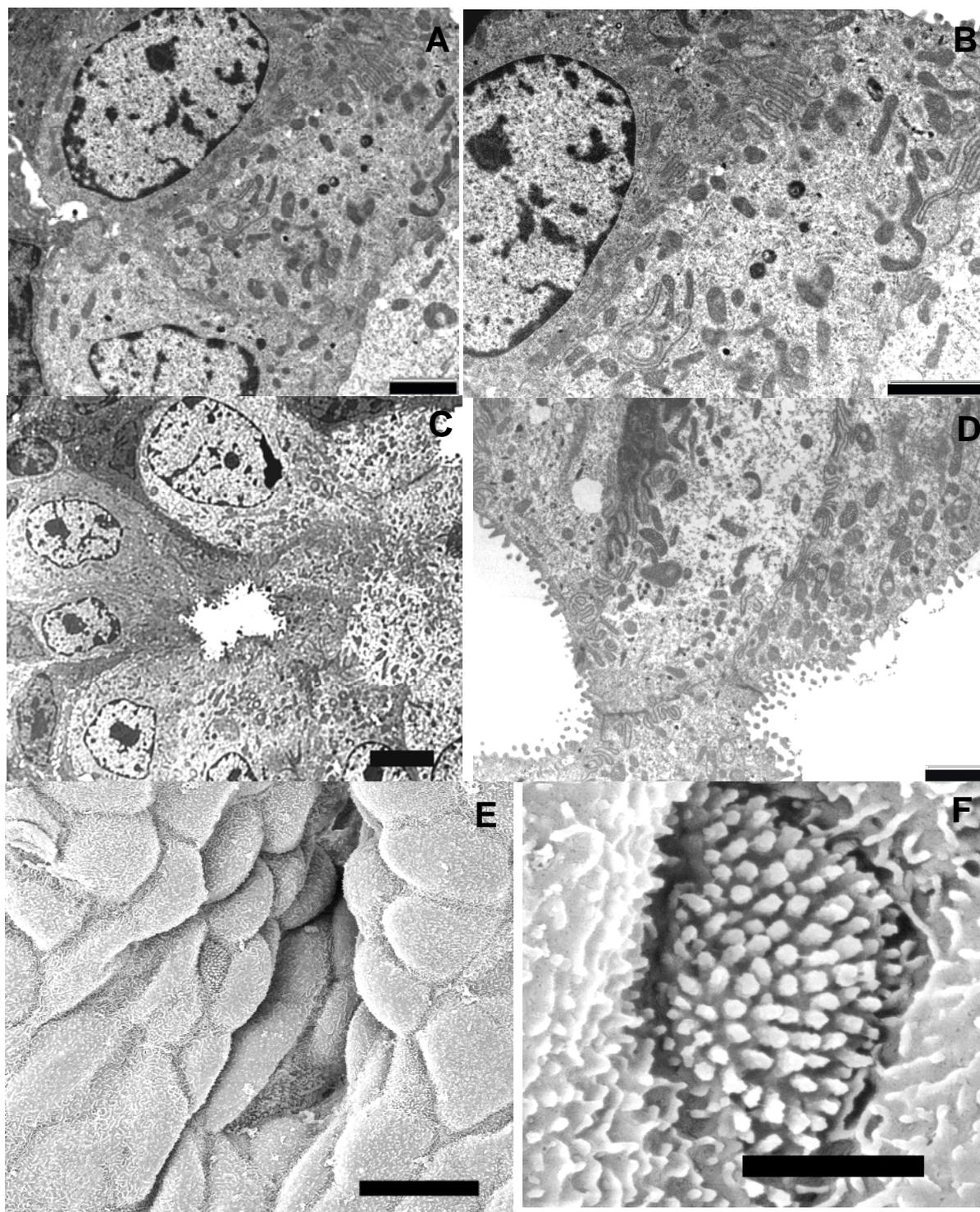


Figura 14. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrando a ausência de um sistema membranoso labirinto-tubulo-vesicular no citoplasma das células cloreto de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). (B) Detalhes das invaginações próximas à região sub-apical das células cloreto. (C) Detalhes em MET do complexo multicelular de células cloreto de *Potamotrygon* sp. (D) Detalhes em MET da região sub-apical e apical das células cloreto demonstrando a presença de mitocôndrias e microvilosidades apicais curtas. (E) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das brânquias de *Potamotrygon* sp. mostrando uma célula cloreto na lamela secundária. (F) Detalhe em MEV da superfície da célula cloreto mostrando as inúmeras microvilosidades. Barras: (A), (B), (D) e (F) 2 μ m; (C) 5 μ m; (E) 10 μ m.

DISCUSSÃO

A organização geral das brânquias de 6 espécies (das cerca de 11 encontradas na Amazônia) de arraias de água doce amazônicas da família Potamotrygonidae segue o mesmo padrão encontrado nos demais elasmobrânquios marinhos e eurialinos. Tipicamente, cinco pares de arcos branquiais estão presentes na câmara branquial sendo que o primeiro arco (arco hióideo) é constituído por uma hemibrânquia anterior (HUGHES, 1984). Nos demais arcos, o septo interbranquial separa cada hemibrânquia (ver EVANS et al., 2005 para recente revisão).

De acordo com Hughes (1984), a água que entra pelo espiráculo e/ou pela boca para a cavidade orofaríngea segue por entre as lamelas, pelos canais septais, para a câmara parabrâquial até sair pelas fendas branquiais. Funcionalmente, o que separa a cavidade orofaríngea da câmara parabrâquial é uma resistência branquial formada pelos filamentos branquiais e lamelas secundárias. Este é o padrão básico em todas as espécies, porém nos potamotrigonídeos observa-se a presença de uma “protuberância” em cada filamento branquial. Até o presente momento, não há relato da presença de tais estruturas nos filamentos branquiais de elasmobrânquios ou em outras classes de peixes (LAURENT, 1984; EVANS et al., 2005). Além disso, não há um padrão específico, i.é, na mesma espécie observam-se de 1-3 protuberâncias enfileiradas nos filamentos branquiais, e também varia de espécie para espécie.

Histologicamente, a camada submucosa da protuberância é constituída por tecido conjuntivo mucoso, indicando a presença de células semelhantes aos fibroblastos imersos em uma matriz extracelular Alcian-blue positiva. Em vertebrados superiores este tecido embora firme é extremamente flexível. Possivelmente, nos potamotrigonídeos a presença de uma protuberância na região medial do filamento branquial influencia o caminho e a distribuição do fluxo de água ao longo do comprimento do filamento.

Estudos sobre morfologia branquial de elasmobrânquios são relativamente escassos. Em termos práticos, as medidas das dimensões físicas das brânquias podem auxiliar e complementar os dados sobre as

funções de trocas gasosas (HUGHES et al., 1982; HUGHES, 1984), iônicas (EVANS et al., 1999; EVANS et al., 2005) e equilíbrio ácido-base (CLAIBORNE et al., 2002) nas brânquias de peixes. O arranjo e a forma dos filamentos branquiais dos potamotrigonídeos são similares aos de outros elasmobrânquios (HUGHES, 1984).

Entre os potamotrigonídeos o número de filamentos é bastante variável, tanto entre os arcos branquiais, quanto entre as espécies. Hughes (1984) observou que, na maioria dos peixes, o número de filamentos nas duas hemibrânquias de uma mesma holobrânquia tende a ser similar. Esta mesma tendência foi observada nos potamotrigonídeos. O número de filamentos branquiais não é profundamente afetado pelo crescimento, mas o comprimento total do filamento é uma função da idade dos peixes (HUGHES, 1984; HUGHES et al., 1986). Provavelmente, isto pode explicar a grande variabilidade interespecífica nas medidas de comprimento dos filamentos dos exemplares de Potamotrygonidae estudados. Segundo Hughes (1984), o comprimento do filamento é uma das mais importantes dimensões morfométricas usadas no cálculo da área branquial, uma vez que a medida da área superficial da lamela secundária é um procedimento extremamente difícil.

Informações preliminares baseadas em morfometria estereológica do sistema respiratório branquial de potamotrigonídeos revelam que estas arraias possuem uma grande área de superfície respiratória que varia de 3,0 cm²/g em *Potamotrygon* sp a 8,0 cm²/g em *P. schroederi* (COSTA, O.T.F., DUNCAN, W.P., ARAÚJO, M.L.G., FERNANDES, M.N., dados não publicados). Tais valores podem ser extremamente elevados, se o estilo de vida do animal for levado em consideração. A área respiratória e a distância de difusão de gases são altamente correlacionadas com o estilo de vida e o habitat dos peixes (DE JAGER & DEKKERS, 1975). Assim sendo, os potamotrigonídeos parecem violar este paradigma.

As arraias de água doce (Potamotrygonidae) possuem baixa mobilidade e, normalmente formam populações locais com baixa capacidade de dispersão, provavelmente são territoriais e filopátricas (FREDERICO, 2006; RINCON, 2006a). Além disso, possivelmente este estilo de vida pode estar associado à baixa taxa metabólica. No entanto, a área superficial branquial de

P. schroederi é superior a de muitos elasmobrânquios predadores ativos, como o tubarão-branco, *Carcharodon carcharias* (5,1 cm²/g) (EMERY & SZCZEPANSKI, 1986), e próximo de 12,3 cm²/g do atum, *Thunnus thynnus* (DE JAGER & DECKKERS, 1975), um valor anatomicamente comparável ao pulmão de mamífero (ver revisão de PERRY, 1992).

A espessura da barreira água-sangue (distância de difusão de O₂) na lamela secundária dos potamotrigonídeos é similar a de muitos elasmobrânquios. Por exemplo, para duas espécies que vivem no Rio Negro, os valores da espessura de difusão água-sangue foram estimados em 3,6 µm para *Potamotrygon* sp. e 5,1 µm para *P. schroederi* (COSTA, O.T.F., DUNCAN, W.P., ARAÚJO, M.L.G., FERNANDES, M.N., dados não publicados). Estes valores são próximos do estimado para a arraia marinha, *Raja montagui* (4,8 µm) (BUTLER, 1999). Elasmobrânquios normalmente possuem barreira água-sangue mais espessa que teleósteos (HUGHES, 1984; BUTLER, 1999), mas a distância de difusão água-sangue tende a não ser homogênea ao longo da lamela, e entre as lamelas de um mesmo filamento (HUGHES, 1984). Estas variações podem ser explicadas pelas mudanças e/ou alterações na distribuição das células que constituem o epitélio branquial (FERNANDES & PERNA-MARTINS, 2002; KATOH & KANEKO, 2003; EVANS et al., 2005).

Nos peixes, o epitélio que reveste os filamentos branquiais e as lamelas secundárias não forma apenas uma distinta barreira entre os ambientes externo e interno, mas possui um papel crítico nas mais importantes funções branquiais, tais como transporte de gases (PERRY, 1997), osmorregulação (MARSHALL & BRYSON, 1998; EVANS et al., 1999; EVANS et al., 2005) e equilíbrio ácido-base (CLAIBORNE & EVANS, 1992; CLAIBORNE et al., 2002). O epitélio branquial dos potamotrigonídeos é constituído pelos mesmos tipos de células diferenciadas que caracterizam o epitélio dos demais peixes: célula pavimentosa (CPV), célula mucosa (CM) e célula cloreto (CC).

Em maior número, as CPVs recobrem quase toda a superfície das lamelas secundárias e do filamento, incluindo o espaço interlamelar. A membrana apical das CPVs pode apresentar microvilosidades ou microdobras, cujo padrão varia entre espécies e também varia dentro do próprio epitélio de um mesmo indivíduo. A superfície apical da maioria das CPVs possui

microvilosidades em *Paratrygon aiereba* e microdobras nos demais potamotrigonídeos. Em alguns casos, a similaridade na aparência superficial das CPVs e CCs dos potamotrigonídeos torna difícil uma distinção entre os dois tipos celulares baseada apenas nas suas características superficiais. Tais características também foram observadas no epitélio branquial do tubarão *Squalus acanthias* (WILSON et al., 2002) e na arraia euri-halina *Dasyatis sabina* (EVANS et al., 2005). De acordo com Evans et al. (2005), estas projeções provavelmente aumentam a área de superfície funcional do epitélio e podem ter um papel importante tanto na manutenção do muco na superfície branquial, quanto na hidrodinâmica do fluxo de água ao produzir microturbulências na superfície epitelial da lamela aumentando a eficiência de troca gasosa. Em peixes de água doce, existem evidências que as CPVs têm papel importante na tomada de íons e equilíbrio ácido-base (PERRY, 1997; EVANS et al., 1999; EVANS et al., 2005).

Em agnatas e elasmobrânquios marinhos, as CPVs possuem grânulos secretores apicais ou vesículas contendo muco que, posteriormente se fundem com a membrana celular apical (EVANS et al., 1999; EVANS et al., 2005). As CPVs dos potamotrigonídeos apresentam reação citoquímica PAS-positiva, indicando a presença de mucosubstâncias neutras. Detalhes ultraestruturais da região sub-apical das CPVs dos potamotrigonídeos evidenciam a presença dessas vesículas sub-apicais contendo provavelmente material mucoso.

As CMs em Potamotrygonidae estão distribuídas principalmente nas bordas externa e interna do filamento branquial e são raras nos espaços interlamelares e nas lamelas. O emprego de métodos citoquímicos (reação com Alcian blue e PAS) indica que as CMs dos potamotrigonídeos sintetizam mucosubstâncias ácidas e neutras. Como estas células são grandes, a secreção do material mucoso pode ser auxiliada por células similares às células mio-epiteliais. Mucosubstâncias ácidas podem prevenir a proliferação de microrganismos patogênicos na superfície epitelial (MITTAL et al., 1994); enquanto as mucosubstâncias neutras podem estar associadas à proteção e lubrificação do epitélio branquial contra o atrito (SIBBING & URIBE, 1985).

As arraias são bentônicas e têm como hábito se enterrar na areia; portanto, suas mucosas normalmente se expõem às partículas de sedimentos

durante a resuspensão do sedimento. Assim, as CPVs e as CMs no filamento branquial das arraias de água doce desempenham um papel essencial na produção de muco para lubrificação, proteção física e microbiológica. Segundo Handy & Eddy (1991), o muco que recobre o epitélio branquial dos peixes de água doce apresenta maior concentração de Na^+ e Cl^- do que a água circundante. Isto pode ser de extrema importância para os mecanismos de transporte iônico no epitélio branquial das arraias de água doce, principalmente para *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon schroederi*, *P. motoro*, *P. aff. orbignyi* e *Potamotrygon* sp., espécies que vivem nas águas pobres em íons do Rio Negro.

Em se tratando de mecanismos de transporte iônico, as CCs são consideradas as mais importantes células do epitélio branquial devido ao seu papel na regulação iônica (PERRY et al., 1992; PERRY, 1997; MARSHALL & BRYSON, 1998). Diferente da maioria dos teleósteos, as CCs dos elasmobrânquios marinhos possuem uma membrana basolateral com invaginações moderadas (LAURENT, 1984). Estudos ultraestruturais das CCs dos potamotrigonídeos indicam que estas células são semelhantes às aquelas observadas nos representantes marinhos. Isto explica a forte marcação imunohistoquímica (anticorpo contra a Na^+/K^+ -ATPase) na periferia e, sobretudo, na região basolateral das CCs-NKA das arraias de água doce. Vários autores sugerem que estas invaginações na região basolateral são os prováveis sítios de localização da Na^+/K^+ -ATPase (PISAM et al., 1990; PIERMARINI & EVANS, 1998; PIERMARINI & EVANS, 2000) e da V-H^+ -ATPase (PIERMARINI & EVANS, 2001; PIERMARINI et al., 2002).

Quase todas as descrições morfológicas das CCs têm sido realizadas primariamente em peixes marinhos (PISAM, 1981; PISAM et al., 1990) ou eurialinos (KOTOH & KANEKO, 2003; KATOH et al., 2003). Poucos estudos foram realizados em elasmobrânquios, incluído as espécies euri-halinas. Recentemente, Evans et al. (2005) descreveram as CCs das brânquias de *Dasyatis sabina*, uma arraia euri-halina que também vive na água doce. Nesta arraia, a CC possui um denso agrupamento de microvilosidades na superfície apical. Em microscopia eletrônica de varredura, a superfície apical da maioria

das CCs dos potamotrigonídeos tem a mesma aparência daquelas descritas para *D. sabina*.

Diferente das CPVs, as CCs ocupam apenas uma pequena proporção (<10%) da área epitelial das brânquias (PERRY, 1997; EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). Além disso, enquanto as CPVs são encontradas em todo epitélio branquial, as CCs são usualmente comuns na região aferente (“trailing edge”) do filamento e, na maioria dos peixes são raramente encontradas no epitélio da lamela secundária (PERRY, 1997; EVANS et al., 2005). Contudo, em algumas espécies, sob certas condições ambientais (por exemplo, águas pobres em íons) podem proliferar na lamela (FERNANDES & PERNA-MARTINS, 2002; KATOH & KANEKO, 2003).

Em todas as arraias da família Potamotrygonidae a distribuição das CCs imuno-positivas para Na^+/K^+ -ATPase (CCs-NKA) ocorre preferencialmente nos espaços interlamelares na região aferente do filamento branquial, e podem ainda ser encontradas difusas no epitélio da lamela secundária. Em *P. schroederi*, uma espécie comum nas águas pretas, ácidas e pobre em íons da bacia do Rio Negro, as CCs-NKA são numerosas nas lamelas. A presença de CC-NKA na lamela branquial tem sido descrita para a *D. sabina* capturada na água doce (PIERMARINI & EVANS, 1998; PIERMARINI & EVANS, 2000). De acordo com estes autores, o aumento do número de CC-NKA nas lamelas e nos espaços interlamelares possivelmente representa um mecanismo de regulação iônica para criar um elevado gradiente eletrogênico para absorção de Na^+ e Cl^- a partir de um meio extremamente hipo-iônico em relação ao animal (para revisões recentes, ver EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). Isto pode ser particularmente vantajoso para as espécies que vivem nos habitats ionicamente pobres do Rio Negro, tais como *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. aff. orbignyi*, *Potamotrygon* sp. e *P. schroederi*.

A distribuição das CCs-NKA entre os arcos branquiais dos potamotrigonídeos provavelmente pode estar associada à hidrodinâmica do fluxo de água. Pois, na maioria das espécies, as CCs-NKA são mais numerosas nos 3º e o 4º arcos branquiais. Este padrão corrobora os dados sobre atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) de *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon* sp. (ver capítulo 4). Assim, a distribuição assimétrica das CCs-

NKA e os níveis de atividade da Na^+/K^+ -ATPase entre os diferentes arcos branquiais impõem cautela sobre a escolha de qual arco branquial deverá ser utilizado para estudos sobre osmorregulação de uma dada espécie.

Em *Potamotrygon* sp., as CCs-NKA localizadas nos espaços interlamelares formam complexos multicelulares cuja organização histológica é similar a uma cripta. Este padrão de organização ainda não foi encontrado nas demais espécies de potamotrigonídeos estudadas. Grupos de CCs formando complexos multicelulares (com outras CCs ou células acessórias) são comuns em teleósteos marinhos e raros em peixes de água doce (HWANG, 1988; KATOH & KANEKO, 2003; EVANS et al., 2005). Foi observada organização similar de CCs no epitélio opercular do teleósteo eurialino *Rivulus marmoratus* aclimatado à água doce (MARSHALL et al., 1997), porém, até o presente momento não havia sido descrito em elasmobrânquios.

O papel dos complexos multicelulares de CCs e a presença apenas em *Potamotrygon* sp. ainda são desconhecidos. Além disso, é instigante investigar se estas estruturas estão relacionadas ao endemismo desta espécie e/ou a sua distribuição geográfica restrita à bacia do Rio Negro (ver capítulo I). Todavia, a formação de complexos multicelulares de CCs nesta espécie inspira algumas implicações sobre a história evolutiva e ecofisiologia da família Potamotrygonidae.

Potamotrygon sp. é uma espécie basal dentro da família Potamotrygonidae (MARQUES, 2000; TOFOLLI, 2006). Como discutido no capítulo I, se a família Potamotrygonidae é monofilética (LOVEJOY et al., 1998; MARQUES, 2000; TOFOLLI, 2006), poder-se-ia assumir que os complexos multicelulares de CCs representariam relíquias morfológicas do ancestral dos potamotrigonídeos. Porém, até o presente momento tais estruturas ainda não foram observadas nas demais espécies de arraiais de água doce e, principalmente, em *Paratrygon aiereba* que é a espécie mais basal dentre todos os membros da família Potamotrygonidae. Os complexos multicelulares de CCs em *Potamotrygon* sp. pode não ser um traço plesiomórfico, mas uma autapomorfia dentro do grupo. Os mais recentes estudos filogenéticos baseados em dados moleculares sugerem que o gênero *Potamotrygon* é

polifilético, pelo menos parcialmente, o que poderia explicar a presença dos complexos multicelulares de CCs apenas em *Potamotrygon* sp.

Do ponto vista osmorregulatório, os complexos multicelulares de CCs podem ter sido importante para a tolerância de *Potamotrygon* sp. às águas pobres em íons da bacia do Rio Negro. Em elasmobrânquios, a presença do septo interbranquial cria uma resistência adicional à água que passa por entre as lamelas que, posteriormente corre pelo canal septal (BUTLER, 1999). Assim, a localização dos complexos multicelulares de CCs na região aferente do filamento (“trailing edge”) pode ser vantajosa para a troca iônica, uma vez que estas estruturas estão profundamente associadas ao compartimento arterio-venoso da região aferente (“trailing edge”) do filamento. A presença destas estruturas provavelmente pode estar relacionada à secreção de H^+ para o meio aquático, do mesmo modo como fazem as células parietais gástricas. Os elasmobrânquios secretam ácidos em seus estômagos contra um forte gradiente de concentração (KOELZ, 1992), esta secreção de H^+ tem sido atribuída ao sistema não-eletrogênico de transporte antiporte H^+/K^+ - ATPase (JAISSER & BEGGAH, 1999). Recentemente, Choe et al. (2004) demonstraram que as glândulas gástricas e as brânquias da arraia euri-halina *Dasyatis sabina* expressam H^+/K^+ - ATPase. Nesta espécie, a H^+/K^+ - ATPase localiza-se nas mesmas CCs ricas em Na^+/K^+ - ATPase e, que além da excreção de H^+ , tais células podem ser responsáveis pela absorção de K^+ , principalmente durante aclimatação no ambiente de água doce (CHOE et al., 2004).

O atual modelo de absorção de Na^+ , Cl^- e excreção de H^+ e HCO_3^- para *D. sabina* foi proposto por Evans et al. (2004). Para estes autores, as CCs-NKA possuem um trocador apical eletroneuro Na^+/H^+ , enquanto as células cloreto ricas em $V-H^+$ - ATPase possuem outro trocador eletroneuro Cl^-/HCO_3^- . Recentemente, Choe et al. (2007) observaram que o mesmo mecanismo de absorção de Na^+ também está presente em *Squalus acanthias*, um elasmobrânquio marinho estenoalino. Portanto, isto sugere um mecanismo bastante conservativo e que, provavelmente, pode estar presente nas CCs das arraias da família Potamotrygonidae.

Em resumo, as brânquias das arraias de água doce da família Potamotrygonidae apresentam a mesma organização básica encontrada nos demais elasmobrânquios. No entanto, a presença de uma “protuberância” no filamento branquial provavelmente pode influenciar a hidrodinâmica afetando a resistência branquial e direcionando o fluxo de água para regiões específicas ao longo do filamento branquial. No epitélio branquial, as CPVs também estão relacionadas à produção de mucosubstâncias neutras, enquanto as CMs produzem mucosubstâncias neutras e ácidas, sendo encontradas nas bordas externas dos filamentos branquiais, e ausentes nas lamelas e nos espaço interlamelares. As CCs-NKA são abundantes no espaço interlamelar, principalmente na região aferente (“trailing edge”) do filamento. Em *Potamotrygon* sp., as CCs-NKA se organizam e formam complexos multicelulares, as quais provavelmente aumentam a eficiência na absorção de Na^+ , K^+ , Cl^- e excreção de base, material nitrogenado e H^+ para um ambiente extremamente ácido como as águas da bacia do Rio Negro.

CAPÍTULO 3

**MORFOMETRIA BRANQUIAL, Na⁺/K⁺ -ATPase E CÉLULA CLORETO DE
Paratrygon aiereba E *Potamotrygon* sp. (ELASMOBRANCHII:
POTAMOTRYGONIDAE)**

Palavras-chave: Morfometria branquial, *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon* sp., Na⁺/K⁺ -ATPase, Células cloreto

INTRODUÇÃO

As brânquias são órgãos multifuncionais. São estruturas especializadas em várias funções, incluindo troca gasosa, osmorregulação, equilíbrio ácido-base, e excreção de produtos de nitrogenados (EVANS et al., 2005). Por causa destas múltiplas funções, as brânquias têm sido intensivamente estudadas dentro de uma perspectiva morfológica e fisiológica (PERRY, 1997; CLAIBORNE et al., 2002; FERNANDES et al., 2007). Contudo, a despeito dessa vasta informação, a maioria dos estudos morfológicos e/ou fisiológicos freqüentemente considera as holobrânquias ou arcos branquiais como unidades estruturais idênticas dentro do sistema branquial (PERRY & FARRELL, 1989).

Alguns estudos têm demonstrado a natureza morfológica heterogênea dentre os arcos branquiais (HUGHES, 1984; HUGHES et al., 1986; KARAKATSOULI et al., 2006). Hughes & Morgan (1973) foram um dos primeiros a propor que o segundo arco branquial é o mais representativo em termos de área de superfície. Hughes (1984) estabeleceu e desenvolveu a metodologia necessária para estudos morfofuncionais. Assim, a maioria dos estudos sobre morfologia e fisiologia branquial foi realizada no segundo arco branquial. Recentemente, Karakatsouli et al. (2006) descreveram os detalhes morfométricos das brânquias de *Spaurus aurata* e, encontraram que o terceiro arco branquial é o mais representativo em termos de área de superfície branquial. Wootten (1974) baseado na distribuição de parasitas sobre o epitélio branquial sugeriu que cada arco branquial possui fluxo de água diferenciado. Porém, a heterogeneidade fisiológica entre as holobrânquias foi demonstrada em *Pleurinectes flesus*. Lyndon & Brechin (1999) sugeriram que nesta espécie o primeiro arco branquial é consistentemente mais ativo para a síntese protéica do que o segundo e terceiro arco branquial. Considerando que as brânquias são estruturas multifuncionais, nenhum estudo foi realizado para investigar se as diferenças morfométricas entre os arcos branquiais influenciam nos processos osmorregulatórios, principalmente na atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase e na distribuição e localização das células cloreto.

A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) é uma bomba eletrogênica que impulsiona a maioria dos sistemas de transporte iônico branquial (MARSHAL & BRYSON, 1998). Como nos demais peixes, esta enzima exerce um papel crucial para os processos osmorregulatórios dos elasmobrânquios (EVANS et al., 2004). Neste grupo, a NKA

localiza-se na região basolateral das células cloreto (WILSON et al., 2002; EVANS et al., 2005). Um anticorpo para a sub-unidade α desta enzima serve como marcador imuno-citoquímico específico para a célula cloreto (PIERMARINI & EVANS, 2000; KANEKO & KATOH, 2004). Em *Squalus acanthias*, um elasmobrânquio marinho, foi demonstrado uma forte correlação positiva entre a atividade da NKA e o número de células cloreto (WILSON et al., 2002). As células cloreto ricas em NKA têm papel essencial na tomada de íons pelas brânquias, sobretudo, em ambientes de baixa salinidade. Segundo Piermarini & Evans (2000), em *Dasyatis sabina* a diferença na atividade da NKA branquial está positivamente correlacionada com as mudanças na expressão da NKA e, portanto, provavelmente relacionada ao número de células cloreto imuno-positivas para a NKA (CC-NKA). Além disso, a abundância relativa e a atividade específica da NKA branquial estavam negativamente correlacionadas com o aumento da salinidade ambiental (PIERMARINI & EVANS, 2000; EVANS et al., 2004).

Porém, nenhum estudo foi realizado sobre atividade da NKA e distribuição das CC-NKA no epitélio branquial das arraias de água doce da família Potamotrygonidae. Do mesmo modo, nenhum estudo foi realizado para verificar as variações na atividade específica da enzima NKA entre os diferentes arcos branquiais. Ou ainda, se a atividade da NKA é uma função do número de célula cloreto ou das características morfométricas de cada arco branquial. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi caracterizar a morfometria branquial, estimar a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e o número de células cloreto imuno-positivas para a NKA em *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon* sp. para determinar qual a contribuição individual dos arcos branquiais para os processos osmo-ionorregulatórios das arraias de água doce.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Potamotrygon* sp. ($236,9 \pm 21,6$ g; $17,5 \pm 1,3$ cm largura de disco; $N= 09$) e *Paratrygon aiereba* ($639,1 \pm 61,3$ g; $25,4 \pm 1,1$ cm largura de disco; $N= 13$) foram capturados com auxílio de rapichés e/ou puçás no Arquipélago de Mariuá, no Rio Negro (município de Barcelos, AM). Após as coletas, as arraias foram mantidas em tanque-rede para aclimatização por um período de 24-48 h. Após isto, os animais foram anestesiados (MS-222, Sigma Co.) e sacrificados por meio de contusão espinhal.

Todos os cinco pares de arcos branquiais foram cuidadosamente removidos. Um dos quais foi congelado (em N₂-líquido) para posterior análise da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, enquanto outro fixado em solução Bouin. As características morfométricas dos filamentos branquiais (número e comprimento total) foram determinadas. O comprimento do filamento foi realizado por meio de medidas sistematizadas dos filamentos branquiais, a partir da região ventral, conforme Saroglia et al., 2007.

Amostras de cada um dos cinco arcos branquiais (apenas a hemibrânquia posterior) foram desidratadas e incluídas em parafina. Os cortes de 6 µm sagitais ao filamento branquial foram obtidos por meio de um micrótomo MICROM HM360. A localização das células cloreto ricas em Na⁺/K⁺-ATPase (CC-NKA) foi realizada por métodos imuno-citoquímicos, modificados a partir de Piermarini & Evans (2000). Brevemente, os cortes foram desparafinizados, e, em seguida lavados em tampão fosfato de potássio-salino (TPS, 10 mM, pH 7,4). As ligações não específicas foram bloqueadas após a adição de H₂O₂ 10% durante 20 min, seguido de soro de cabra (20% em TPS com Triton X-100, 0,1%) durante 20 min. Os cortes foram incubados durante a noite com o anticorpo primário anti- α-5 Na⁺/K⁺-ATPase (1:100 em TPS com Triton X-100, 0,1%). Após isso, os cortes foram lavados em TPS durante 10 min. Os cortes foram incubados durante 1 hora em um segundo anticorpo conjugado com a Peroxidase anti-peroxidase (IgG goat anti-mouse Peroxidase) diluído 1:150 em TPS. O excesso foi retirado por meio de lavagens em TPS por 10 min cada. Todas as incubações foram realizadas em baixa temperatura em câmara úmida e escura. A coloração das CC-NKA foi realizada com solução de 3-3-diaminobenzidine com sulfato de níquel II amônio em H₂O₂. A coloração apareceu entre 5 a 10 min. A coloração não se desenvolveu quando o anticorpo primário (IgGα5) foi omitido nas secções controle.

A identificação das CC-NKA foi realizada em perfis de 3 cortes/animal (3 animais/espécie) em cada um dos cinco arcos branquiais. Foram realizadas 50 contagens independentes e aleatórias (nas lamelas e nos espaços interlamelares, separadamente). Os espaços interlamelares e as lamelas foram mensurados. Os resultados estão expressos em total de CC-NKA por milímetro de espaços interlamelares ou lamelas. Todas as medidas foram realizadas utilizando um microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmera de vídeo e um microcomputador com o software C.A.S.T. System (Olympus, Denmark).

A determinação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) segue conforme McCormick (1993). Os ensaios da NKA foram analisados independentemente em cada arco branquial. Os homogeneizados foram preparados em tampão SEI (Sacarose, 0,3 M; EDTA, 20 mM; Imidazol, 0,1 M) em baixa temperatura a 7.000 rpm usando um homogeneizador (Dispensor Extratur, Quimis), e, então centrifugados (Sigma 30-K) durante 30 min a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi usado para determinação dos níveis de proteínas totais e da atividade da NKA. A atividade da enzima foi realizada nas seguintes condições de ensaio: 1µg de proteína: 1µL de tampão contendo NaCl (100 mM), MgCl_2 (5 mM), KCl (13 mM), ATP (3 mM) e imidazol (30 mM). Um segundo ensaio foi realizado simultaneamente contendo os mesmos reagentes, exceto KCl, e o inibidor da Na^+/K^+ -ATPase (ouabaína). O fosfato inorgânico produzido pela hidrólise do ATP foi determinado pelo método de Fiske & Subbarow (1925). A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase foi definida como sendo a diferença entre o fosfato liberado na mistura de ensaio na presença e ausência de ouabaína. As leituras de absorvância foram realizadas em 620 nm (Spectrum SP-2000 UV) e a atividade específica expressa em µmoles de Pi/ mg proteína/h.

Os resultados estão apresentados como média±erro padrão da média. Os dados da atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase entre os arcos branquiais individuais foram testados quanto a normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov). As diferenças entre os arcos branquiais foram analisadas por meio de uma ANOVA não-paramétrica (teste Kruskal-Wallis). A análise de correlação de parcial foi realizada entre as variáveis osmo-ionorregulatórias (níveis da Na^+/K^+ -ATPase *versus* somatório das células cloreto presente no espaço interlamelar e na lamela de cada arco branquial= filamento+lamela) e variáveis morfométricas (número e comprimento total de filamentos) presentes em cada arco branquial individual. Em todos os testes, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Morfometria branquial

Para uma visão quantitativa geral, o número total, o comprimento total e o comprimento médio de filamento de todo o sistema branquial para as duas espécies de Potamotrygonidae estão apresentados na Tabela 1, enquanto a morfometria dos arcos branquiais individuais em *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon* sp., estão apresentados nas figuras 1A e 1B, respectivamente. Como em muitos elasmobrânquios, o primeiro arco branquial possui apenas uma hemibrânquia (posterior). O número de filamentos diminui do II para o V arco branquial, sendo a que a primeira hemibrânquia (I arco branquial) possui tamanho similar às holobrânquias do V arco em ambas as espécies. Os filamentos do I arco branquial são mais curtos que os demais arcos branquiais. Usualmente, os filamentos do II e III arcos branquiais são mais longos que os demais. Os filamentos das hemibrânquias craniais (anteriores) são ligeiramente mais curtos que das hemibrânquias caudais (posteriores), facilmente observado em *Potamotrygon* sp. Ao longo do arco branquial, os filamentos mais curtos estão inseridos na região mediana do arco branquial, enquanto os mais compridos estão localizados nas regiões ventrais e dorsais.

Tabela 1. Morfometria de alguns dos componentes branquiais de *Paratrygon aiereba* (N=4; 176,7±26,7 g; largura do disco= 16,5±3,4 cm) e *Potamotrygon* sp. (N=3; 390,0±29,3g; largura do disco= 19,3±1,5 cm).

Variáveis morfométricas	<i>P. aiereba</i>	<i>Potamotrygon</i> sp.
Número total de filamentos	1571,5±13,9	1480,0±23,7
Comprimento médio dos filamentos (mm)	5,8±0,05	5,0±0,1
Comprimento total dos filamentos (mm)	9474,4±221,8	8014,9±139,3

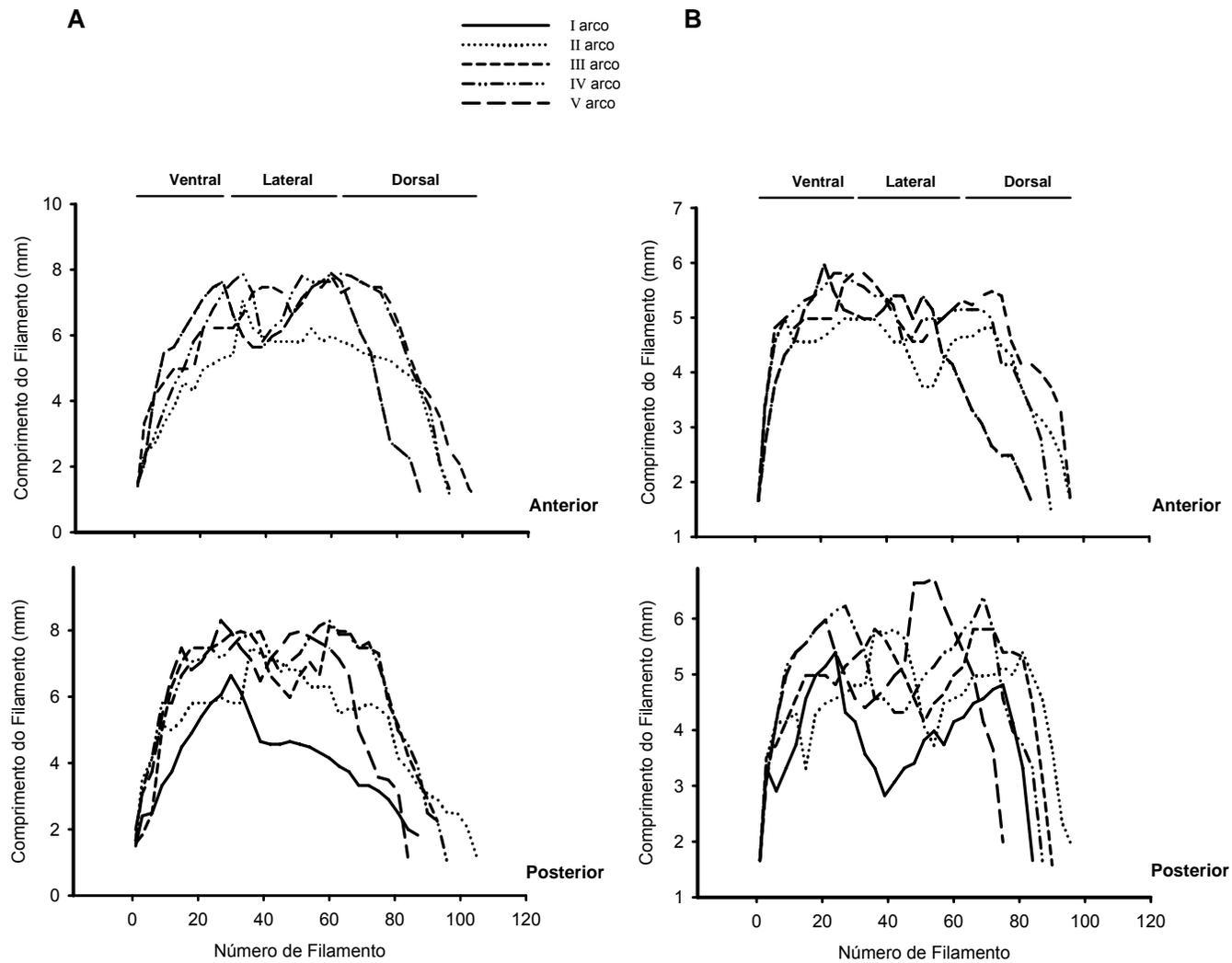


Figura 1. Comprimento dos filamentos das hemibrânquias anterior e posterior nos cinco arcos branquiais de (A) *Paratrygon aiereba* (LD= 18,2 cm; peso= 230 g) e (B) *Potamotrygon* sp. (largura do disco= 17 cm; peso= 345 g).

Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, imunolocalização e distribuição das células cloreto

A atividade específica da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e a localização e a distribuição das células cloreto ricas em NKA (CC-NKA) por espaço interlamelar (filamento) e por lamela foram determinadas em cada arco branquial de *Paratrygon aiereba* (Fig. 2A) e *Potamotrygon* sp. (Fig. 2B). Elevados níveis da enzima NKA foram encontradas no IV arco branquial de *P. aiereba* e *Potamotrygon* sp. ($2,49 \pm 0,11$ e $2,52 \pm 0,14$ $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/h, respectivamente), o qual foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que nos demais arcos branquiais. A análise de correlação revela que a elevada atividade específica da NKA no IV arco branquial deve-se principalmente a grande quantidade de células cloreto ricas em NKA ($r^2 = 0,84$; $P < 0,05$), e não está diretamente relacionada ($P > 0,05$) às características morfométricas (número e/ou comprimento dos filamentos) dos arcos branquiais individuais. No entanto, em *Potamotrygon* sp., a ausência de significância estatística na correlação pode ser atribuída ao II arco branquial, no qual a elevada atividade da NKA presente neste filamento afeta a equação como valor “outlying” (Fig. 3). A distribuição das CCs-NKA nas lamelas e nos filamentos entre as duas espécies são completamente diferentes. Em *P. aiereba* as CC-NKA são numerosas, porém individualmente distribuídas nos espaços interlamelares (Fig. 4A, B), enquanto, em *Potamotrygon* sp., as CC-NKA organizam-se em complexos multicelulares nos espaços interlamelares formando criptas (Fig. 4C, D).

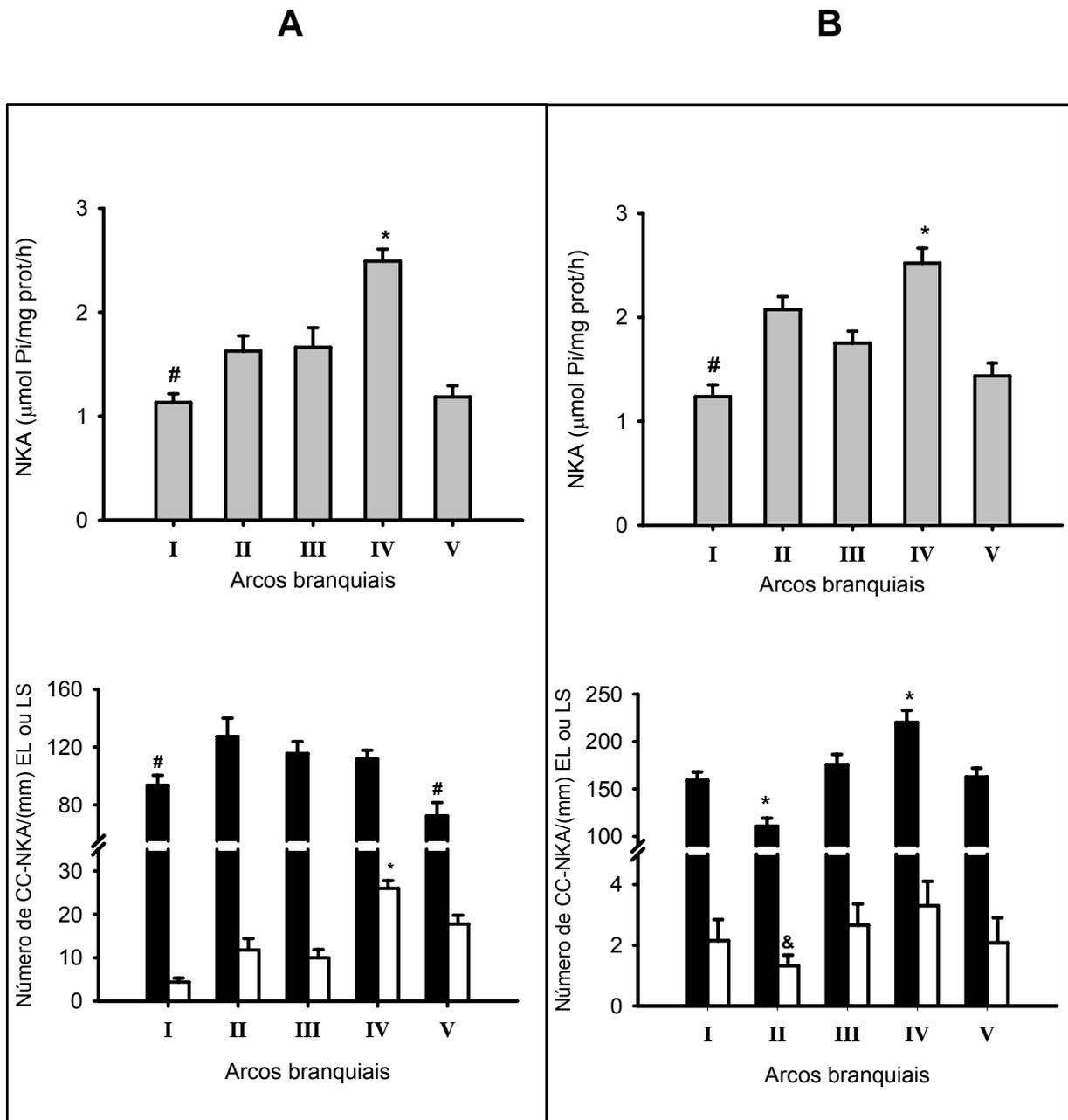


Figura 2. Variação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e do número de célula cloreto imuno-positiva para a NKA no espaço interlamelar (EL= barras escuras) e na lamela secundária (LS= barras claras) em cada arco branquial da arraia **(A)** *Paratrygon eiereba* e **(B)** *Potamotrygon sp.* (*) indica diferença significativa em relação aos demais arcos branquiais. (#) diferença significativa em relação aos arcos branquiais II, III e IV. (&) significativamente diferente em relação ao arco branquial IV. (ANOVA não-paramétrica, Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

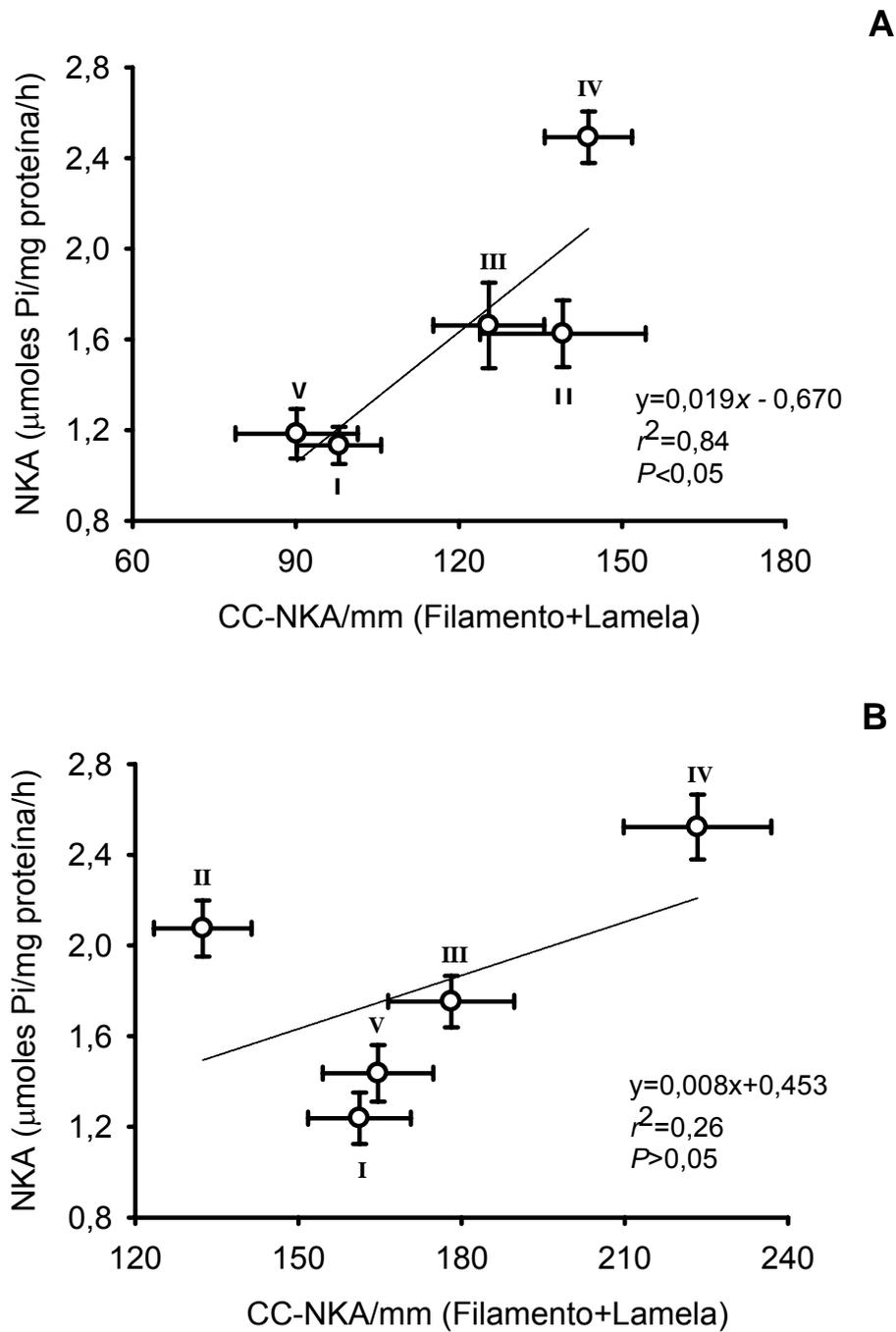


Figura 3. Correlação entre atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{moles Pi/mg proteína/h}$) e o somatório das células cloreto imuno-reativas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) por milímetro de filamento+lâmina em *Paratrygon aiereba* (A) e *Potamotrygon sp.* (B). Os arcos branquiais estão indicados em algarismos romanos.

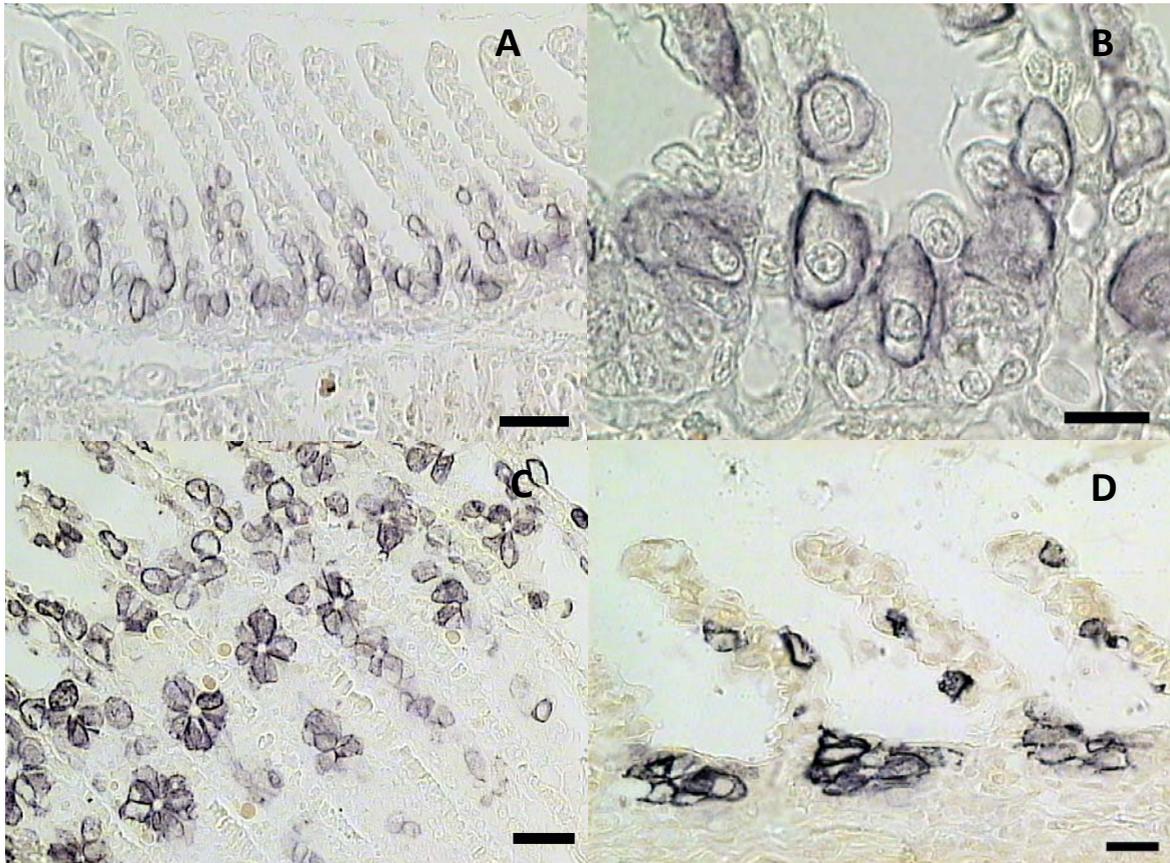


Figura 4. (A e B) células cloreto imuno-positivas para Na⁺/K⁺-ATPase (CC-NKA) nos espaços interlamelares e nas lamelas de *Paratrygon aiereba*. Fotomicrografias em secções longitudinal (C) e sagital (D) ao filamento branquial de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu). Notar que nos espaços interlamelares do filamento branquial de *Potamotrygon* sp. as CCs-NKA se organizam em complexos multicelulares. Barras: (A) e (C) 40 μm; (B) 10 μm; (D) 20 μm.

DISCUSSÃO

Os estudos sobre as dimensões físicas das brânquias dos peixes são usados para complementar os dados sobre as funções de trocas gasosas (EMERY & SZCZEPANSKI, 1986; HUGHES et al., 1986; KARAKATSOULI et al., 2006). Em termos de área branquial, tem sido demonstrado que para muitos teleósteos, o segundo arco branquial pode ser o mais representativo (HUGHES & MORGAN, 1973; HUGHES, 1984). E, provavelmente, por isso, muitos dos estudos sobre funções respiratórias, morfologia branquial e processos osmo-ionorregulatórios foram extensivamente realizados no segundo arco branquial. No entanto, não há um consenso sobre qual arco branquial pode ser o mais representativo em termos de dimensões morfométricas, uma vez que no teleósteo *Sparus aurata*, o terceiro arco branquial é o mais representativo (KARAKATSOULI et al., 2006).

As brânquias são órgãos multifuncionais (MARSHALL & BRYSON, 1998; EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). São os mais importantes sítios para a troca gasosa (PERRY, 1992), processos osmo-ionorregulatórios (FERNANDES et al., 2007), equilíbrio ácido base e excreção de material nitrogenado (MARSHALL & BRYSON, 1998; CLAIBORNE et al., 2002). Apesar dessa multifuncionalidade, para muitos autores os arcos branquiais individuais são considerados unidades idênticas (LYNDON, 1994). Porém, a possibilidade de que arcos branquiais específicos possam contribuir em graus diferenciados a uma dada função branquial foi proposta por Lyndon & Brechin (1999). Estes autores apresentaram evidências que no linguado *Pleuronectes flesus* o primeiro arco branquial é mais ativo para a síntese protéica do que o segundo e terceiro arco branquial e, que, provavelmente, tais diferenças estão relacionadas à substituição/reposição de células cloreto ou à síntese de seus componentes.

As análises de correlação entre os níveis da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA), número de células cloreto (CC-NKA), número de filamento e comprimento total dos filamentos em cada arco revela que não existe relação causal direta entre as variáveis osmorregulatórias (NKA e CC-NKA) e morfométricas das brânquias. Portanto, as características morfométricas, tais como número de filamentos e comprimento total dos filamentos no arco branquial parecem não influenciar diretamente os processos osmo-ionorregulatórios das arraiais de água doce.

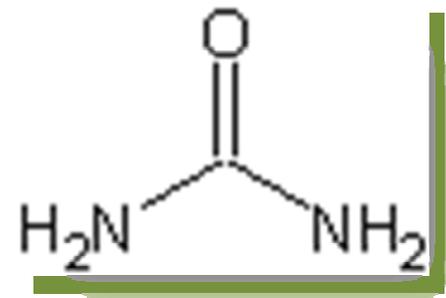
Nas duas espécies de arraias de água doce estudadas as células cloreto são numerosas no quarto arco branquial. Como nos demais elasmobrânquios (PIERMARINI & EVANS, 2000; WILSON et al., 2002; EVANS et al., 2004), as células cloreto imuno-reativas para a Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) dos potamotrigonídeos estão usualmente distribuídas nos espaços interlamelares, localizam-se próximas à região aferente do filamento branquial, contudo, em algumas espécies de arraias de água doce como *Potamotrygon schroederi* grande quantidade de CC-NKA pode ser encontrada na lamela (ver Capítulo 2). Em teleósteos marinhos, as células cloreto possuem um complexo sistema labirinto-tubular formado a partir de uma extensa invaginação da membrana basolateral (PISAM, 1981; PISAM et al., 1990). Porém, em elasmobrânquios estas invaginações são moderadas (PIERMARINI & EVANS, 2000; WILSON et al., 2002) e provavelmente são os sítios de expressão da Na^+/K^+ -ATPase branquial (WILSON et al., 2002). Portanto, parece evidente que o aumento na atividade dessa enzima possa estar associado à proliferação de células cloreto. Esta relação parece bem estabelecida em *Paratrygon aiereba*, mas não para *Potamotrygon* sp. Em *P. aiereba*, a forte correlação positiva entre atividade específica da NKA branquial e número de CC-NKA presente em cada arco branquial indica que os níveis dessa enzima podem ser o reflexo da quantidade de células cloreto presente no tecido branquial. Assim, o quarto arco branquial passa a ser um dos mais representativos para os processos osmorregulatórios desta espécie. Portanto se, apenas as dimensões morfométricas fossem levadas em consideração, o segundo e o terceiro arcos branquiais passariam a ser os mais representativos para estudos morfofuncionais das brânquias das arraias de água doce da família Potamotrygonidae, considerando os estudos em *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon* sp.

Em *P. aiereba* a atividade específica da NKA estava mais elevada no quarto branquial que nos demais. A mesma tendência foi observada em *Potamotrygon* sp., porém, nesta espécie não há uma clara relação entre NKA e o número de CC-NKA. A elevada atividade da NKA do segundo arco branquial sugere uma elevada densidade da enzima NKA por célula cloreto-cloreto. As CC-NKA são numerosas no quarto arco branquial de *Potamotrygon* sp. e são mais freqüentes nos espaços interlamelares (nos filamentos) que no epitélio das lamelas. Porém, como discutido no Capítulo 2, as CC-NKA desta espécie organizam-se em complexos multicelulares nos espaços interlamelares próximos à região aferente do filamento. Os complexos multicelulares

são, provavelmente, os mais importantes sítios de tomada de íons Na^+ e Cl^- , e excreção de H^+ e HCO_3^- . A formação de complexos multicelulares é mais comum em teleósteos marinhos (EVANS et al., 1999; KATOH & KANEKO, 2003; KANEKO & KATOH, 2004), agnatas, como as lampréias (BARTELS & POTTER, 2004) e, raramente, encontrada em peixes de água doce (HWANG, 1988). Porém, até o presente momento não foram descritas em nenhum grupo de elasmobrânquios.

Em resumo, o conflito básico entre a troca gasosa e a regulação iônica nas brânquias de peixes de água doce pode ser resolvido por meio de compartilhamento dos processos osmo-respiratórios. O segundo e o terceiro arco branquial dos potamotrigonídeos são os mais representativos em termos de dimensões morfométricas, porém, as variáveis morfométricas parecem não afetar os processos osmorregulatórios, tais como, atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e o número de células cloreto. A atividade dessa enzima está intimamente relacionada ao número de células cloreto presente no epitélio do filamento, sendo mais elevada no quarto arco que nos demais arcos branquiais. Portanto, como sugerido por Lyndon & Brechin (1999), há indícios de uma divisão dos papéis fisiológicas e/ou uma contribuição diferenciada do compromisso osmo-respiratório entre as holobrânquias dos peixes.

PARTE III



Osmorregulação

CAPÍTULO 4

**OSMORREGULAÇÃO DAS ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (POTAMOTRYGONIDAE:
ELASMOBRANCHII): ÍONS, URÉIA, OSMOLALIDADE E ATIVIDADE DA Na^+/K^+ -
ATPASE**

Palavras-chave: Potamotrygonidae, Osmorregulação, Íons, Osmolaridade, Uréia,
 Na^+/K^+ -ATPase.

INTRODUÇÃO

As arraias da família Potamotrygonidae têm distribuição restrita aos ambientes aquáticos das principais bacias da América do Sul (CARVALHO et al., 2003; LOVEJOY et al., 2006). De origem marinha, os ancestrais dos potamotrigonídeos passaram a tolerar o ambiente de água doce ao longo de 20 milhões de anos (LOVEJOY et al., 1998; LOVEJOY et al., 2006). A habilidade dos potamotrigonídeos para se adaptar em diferentes tipos de águas pode ser verificada pela sua ampla distribuição nos rios da América do Sul. Esta família possui representantes em todas as grandes bacias do continente sul-americano, exceto nos rios que drenam para o Oceano Pacífico e na bacia do rio São Francisco (COMPAGNO & COOK, 1995; MARTIN, 2004). A diversificação das arraias da família Potamotrygonidae possivelmente está relacionada às inúmeras estratégias ecofisiológicas, porém, pouco estudadas e/ou desconhecidas.

Ao longo do período de isolamento dos potamotrigonídeos nos corpos de água doce, a composição química e a concentração química dos principais osmólitos dos fluidos corporais das arraias demonstraram algumas semelhanças aos valores encontrados nos teleósteos de água doce, tais como baixos teores de uréia e concentrações similares de eletrólitos (GRIFFITH et al., 1973; GERST & THORSON, 1977). Recentemente, foram descritos os mecanismos de transporte iônico em *Potamotrygon* sp. (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003). Estes estudos corroboram os trabalhos anteriores que sugeriram uma estreita semelhança entre os mecanismos osmorregulatórios das arraias de água doce e dos teleósteos.

No ambiente de água doce, os potamotrigonídeos são hiper-osmóticos em relação ao meio. Como a osmorregulação depende da relação entre soluto-solvente entre os dois compartimentos (animal *versus* ambiente), as arraias precisam resolver dois grandes desafios osmorregulatórios: o imenso influxo de água e a perda excessiva de íons. O aumento da excreção urinária é bem documentado em elasmobrânquios eurialinos (JANECH & PIERMARINI, 2002; ANDERSON et al., 2007), porém, o aumento do fluxo urinário pode potencializar a perda iônica. Para compensar a perda difusional (e aquela excretada pela urina), os eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{+2}) são absorvidos ativamente pelas brânquias. Por outro lado, muitos destes solutos são reabsorvidos ativamente pelos túbulos renais (WOOD et al., 2002; EVANS et al. 2004; EVANS et al., 2005).

Considerando a carência de informações sobre alguns aspectos da osmorregulação das arraias de água doce da família Potamtrygonidae capturadas em seus ambientes naturais, este estudo apresenta um levantamento da concentração dos principais osmólitos e osmolalidade do plasma e do fluido perivisceral (e do fluido uterino de duas espécies), além da atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal em cinco espécies de potamotrigonídeos típicas da bacia do Rio Negro (água ácida e diluída) e duas espécies que habitam a Baía de Marajó (próximo do estuário amazônico com o Oceano Atlântico).

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de arraias de água doce (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *Potamotrygon schroederi*, *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon* aff. *orbigny*) que ocorrem no Rio Negro foram capturadas no arquipélago de Mariuá (S0°49'; W62°51'), próximo da cidade de Barcelos (Estado do Amazonas), no período noturno, nas praias e/ou igapós, com auxílio de rapichés e/ou puçás.

Na Baía de Marajó (Estado do Pará), estuário amazônico com o Oceano Atlântico, Ilha de Colares (S0°55'; W48°17'), os exemplares de duas espécies de arraias (*Potamotrygon scobina* e *Potamotrygon orbigny*) foram coletadas por meio de arrasto de praia (praia do Humaitá) durante a baixa-mar. Os sítios de captura no Rio Negro e em Colares estão indicados na Figura 1 do capítulo 1.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios (erro padrão) da biometria dos animais capturados em ambos os ambientes.

Tabela 1. Número amostral (N), valores médios \pm erro padrão do peso (g), largura do disco (LD, cm) das espécies de Potamotrygonidae coletados no arquipélago de Mariuá (Rio Negro) e na Ilha de Colares (Baía de Marajó, estuário Amazônico).

Espécies	N	Peso (g)	LD (cm)	Local
<i>Paratrygon aiereba</i>	27	316,5 \pm 14,4	21,4 \pm 2,9	Mariuí, Rio Negro
<i>P. motoro</i>	15	355,2 \pm 28,7	23,0 \pm 3,1	Mariuí, Rio Negro
<i>P. schroederi</i>	5	191,1 \pm 19,5	18,0 \pm 2,3	Mariuí, Rio Negro
<i>P. aff. orbignyi</i>	18	168,0 \pm 18,9	17,5 \pm 1,5	Mariuí, Rio Negro
<i>Potamotrygon</i> sp.	36	189,7 \pm 20,4	16,5 \pm 2,0	Mariuí, Rio Negro
<i>P. scobina</i>	7	297,3 \pm 22,1	19,6 \pm 2,8	Baía Marajó, Colares
<i>P. orbignyi</i>	6	261,7 \pm 21,3	18,9 \pm 2,2	Baía Marajó, Colares

Concomitante com a captura das arraias, análises das variáveis físicas e químicas da água foram realizadas por meio de um analisador multiparâmetro Consort C535. Além disso, amostras de água foram coletadas para análise dos íons ($[Na^+]$ e $[K^+]$) num fotômetro de chama Digimed, DM-61. Em todos os locais de captura (Rio Negro e Colares), as arraias foram mantidas por 24-48 h nos tanques-redes para aclimatização na mesma água onde foram capturadas (Tabela 2). Posteriormente, os animais foram irreversivelmente anestesiados (MS-222, Sigma Co.) e o sangue foi retirado por meio de punção cardíaca. Em seguida, as arraias foram sacrificadas por meio de contusão da medula espinhal. Uma incisão ventral expôs a cavidade visceral para a retirada do fluido perivisceral e dos rins. As brânquias foram rapidamente removidas e congeladas em tampão SEI (Sacarose 0,3 mol/L; EDTA 20 mmol/L; Imidazol 0,1 mol/L em pH 7,4) N_2 -líquido para posterior análise.

Tabela 2. Valores das variáveis físicas e químicas e concentração dos íons Na⁺ e K⁺ (média±erro padrão) nos habitats (local de captura e aclimatização) das arraias do Rio Negro (N=96; exceto íons, onde N=14) e da Baía de Marajó (N=144; exceto íons, onde N=9).

Variáveis	Rio Negro	Baía de Marajó [#]
Oxigênio dissolvido (mg/L)	4,1 ± 0,4	4,9 ± 1,3
pH	4,3 ± 1,1	5,5 ± 0,1*
Temperatura (°C)	30,1 ± 0,9	29,2 ± 0,7
Condutividade (µS/cm)	19,3 ± 5,2	63,6 ± 2,7*
TDS (mg/L)	7,7 ± 3,7	55,0 ± 0,2*
Salinidade (ppm)	0,0	0,1
[Na ⁺] (µM)	12,3 ± 0,5	47,8 ± 2,3*
[K ⁺] (µM)	3,4 ± 0,3	23,8 ± 1,3*

*Indica diferença significativa, Mann-Whitney (P<0,05).
[#]Incluindo as análises realizadas durante a amplitude de maré (baixa-mar e preamar).

O sangue foi centrifugado (12.500 g por 5 min) e o plasma removido foi armazenado. O plasma e o fluido perivisceral foram mantidos em N₂-líquido para análise da concentração de íons, uréia e determinação da osmolalidade. As concentrações dos íons sódio ([Na⁺]) e potássio ([K⁺]) foram determinados por fotometria de chama (Digimed DM-61). O método colorimétrico da ortocresolftaleína-complexona foi utilizado para determinar a concentração de cálcio ([Ca⁺²]). O método da urease foi usado para determinar a concentração de uréia. A concentração de cloreto foi determinada por meio de método colorimétrico. Em todos os ensaios espectrofotométricos foram utilizados os “kits” comerciais In Vitro Diagnostica (Barbacena, São Paulo). A osmolalidade foi estimada por osmometria usando um µ-Osmette Precision. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas.

As brânquias e os rins foram removidos armazenados em tampão SEI. Os homogeneizados foram preparados com o mesmo tampão descrito acima em baixa temperatura usando um homogeneizador (Dispensor Extratur, Quimis) em 7.000 rpm, e centrifugados (Sigma 30-K) por 30 min a 12.000 g (4 °C). O sobrenadante foi utilizado para determinação dos níveis de proteínas totais e da atividade da NKA. A atividade da enzima foi realizada nas seguintes condições de ensaio: 1µg de proteína: 1µL de tampão contendo NaCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM), KCl (13 mM), ATP (3 mM) e imidazol (30 mM). Um segundo ensaio foi realizado simultaneamente contendo os mesmos reagentes, exceto KCl, mas com ouabaína (inibidor da NKA). O fosfato inorgânico (Pi)

produzido pela hidrólise do ATP foi determinado pelo método de Fiske & Subbarow (1925). A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase foi definida como sendo a diferença entre o fosfato liberado na mistura de ensaio na presença e ausência de ouabaína. As leituras de absorvância foram realizadas em 620 nm (Spectrum SP-2000 UV) e a atividade específica expressa em $\mu\text{moles de Pi/ mg proteína/h}$.

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. O método de Kolmogorov-Smirnov foi usado para testar a normalidade dos dados. As médias dos valores das variáveis físicas e químicas da água do Rio Negro *versus* Baía de Marajó foram comparadas usando o teste de Mann-Whitney (não-paramétrico). As comparações entre os valores do plasma e do fluido perivisceral foram realizadas utilizando o teste *t* de Student pareado. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

As concentrações dos eletrólitos no plasma e no fluido perivisceral das arraias de água doce (cinco espécies do Rio Negro e duas do estuário amazônico) estão apresentadas na figura 1. Nas arraias que vivem nos habitats do Rio Negro, as concentrações de Na^+ plasmático variam de 143,8 a 157,1 mmol/L, enquanto nas duas espécies encontradas na Baía de Marajó, as concentrações desse eletrólito são 183,3 e 190,2 mmol/L em *P. orbignyi* e *P. scobina*, respectivamente. A concentração de Na^+ no fluido perivisceral é significativamente menor ($P < 0,05$) que a do plasma, variando de 86,3 a 110,1 mmol/L nas arraias do Rio Negro, e 144,2 e 164,7 mmol/L nas duas espécies coletadas na Baía de Marajó, respectivamente, *P. orbignyi* e *P. scobina*. A concentração de Na^+ no fluido perivisceral parece refletir as características observadas no plasma. Nas espécies típicas do Rio Negro, as concentrações de Cl^- plasmático variam de 117,9 a 129,2 mM, enquanto que nas duas espécies da Baía de Marajó, a $[\text{Cl}^-]$ é de 156,4 e 181,5 mM, para *P. orbignyi* e *P. scobina*, respectivamente. No geral, nos potamotrigonídeos os teores de Cl^- no fluido perivisceral variam de 127,7 a 162,7 mM, sendo que em *Paratrygon aiereba* e *P. motoro*, a $[\text{Cl}^-]$ no fluido perivisceral é significativamente ($P < 0,05$) mais elevada que no plasma. As concentrações de $[\text{K}^+]$ e $[\text{Ca}^{+2}]$ entre os potamotrigonídeos são bastante semelhantes. Os níveis de $[\text{K}^+]$ variam de 4,5 a 7,0 mM, enquanto a $[\text{Ca}^{+2}]$ varia de 2,3 a 2,9 mM.

Na figura 2 estão apresentados os valores de uréia e osmolalidade no plasma e fluido perivisceral. Em todas as espécies estudadas, as concentrações de uréia no fluido perivisceral (22,7 a 34,1 mM) foram mais elevadas que no plasma (1,3 a 5,3 mM). Os valores de osmolalidade plasmáticas são semelhantes ao do fluido perivisceral. Como esperado, tanto no plasma quanto no fluido perivisceral os valores de osmolalidade refletem as variações nas concentrações dos principais osmólitos. As correlações entre a osmolalidade *versus* $([Na^+ + Cl^-])$ plasmática ($r^2=0,66$; $osmolalidade=0,42x([Na^+ + Cl^-])+208,5$) e do fluido perivisceral ($r^2=0,63$; $osmolalidade=0,51x([Na^+ + Cl^-])+198,5$) foram significativas (Fig. 3). As espécies de Potamotrygonidae que habitam as águas diluídas e ácidas do Rio Negro possuem valores de osmolalidade do plasma entre 307 a 340 e do fluido perivisceral variando de 290 a 331,6 mOsmol/kg, enquanto nas espécies que habitam o estuário amazônico os valores de osmolalidade plasmática variam de 352 e 366 e do fluido perivisceral em 354,5 e 358,7 mOsmol/kg em *Potamotrygon orbignyi* e *P. scobina*, respectivamente.

A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) foi estimada nas brânquias e nos rins das espécies de potamotrigonídeos (Tabela 3). A atividade da NKA branquial varia de 1,8 a 2,9 $\mu\text{mol/mg}$ proteína/h nas arraias de água doce. Nas espécies que vivem no Rio Negro os níveis da NKA renal variam de 8,4 a 11,3 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/h, enquanto que nas espécies que habitam o estuário amazônico os valores desta enzima nos rins variam de 5,3 e 6,6 $\mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/h em *P. scobina* e *P. orbignyi*, respectivamente. No geral, a atividade da NKA é 3,6 vezes mais elevada nos rins que nas brânquias.

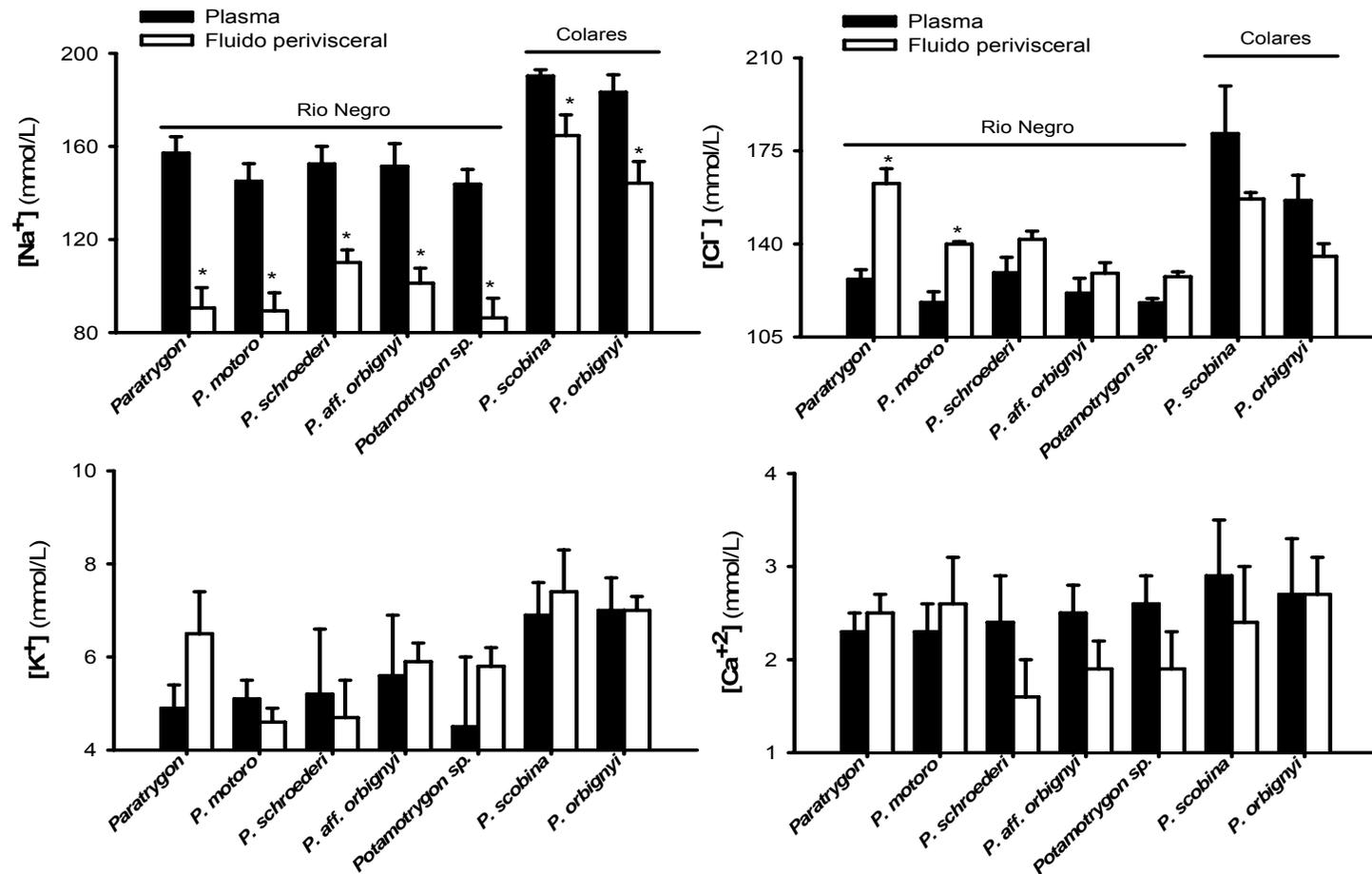


Figura 1. Concentração de íons (média±erro padrão) plasmáticos (preto) e do fluido perivisceral (branco) em Potamotrygonidae coletados no Arquipélago de Mariuá, Rio Negro (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. schroederi*, *P. aff. orbignyi* e *Potamotrygon sp.*) e na Ilha de Colares, Baía de Marajó, estuário amazônico (*P. scobina* e *P. orbignyi*). (*) Indica diferença significativa entre valores do plasma e do fluido perivisceral, test *t*-pareado ($P < 0,05$).

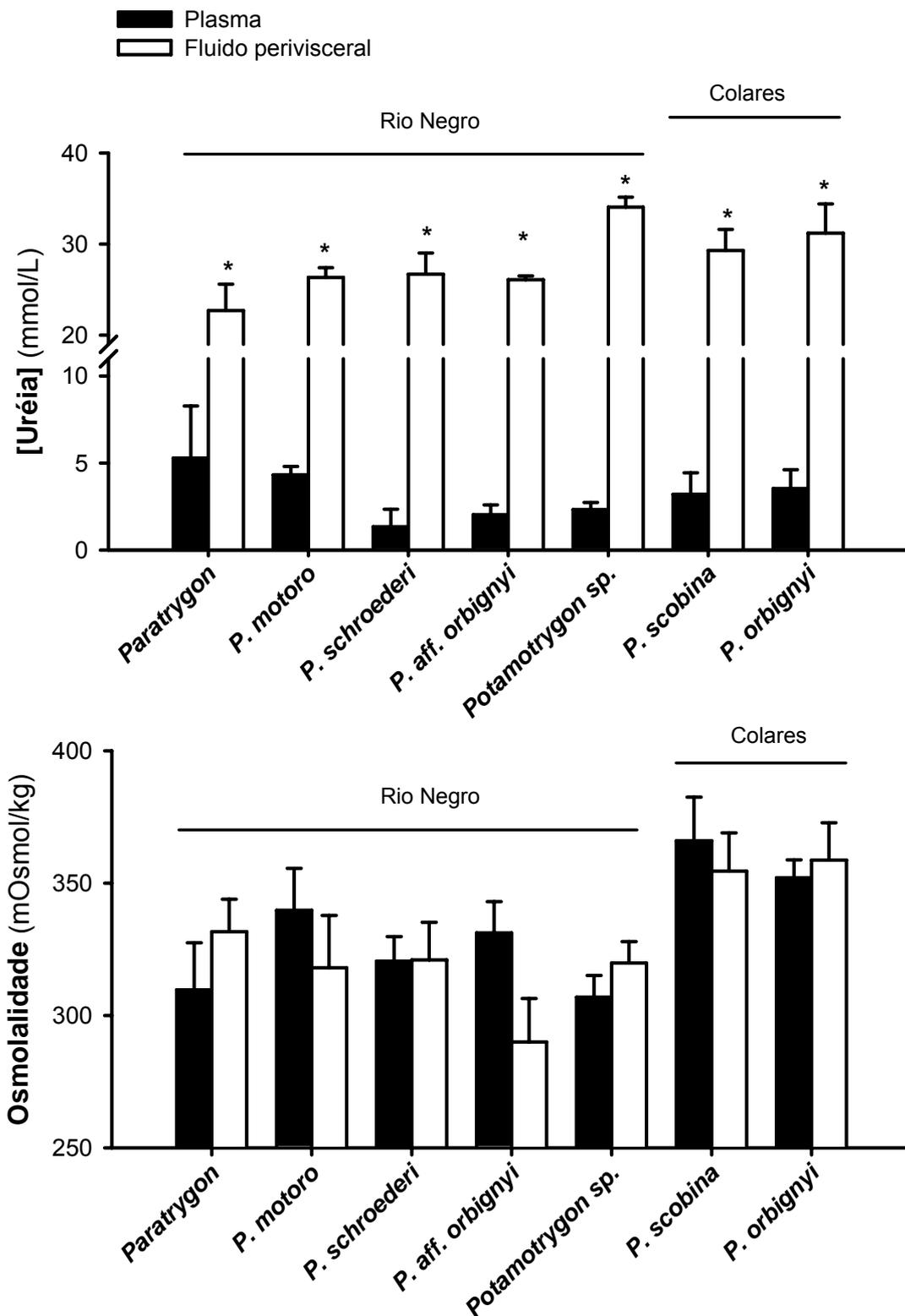


Figura 2. Níveis de uréia e osmolalidade (média±erro padrão) do plasma (preto) e fluido perivisceral (branco) em *Potamotrygonidae* coletados nas águas pretas, ácidas e pobres em íons da bacia do Rio Negro (*Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro*, *P. schroederi*, *P. aff. orbigny* e *Potamotrygon sp.*) e na Ilha de Colares, no estuário do Rio Amazonas com o

Oceano Atlântico (*P. scobina* e *P. orbigny*). (*) Indica diferença significativa entre valores do plasma e do fluido perivisceral, test *t*-pareado de Student ($P < 0,05$).

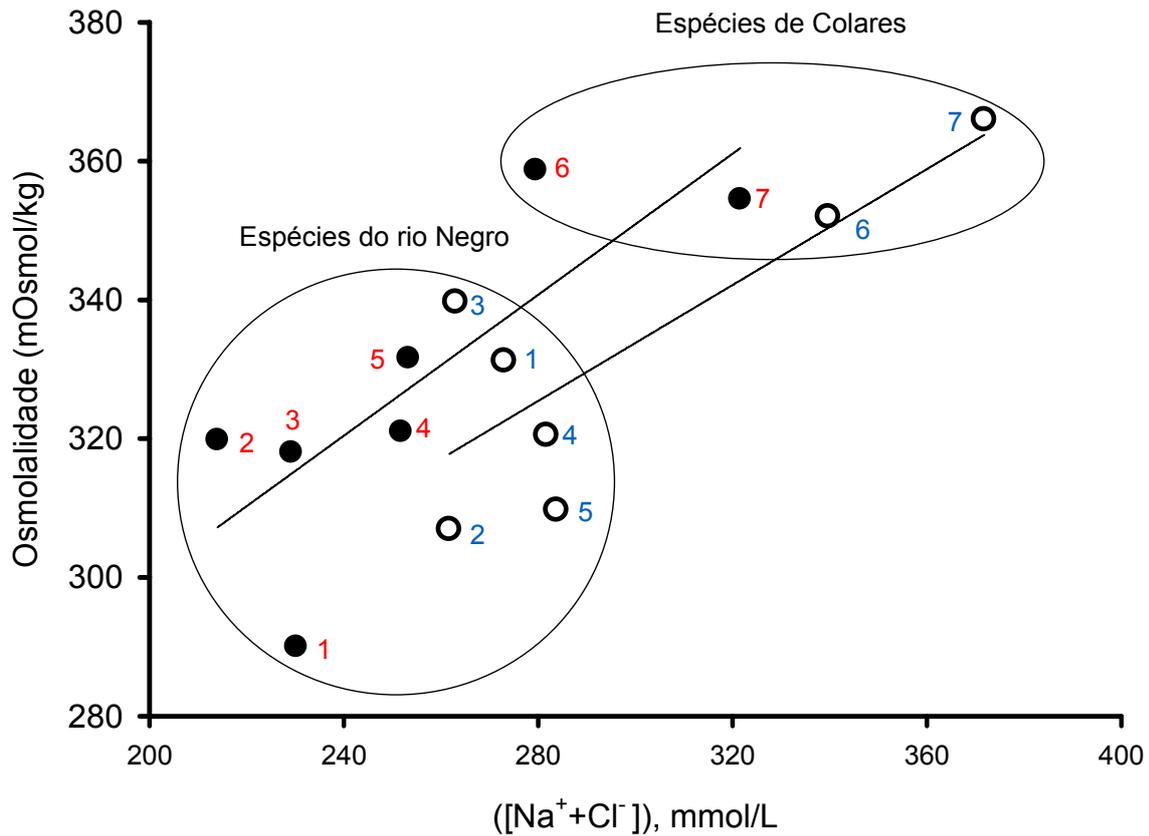


Figura 3. Correlação entre a média dos valores de osmolalidade *versus* somatório da $[Na^+]$ e $[Cl^-]$ no plasma (○) e do fluido perivisceral (●) dos potamotrigonídeos coletados na bacia do Rio Negro e no estuário amazônico (Ilha de Colares): 1. *P. aff. orbigny*; 2. *Potamotrygon* sp. (cururu); 3. *P. motoro*; 4. *P. schroederi*; 5. *Paratrygon aiereba*; 6. *Potamotrygon orbigny* e 7. *P. scobina*, sendo que os números em azul correspondem aos valores para o plasma e em vermelho para o fluido perisceral.

Tabela 3. Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (μmoles Pi/mg proteína/h) branquial e renal em alguns Potamotrygonidae.

Espécies	Brânquias	Rins
<i>Paratrygon aiereba</i>	1,9±0,5	8,4±0,9
<i>Potamotrygon motoro</i>	2,9±0,5	11,3±2,3
<i>P. schroederi</i>	2,8±0,3	10,2±2,0
<i>P. aff. orbignyi</i>	2,5±0,4	8,5±1,6
<i>Potamotrygon</i> sp.	2,7±0,5	9,8±1,7
<i>P. scobina</i>	2,1±0,6	5,3±1,1
<i>P. orbignyi</i>	1,8±0,7	6,6±1,9

Valores estão apresentados como média±erro padrão e N=21 (*P. aiereba*), 13 (*P. motoro*), 5 (*P. schroederi*), 12 (*P. aff. orbignyi*), 33 (*Potamotrygon* sp.), 7 (*P. scobina*) e 6 (*P. orbignyi*).

As espécies *P. scobina* e *P. orbignyi* foram capturadas na Ilha de Colares (estuário do Rio Amazonas), enquanto as demais foram coletadas no Rio Negro (água ácida e pobre em íons).

DISCUSSÃO

Um dos primeiros relatos sobre o perfil dos osmólitos nos fluidos corporais das arraias da família Potamotrygonidae foi descrito por Thorson et al. (1967). Apesar da grande dificuldade na identificação das espécies, estes autores demonstraram que o plasma (e os demais fluidos corporais) dos potamotrigonídeos possui composição química e concentração de osmólitos semelhantes aos encontrados nos teleósteos de água doce. As características do plasma dos potamotrigonídeos são completamente diferentes dos elasmobrânquios marinhos e/ou eurialinos (ver Figura 3) (GRIFFITH et al., 1973; GERST & THORSON, 1977; BITTNER & LANG, 1980; WOOD et al., 2002). Em todas as espécies deste estudo, as concentrações dos eletrólitos e uréia são extremamente baixas se comparados com representantes marinhos ou eurialinos (PIERMARINI & EVANS, 1998; EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). Porém, as variações nas concentrações dos íons e osmolalidade dos fluidos corporais são espécie-específica e podem estar relacionadas às características físicas e químicas de seus habitats.

As espécies de potamotrigonídeos que habitam as águas próximas do estuário amazônico acumulam mais osmólitos (Na^+ , Cl^- e uréia) em seus fluidos corporais (plasma e fluido perivisceral) que as espécies-irmãs que vivem nas águas diluídas do Rio Negro. Conseqüentemente, possuem maiores valores de osmolalidade nos compartimentos corpóreos. Estas observações são consistentes com os estudos realizados em duas populações de *Paratrygon aiereba* capturadas em diferentes habitats na Amazônia (ver Capítulo 6). Exemplos de *P. aiereba* coletados no sistema rio Solimões/Amazonas também acumulam mais eletrólitos no plasma e no fluido perivisceral do que aqueles capturados no Rio Negro. Para espécies euri-halinas, os teores dos eletrólitos no plasma estão associados à osmolalidade do ambiente aquático. Elasmobrânquios eurialinos marinhos (como *Carcharhinus leucas*, *Urolophus jamaicensis* e *Leucoraja ocellata*) quando mantidos em ambiente de água doce apresenta redução significativa na $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$ e $[\text{uréia}]$ plasmática, e conseqüente diminuição da osmolalidade no plasma (SULIKOWSKI & MAGINNIS, 2001; SULIKOWSKI et al., 2003; PILLANS & FRANKLIN, 2004).

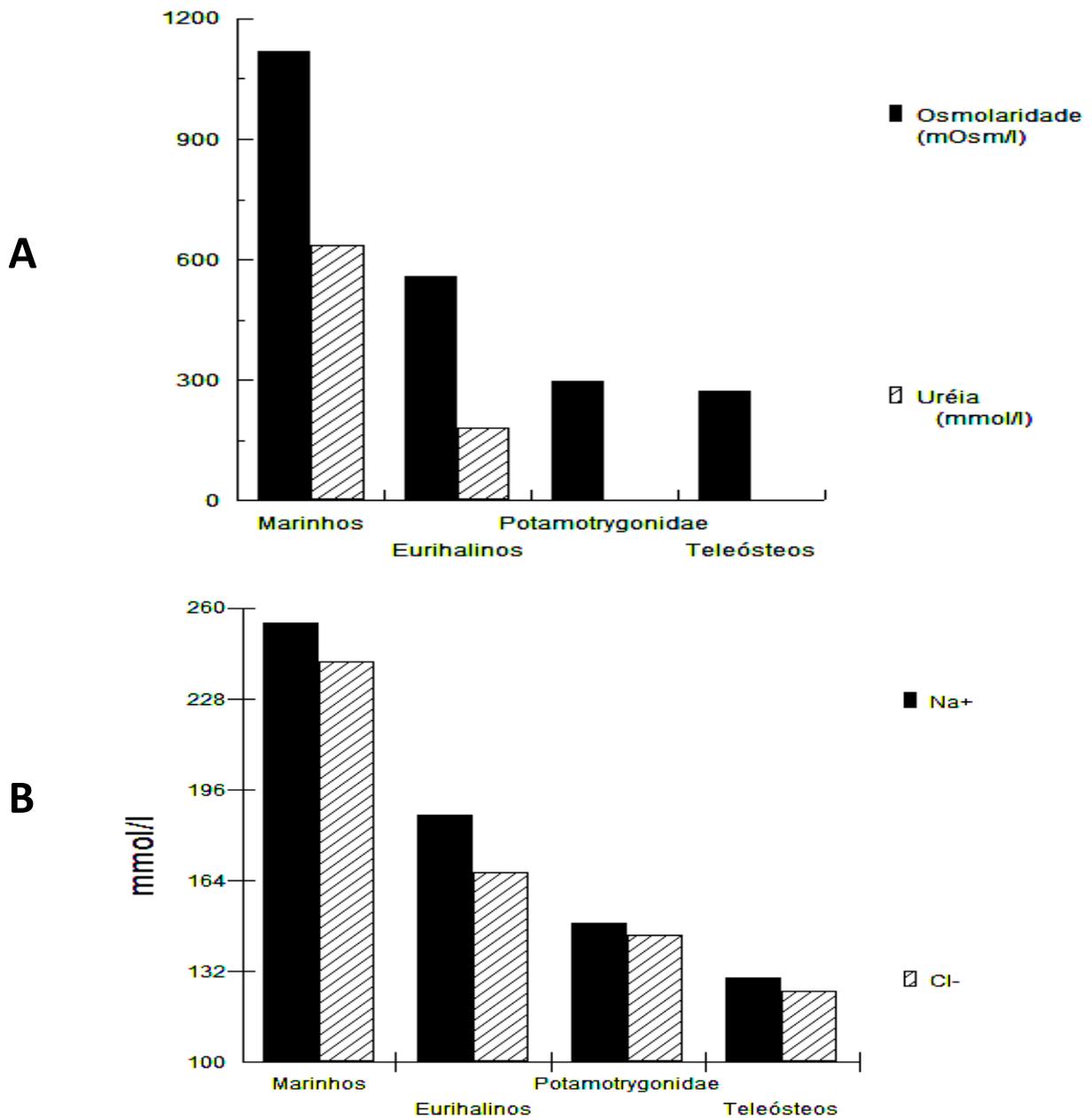


Figura 4. A. Valores representativos de osmolaridade (mOsmol/L) e teor de uréia plasmática (mmol/L); B. Concentração de íons Na⁺ e Cl⁻ plasmáticos (mmol/L) de vários elasmobrânquios marinhos, eurialinos, potamotrigonídeos e teleósteos de água doce. Em Potamotrygonidae e em teleósteos de água doce, os teores de uréia no plasma são geralmente <5 mM. No geral, as características do sangue dos potamotrigonídeos são similares àsquelas encontradas nos teleósteos de água doce. Valores adaptados de Evans et al. (2005).

Elasmobrânquios que vivem na água doce são hiper-osmóticos em relação ao meio (SHUTTLEWORTH, 1988). Para manter o balanço osmótico, *Dasyatis sabina* (uma arraia euri-halina) precisa excretar um imenso volume de urina altamente diluída a uma taxa 2,5 a 10 vezes superior do que os teleósteos de água doce (JANECH & PIERMARINI, 2002) e 9 a 15 vezes maior do que elasmobrânquios marinhos (CHOE & EVANS, 2003). Apesar dos rins para produzir um fluido com pouco soluto, provavelmente, a urina é o principal meio de perda iônica (LACY & REALE, 1995; HAZON et al., 2003). Este argumento pode parcialmente explicar os baixos valores de eletrólitos (Na^+ e Cl^-) e osmolalidade nos fluidos corporais das arraias do Rio Negro, em relação às espécies do estuário. WOOD et al. (2002) estudaram os fluxos iônicos de Na^+ e Cl^- unidirecionais e demonstraram que a arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) vive em balanço negativo em relação à água do Rio Negro, sendo que os valores de $J_{\text{in}}^{\text{Na}}$ (influxo de Na^+) = $J_{\text{out}}^{\text{Na}}$ (efluxo de Na^+) e $J_{\text{in}}^{\text{Cl}}$ (influxo de Cl^-) = $J_{\text{out}}^{\text{Cl}}$ (efluxo de Cl^-) estão em torno de 65-75 $\mu\text{mol/L}$. Apesar que, para evitar o distúrbio ionorregulatório, provavelmente estas arraias obtêm suplemento de sais por meio da alimentação. Além disso, WOOD et al. (2003) ressaltam a proteção e efeito estimulador dos ácidos húmicos sobre a regulação iônica, especialmente nas águas do Rio Negro que são ácidas e ricas em matéria orgânica.

Para restabelecer o balanço iônico, mecanismos adicionais são necessários para reduzir a perda iônica nos elasmobrânquios aclimatados na água doce, tais como baixa permeabilidade branquial (EVANS et al., 2005), aumento da atividade da NKA branquial (PIERMARINI & EVANS, 2000; EVANS et al., 2004) e aumento da eficiência na reabsorção renal. Com isso, as brânquias e os rins dos potamotrigonídeos constituem-se nos principais órgãos na manutenção da homeostase osmótica e iônica nos peixes. Nesses órgãos, a enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) está envolvida direta e/ou indiretamente em quase todos os sistemas de transporte iônico.

Nas brânquias, o número de células cloreto imuno-positivas para a NKA indica que os potamotrigonídeos possuem um enorme potencial eletrogênico para absorção de íons (Na^+ , Cl^- e K^+) e excreção de H^+ e HCO_3^- (ver Capítulo 2), e que a atividade específica da NKA está fortemente relacionada ao número de CC-NKA (ver Capítulo 3). No geral, a atividade específica da NKA branquial das arraias sugere que o aumento ou a redução da concentração dos íons da água tem pouco ou nenhum efeito

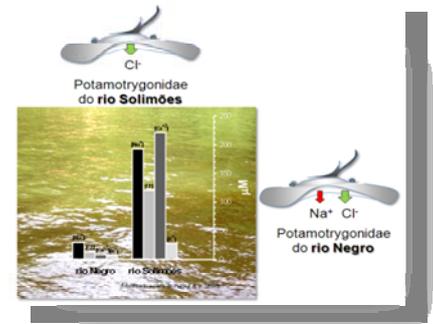
sobre o sistema de transporte iônico branquial. Estes resultados são reforçados pelos estudos sobre fluxo iônico em potamotrigonídeos. WOOD et al. (2002) relataram que a curva cinética do influxo unidirecional de Na^+ e Cl^- não se altera quando *Potamotrygon* sp. é aclimatado na água dura ou à água do Rio Negro (pobre em íons).

A atividade da NKA renal dos potamotrigonídeos que vivem nas águas ácidas e diluídas do Rio Negro é relativamente elevada. Em várias espécies euri-halinas, a atividade da NKA renal está mais elevada nos indivíduos de água doce do que naqueles da água do mar (VENTURINI et al. 1992; LIN et al., 2004). Com isso, é provável que os rins dos potamotrigonídeos do Rio Negro tenham um alto potencial eletrogênico para reabsorver íons e evitar perdas excessivas para o meio. A incapacidade para acumular uréia nos tecidos pode ter sido uma estratégia vantajosa para adaptação ao ambiente de água doce. A reduzida capacidade para sintetizar uréia representa uma importante economia energética para os potamotrigonídeos, uma vez que a síntese de 1 mol de uréia requer a hidrólise de 5 moles de ATP (IP et al., 2003; TAM et al., 2003). Nos elasmobrânquios marinhos e eurialinos, 70-90% da uréia filtrada nos rins é reabsorvida (HAZON et al. 2003; HAMMERSCHLAG, 2006). Um transportador facilitado de uréia foi identificado em *Raja erinacea* (SMITH & WRIGHT, 1999) e *Dasystis sabina* (JANECH et al., 2003), e nos túbulos coletores de *Triakis scyllia* (HYODO et al., 2004). Neste grupo, os segmentos tubulares formam um eficiente sistema contracorrente para reabsorver uréia (LACY & REALE, 1995). Além disso, os potamotrigonídeos não possuem os segmentos que constituem o sistema contracorrente para reabsorção da uréia (LACY & REALE, 1995), possivelmente isto representa mais uma economia energética que pode compensar o alto investimento na síntese da enzima NKA nos túbulos contorcidos distais.

Resumindo, o perfil dos parâmetros osmo-ionorregulatórios das arraias de água doce da família Potamotrygonidae são semelhantes aos encontrados nos teleósteos de água doce. Os teores dos osmólitos, osmolalidade e níveis de atividade da NKA podem estar associados às características físicas e químicas dos habitats das arraias. Além disso, para evitar a perda excessiva de íons para o meio, a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase renal cria um forte gradiente eletrogênico para aumentar a eficiência na reabsorção de sais.

PARTE IV

Adaptações: estudos de casos



CAPÍTULO 5

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ÁGUA DO RIO BRANCO SOBRE OS PROCESSOS OSMORREGULATÓRIOS DE *Potamotrygon* sp.: EVIDÊNCIAS DE BARREIRA HIDROGRÁFICA

Palavras-chaves: Barreira hidrográfica, *Potamotrygon* sp., Rio Negro, Rio Branco, Osmorregulação

INTRODUÇÃO

A região Amazônica apresenta uma grande variedade de habitats aquáticos separados por barreiras geográficas físicas e hidrográficas que limitam o fluxo de genes entre os indivíduos. Por causa disso, tem-se postulado que este isolamento favoreceu os mecanismos de especiação alopátrica e/ou por adaptação divergente. Segundo Toffoli (2006), a especiação entre as arraias de água doce *Plesiotrygon iwamae*, *Potamotrygon* sp. e *Potamotrygon schroederi* pode ter ocorrido entre 7,7 a 6,8 milhões de anos atrás. *Potamotrygon* sp. e *P. schroederi* são simpátricas no Rio Negro, *P. iwamae* é restrita a calha do Rio Amazonas (MARTIN, 2004; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a; ver Capítulo 2). Devido à ausência de evento biogeográfico que possa explicar a “separação” de *P. iwamae* das demais espécies basais que ocorrem no Rio Negro foi postulado que a grande diferença físico-química entre o Rio Amazonas e Rio Negro tenha sido a principal força seletiva que tenha levado à especiação por adaptação divergente (TOFFOLI, 2006).

Nas zonas temperadas, os movimentos horizontais e verticais do salmonídeo *Oncorhynchus mykiss* são influenciados pelas características físicas e químicas da água, tais como temperatura, salinidade e amplitude das marés, as quais funcionam como barreiras ambientais naturais (GREGORY & QUINN, 1990). Na Amazônia, nenhum estudo foi conduzido para testar se as diferenças físicas e químicas entre os corpos d'água podem atuar como verdadeiras barreiras hidrográficas. Todavia, para *Callophysus macropterus*, uma espécie migratória, as diferenças nas características físicas e químicas entre o Rio Negro e o Rio Amazonas não formam barreiras naturais e, portanto, não limitam o fluxo de genes entre as populações (RAMIREZ-GIL et al., 1998). Por outro lado, a arraia *Paratrygon aiereba* que é uma espécie não-migratória, de baixa capacidade dispersiva (FREDERICO, 2006) possui populações locais adaptadas ao tipo de habitat onde vive (ver Capítulo 6). Embora os exemplos acima sejam interessantes, tratam-se de espécies com ampla distribuição na bacia amazônica, cuja plasticidade fisiológica lhes permitiu explorar diferentes ambientes aquáticos. No caso de espécies endêmicas, os mecanismos adaptativos provavelmente são especializados, de maneira que estes animais tornam-se permanentemente isolados ou restritos a uma bacia em particular.

As águas da maioria dos tributários do Rio Negro são de cor preta, transparente, baixa condutividade, elevado teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) poucos sólidos totais dissolvidos, sendo às vezes chamados de rios de água destilada ligeiramente contaminada (KONHAUSER et al., 1994; ALCOUR et al., 2003; ver também Capítulo 2). Porém, a bacia do Rio Negro possui alguns rios de água branco-esverdeada, os quais contrastam com os rios de água preta. Os principais são os rios Demini e Branco, e ambos deságuam na margem esquerda do Rio Negro. Estes rios possuem características limnológicas intermediárias entre aqueles observados nas águas pretas e brancas (KÜCHLER et al., 2000). O Rio Branco possui pH 6-7, baixo teor de DOC, e sendo mais rico em íons que rios de água preta. Algumas espécies de Potamotrygonidae são endêmicas e altamente especializadas para sobreviver nas águas mais ácidas e diluídas da bacia do Rio Negro (ARAÚJO, 1998) e são raramente capturadas nos tributários de água branca. Estudos realizados com a arraia *Potamotrygon* sp. têm sugerido que a estratégia de adaptação à água preta, ácida e pobre em íons ocorre de maneira similar aos ciclídeos (teleósteos) do Rio Negro (GONZALEZ & WILSON, 2001; GONZALEZ et al., 2002; WOOD et al., 2002). Segundo Wood et al. (2002), esta arraia possui um sistema de transporte iônico de baixa afinidade (alto K_m e baixo J_{max}), porém com um sistema de baixa perda difusiva de íons. O exato mecanismo de transporte iônico ainda não está completamente compreendido. Para autores como Gonzales & Preest (1999), isto pode estar profundamente associado a uma redução da permeabilidade branquial através das junções paracelulares. Além disso, tem sido demonstrado que o DOC (como os ácidos húmicos) interage direta ou indiretamente com as membranas biológicas reduzindo a perda e/ou estimulando a capacidade de tomada iônica. Vários autores sugerem que o DOC exerce um papel protetor contra distúrbios ionorregulatórios nas arraias de água doce (WOOD et al., 2003) e nos teleósteos nativos do Rio Negro (MATSUO & VAL, 2007). No entanto, desconhece-se o grau de envolvimento e as possíveis mudanças dos processos renais e extra-renais em resposta à súbita mudança nas características físicas e químicas do meio durante uma incursão da arraia *Potamotrygon* sp. ao Rio Branco.

A regulação iônica em peixes é controlada principalmente pelas brânquias e pelos rins. Estes órgãos são os principais responsáveis pelo balanço iônico que envolve perda e ganho de sais. No epitélio branquial, as células cloreto constituem-se

no principal sítio para o transporte ativo e passivo de íons (PERRY, 1997). Nestas células, a membrana basolateral é o principal sítio para a enzima Na^+/K^+ -ATPase (PISAM et al., 1990; WILSON et al., 2002).

A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) é uma enzima que ativamente transporta íons Na^+ e K^+ e mantém a homeostase intracelular, pois proporciona uma força eletrogênica que impulsiona a maioria dos sistemas de transporte iônico tanto nas brânquias quanto nos rins (LIN et al., 2003; LIN et al., 2004). Em *Dasyatis sabina*, esta enzima presente nas células cloreto branquiais está relacionada à tomada de íons Na^+ e excreção de H^+ para o meio (PIERMARINI & EVANS, 2000; EVANS et al., 2004; EVANS et al., 2005). Enquanto nos túbulos contorcidos renais de *Tetraodon nigroviridis*, o aumento da atividade da NKA tem um papel essencial nos mecanismos de reabsorção de sais, minimizando a perda excessiva para o meio (LIN et al., 2004). Portanto, em peixes de elevada plasticidade fisiológica as brânquias e rins atuam de maneira integrada, mesmo quando estes organismos estão sujeitos aos desafios ambientais. Por outro lado, espécies que possuem mecanismos altamente especializados, e que esporadicamente se expõem a habitats hostis podem enfrentar sérios distúrbios osmo-ionorregulatórios. Por exemplo, Wood et al. (2002) demonstraram que as taxas de absorção de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} da arraia *Potamotrygon* sp. foram fortemente influenciadas pelas mudanças de pH da água.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Potamotrygon* sp. foram capturados com auxílio de rapichés nas áreas rasas dos igapós do médio Rio Negro (Boca do Igarapé do Zalala, S00°41'881"

W62°59'153"), distante cerca de 120 km acima da boca do Rio Branco no período da seca do Rio Negro (Fevereiro de 2007, ver Fig. 1).

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

Após exposição, os animais foram anestesiados (MS 222, 1:5.000) e o sangue retirado por meio de punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação. Uma incisão ventral expôs a cavidade visceral para a retirada do fluido perivisceral. O plasma e fluido perivisceral foram armazenados em N_2 -líquido para análises dos íons, uréia e osmolalidade.

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

Tabela 1. Variáveis físico-químicas da água do Rio Negro (S00°40'628" W63°03'506") e do Rio Branco (Boca do Rio Branco, S01°23'248" W61°50'887"). (*) Indica diferença significativa. N=6 para cada grupo experimental.

Variáveis	Rio Negro	Rio Branco
pH	4,1±0,3	6,8±0,2*
Temp. (°C)	31,4±0,2	30,5±0,3
[O ₂] dissolvido (mg/L)	5,2±0,4	5,3±0,4
Condutividade (µS/cm)	9,3±1,4	27,5±1,1*
TDS (mg/L)	5,2±0,7	14,7±0,2*
[Na ⁺] (mM)	11,8±2,1	72,3±9,5*
[K ⁺] (mM)	14,8±2,4	23,8±7,9*

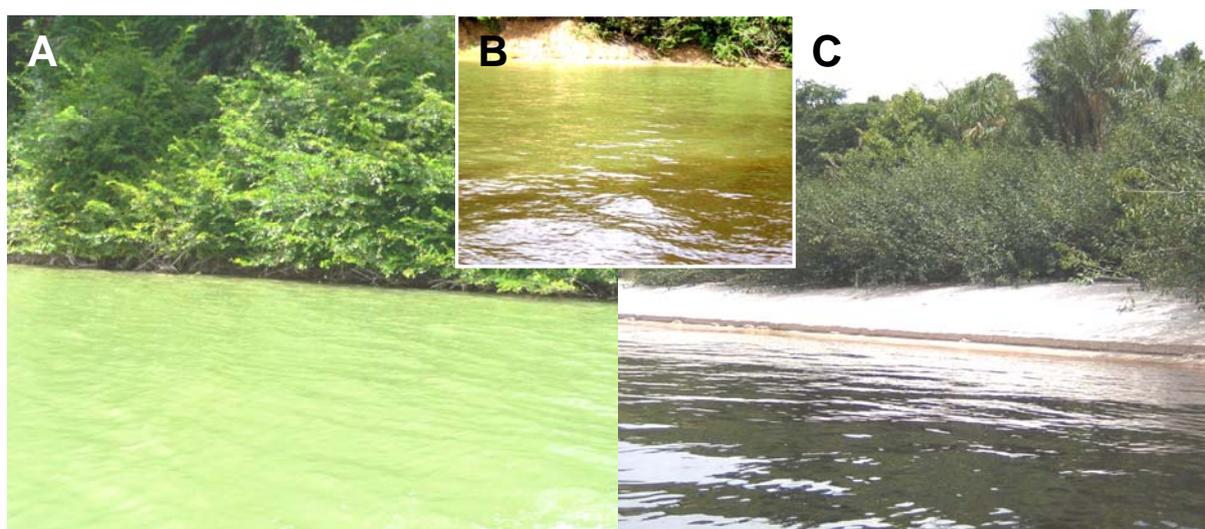


Figura 1. (A) Fotografias do sítio de coleta de água no Rio Branco. (B) O encontro das águas ocorre na altura das coordenadas S01°23'25" W61°50'89". (C) Sítio de coleta de água e dos exemplares de *Potamotrygon* sp. no Rio Negro.

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

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

Amostras das brânquias foram desidratadas e incluídas em parafina. Os cortes de 6 μm sagitais ao filamento branquial foram obtidos por meio de um micrótomo MICROM HM360. A localização das células cloreto ricas em Na^+/K^+ -ATPase (CC-NKA) foi realizada por métodos imuno-citoquímicos, modificados a partir de Piermarini & Evans (2000). Brevemente, os cortes foram desparafinizados, e em seguida lavados em tampão fosfato de potássio-salino (TPS, 10 mM, pH 7,4). As ligações não específicas foram bloqueadas após a adição de H_2O_2 10% durante 20 min, seguido de soro de cabra (20% em TPS com Triton X-100, 0,1%) durante 20 min. Os cortes foram incubados durante a noite com o anticorpo primário anti- α -5 Na^+/K^+ -ATPase (1:100 em TPS com Triton X-100, 0,1%). Após isso, os cortes foram lavados em TPS durante 10 min. Os cortes foram incubados durante 1 hora em um segundo anticorpo conjugado com a Peroxidase anti-peroxidase (IgG goat anti-mouse Peroxidase) diluído 1:150 em TPS. O excesso foi retirado por meio de lavagens em TPS por 10 min. Todas as

incubações foram realizadas em baixa temperatura em câmara úmida e escura. A coloração das CC-NKA foi realizada com solução de 3-3-diaminobenzidina com sulfato de níquel II amônio em H₂O₂. A coloração apareceu entre 5 a 10 min. A coloração não se desenvolveu quando o anticorpo primário (IgG α 5) foi omitido nas secções controles.

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

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

RESULTADOS

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

Não houve diferença significativa no número de células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (lamela ou filamento) branquial entre os dois tratamentos (Tabela 3) e a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) branquial também não variou entre os dois grupos experimentais Fig. 2A. Porém, a atividade da NKA renal das arraias expostas às águas do Rio Branco apresentaram valores significativamente mais baixos que os grupos mantidos nas águas do Rio Negro (Fig. 2B).

A correlação entre a atividade da NKA renal e branquial apenas das arraias expostas às águas do Rio Branco foi fortemente negativa ($r^2= 0,73$; $P<0,05$), i.e., nos exemplares cuja atividade da NKA branquial encontrava-se elevada, a NKA renal encontrava-se reduzida (Figura 3).

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

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

Tabela 3. Valores (média±erro padrão) do número de células cloreto imuno-positivas para a Na^+/K^+ -ATPase (No. de CC-NKA/mm de lamela ou de filamento branquial) da arraia *Potamotrygon* sp. exposta à água do Rio Branco e mantida na água do Rio Negro.

Parâmetros	Rio Negro	Rio Branco
Lamela	11,6±1,4	19,2±1,9
Filamento	97,9±9,2	108,8±8,9

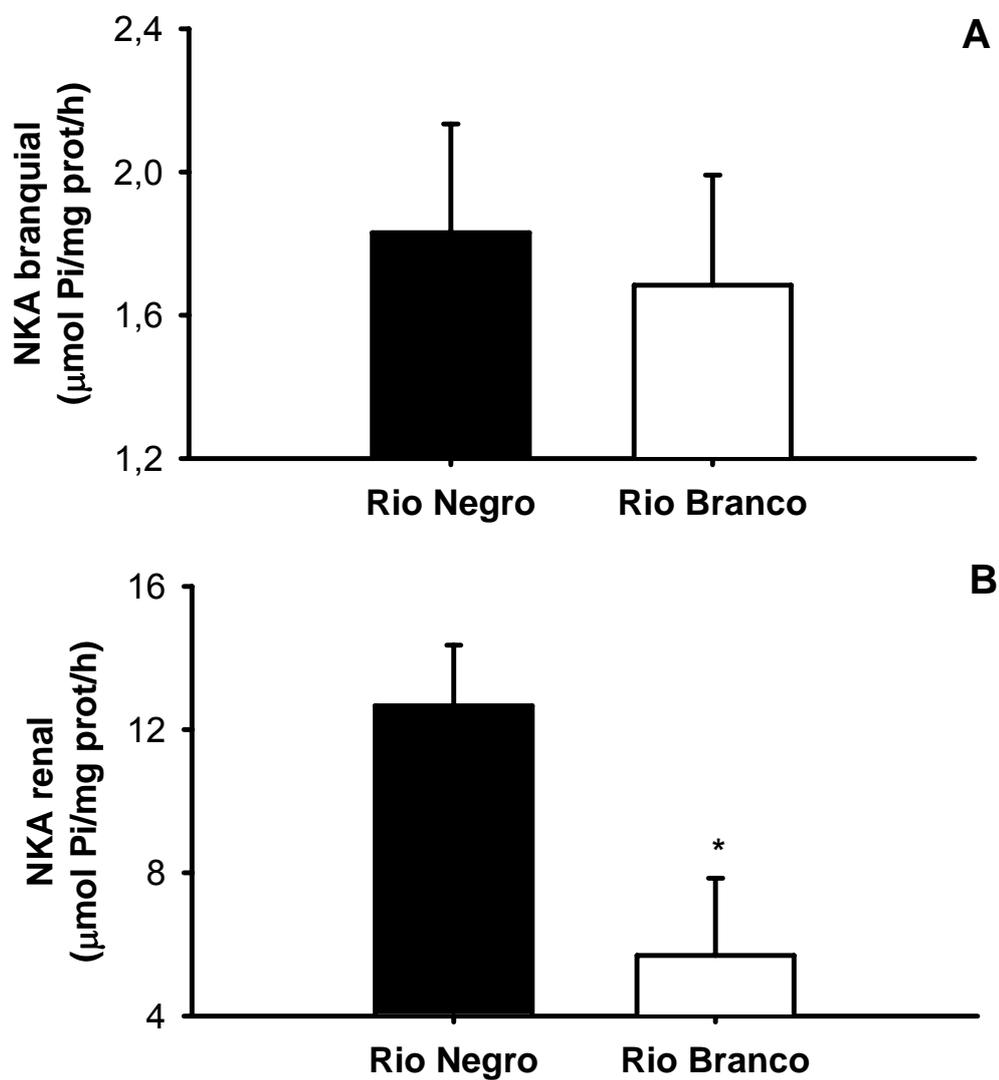


Figura 2. Valores (média±erro padrão) da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA, μmol Pi/mg proteína/h) das brânquias (A) e dos rins (B) de *Potamotrygon* sp. mantidos na água nativa do Rio Negro e exposto à água do Rio Branco. O asterístico indica diferença estatística (P<0,05). N=6 para ambos os grupos.

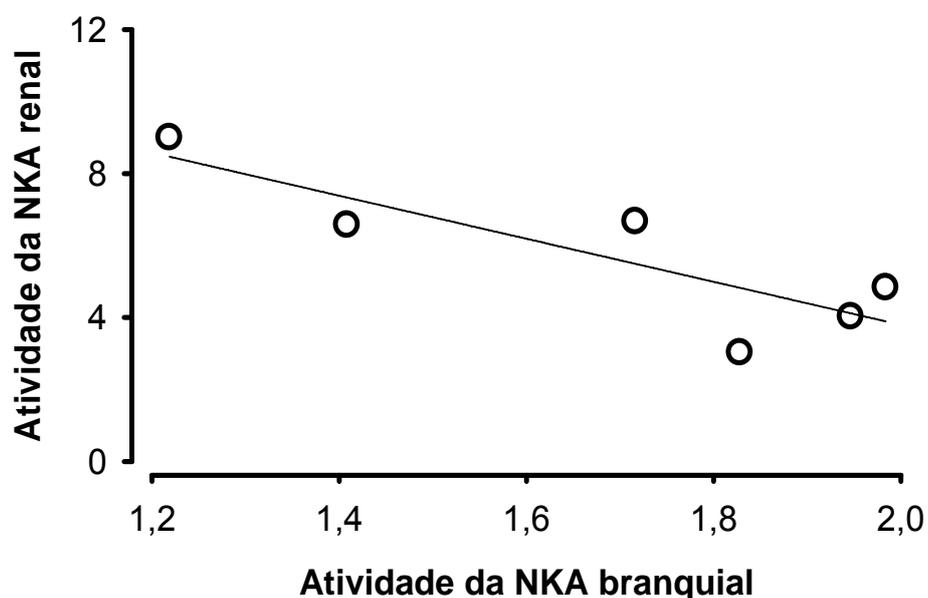


Figura 3. Correlação entre as atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA, $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$) branquial e renal de *Potamotrygon* sp. expostos à água do Rio Branco. A equação da regressão é $\text{NKA renal} = 15,76 - (5,98 \times \text{NKA branquial})$, onde $r^2 = 0,73$ ($P = 0,03$).

DISCUSSÃO

Potamotrygon sp. demonstrou uma clara dificuldade para regular as concentrações dos íons Na^+ e Cl^- nos fluidos corporais após exposição à água do Rio Branco por 12 horas. Os níveis desses eletrólitos no plasma tornam-se reduzidos quando comparados às arraias mantidas na água nativa do Rio Negro. A consequência da redução dos íons tem como reflexo a diminuição da osmolalidade plasmática. O desequilíbrio iônico foi mais pronunciado para o Cl^- . A redução da $[\text{Cl}^-]$ plasmático foi acompanhada de uma diminuição na concentração desse eletrólito no fluido perivisceral. Estes resultados contrastam com os dados normalmente relatados para outros elasmobrânquios. Os níveis de Na^+ e Cl^- plasmáticos de elasmobrânquios eurialinos tendem a reduzir sob condições de salinidade ambiental reduzida, isto foi observado no tubarão cabeça-chata, *Carcharhinus leucas* (PILLANS & FRANKLIN, 2004), *Urolophus jamaicensis* (SULIKOWSKI & MAGINNIS, 2001) e na arraia *Leucoraja ocellata* (SULIKOWSKI et al., 2003). Portanto, como a água do Rio Branco é mais rica em íons que a água do Rio Negro esperava-se um aumento das

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

Então, se a aclimatação a uma água ionicamente enriquecida não altera a cinética de influxo dos íons Na^+ e Cl^- , a redução na concentração desses íons nos fluidos corporais de *Potamotrygon* sp. expostos à água do Rio Branco pode estar relacionado aos seguintes processos osmo-ionorregulatórios: (i) o aumento da taxa de efluxo branquial; (ii) a perda por meio da excreção renal; (iii) ou ainda, o resultado de um ajuste entre todos estes processos, e possivelmente alterado pela ação dos ácidos húmicos sobre o epitélio branquial (WOOD et al., 2003).

Wood et al. (2002) relataram que o efluxo de Na^+ ($J_{\text{out}} \text{Na}^+$) em *Potamotrygon* sp. aclimatado à água do Rio Negro não varia com a mudança na concentração externa de Na^+ , enquanto o $J_{\text{out}} \text{Cl}^-$ aumenta significativamente com o aumento na concentração de Cl^- na água. Assim sendo, provavelmente esta arraia tende a perder mais Cl^- que Na^+ para o meio externo. Isto explica, pelo menos superficialmente, a redução significativa de Cl^- no plasma e no fluido perivisceral, diminuindo a osmolalidade total das arraias expostas à água do Rio Branco. Além disso, Wood et al. (2002) relatam que o perfil cinético do fluxo iônico de *Potamotrygon* sp. com alto K_m e baixo J_{max} leva a um balanço iônico negativo com perdas significativas de Na^+ e Cl^- . Por isso, tem-se sugerido que a presença do carbono orgânico dissolvido (DOC) na água em baixo pH possa atuar diretamente sobre as brânquias protegendo estas arraias (WOOD et al., 2003) e outros teleósteos do Rio Negro, como o cardinal tetra, *Paracheirodon axeroldi* (MATSUO & VAL, 2007) contra a perda de íons, e evitando possíveis distúrbios ionorregulatórios. Como a concentração de DOC do Rio Negro (11,4 mg/L) é cerca de 4 vezes maior que a do Rio Branco (2,7 mg/L) (KÜCHLER et al., 2000), a baixa concentração de DOC no Rio Branco pode ter contribuído para potencializar a perda

de íons por meio das brânquias para o meio, além disso, pode-se incluir a perda ocorrida pela atividade renal reduzida.

As diferenças nas características físicas e químicas da água entre os rios não alteram os níveis de atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) branquial de *Potamotrygon* sp., possivelmente devido ao fato de que, as alterações nos teores de íons da água não influenciam na cinética de $J_{\text{in}} \text{Na}^+$ e $J_{\text{in}} \text{Cl}^-$, como sugerido por Wood et al. (2002), e provavelmente também não afetam os mecanismos eletrogênicos que impulsionam os sistemas de transportes de íons pelas brânquias dessas arraiais.

Em alguns teleósteos, como *Chanos chanos*, a redução na $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$ e osmolalidade plasmática ocorre entre 3-6h após choque hipo-osmótico (fase de ajuste), porém, a expressão, a atividade da NKA e o número de CC-imuno-positiva para NKA (CC-NKA) só aumentam entre 12 - 96 h, no início da fase regulatória (LIN et al., 2003). Os dados sobre o número de CC-NKA branquial de *Potamotrygon* sp. também suportam esta evidência. Não há alteração no número de CC-NKA nas arraiais após 12h de exposição à água do Rio Branco. No entanto, não se pode assumir que estes mecanismos osmo-ionorregulatórios possam, por si só, assegurar que a arraia *Potamotrygon* sp. permaneça indefinidamente nas águas do Rio Branco, uma vez que a adaptação osmorregulatória envolve o compromisso direto e/ou indireto de outros órgãos osmorreguladores extra-branquiais, tais como os rins.

A aparente ausência de efeitos morfofuncionais sobre as brânquias sugere que os rins tenham sido, pelo menos parcialmente, responsáveis pela redução dos eletrólitos plasmáticos e do fluido perivisceral de *Potamotrygon* sp. após exposição à água do Rio Branco. A maioria dos peixes quando submetidos em ambientes pobres em íons tendem a aumentar a atividade da NKA renal, como uma forma de minimizar a perda de sais, produzindo uma urina diluída (HAZON et al., 2003; LIN et al., 2004). Este não foi o caso de *Potamotrygon* sp. exposto à água do Rio Branco, pois a redução na atividade da NKA renal poderia representar uma tentativa para ajustar os mecanismos compensatórios relacionados à manutenção da homeostase iônica. A forte correlação negativa entre a NKA renal e branquial ressalta o compromisso entre estes órgãos para a manutenção da regulação iônica. Porém, a aparente incapacidade para regular os mecanismos de reabsorção de íons pelos rins dos exemplares expostos à água do Rio Branco pode ter contribuído para a perda excessiva de íon $[\text{Na}^+]$ plasmático e $[\text{Cl}^-]$ tanto do plasma quanto do fluido perivisceral. Principalmente

para o íon Cl^- , onde a perda excessiva desse íon pode ser crucial para a homeostase hidromineral. A perda excessiva de íons Cl^- em *Myoxocephalus octodecimspinosus* (CLAIBORNE et al., 1994) e *Fundulus heteroclitus* (SCOOT et al., 2004) após exposição ao ambiente hipo-osmótico tem sido apontada como a principal causa de mortalidade.

O Rio Branco deságua na margem esquerda do Rio Negro, na altura das coordenadas S01°23'248" W61°50'887. As diferenças não se limitam apenas à aparência física (na qual os rios recebem seus nomes). Na confluência dos rios, as características físicas e químicas do Rio Branco, tais como pH >6,5; condutividade elétrica $\approx 27,5 \mu\text{S}/\text{cm}$; sólidos totais dissolvidos $\approx 14,7 \text{ mg}/\text{L}$ contrastam fortemente com os baixos valores dessas variáveis no Rio Negro (pH <4,5; condutividade elétrica $\approx 9,3 \mu\text{S}/\text{cm}$; sólidos totais dissolvidos, $\approx 5,2 \text{ mg}/\text{L}$). Ainda assim, não é improvável que na natureza a espécie *Potamotrygon* sp. eventualmente seja exposta às águas do Rio Branco, pois esta arraia é abundante e endêmica da região do Médio Rio Negro próximo à boca do Rio Branco. Portanto, se a barreira existe, esta pode ser devido às características físicas e químicas da água e não às barreiras físicas (geológicas/geográficas). Porém, a estrutura da comunidade de algumas famílias de peixes na confluência dos rios Negro e Branco reforçam a hipótese de que rios com características limnológicas distintas (juntamente com fatores ecológicos, como nicho, predação, competição, etc.) possam atuar como barreiras hidrográficas. Por exemplo, das 17 espécies de Gymnotiformes da família Apterontidae que ocorrem no Rio Negro próximo à boca do Rio Branco, apenas 3 foram capturadas no Rio Branco (THOMÉ-SOUZA & CHAO, 2004). Portanto, a hipótese da barreira hidrográfica em *Potamotrygon* sp. é sugerida como sendo um distúrbio no balanço eletrolítico após exposição à água do Rio Branco em curto espaço de tempo. No entanto, é importante comentar que os limites fisiológicos somam-se aos fatores ecológicos, como nicho, predação, competição e estrutura de habitat, que conjuntamente atuam como fatores determinantes da distribuição geográfica desta espécie.

Em resumo, os mecanismos osmo-ionorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. estão adaptados à sobrevivência às águas extremamente diluídas e ácidas do Rio Negro. A rápida exposição às águas do Rio Branco provoca desequilíbrio iônico, com perda de sais, os quais, possivelmente, estão relacionados às falhas nos mecanismos osmorregulatórios das brânquias e dos rins. Portanto, a mistura das águas dos rios

Branco e Negro na altura das coordenadas S01°23'25" W61°50'89" pode atuar como um dos fatores (além do substrato de fundo rochoso e fatores ecológicos) que delimitam a distribuição geográfica da arraia *Potamotrygon* sp., uma espécie endêmica do Médio Rio Negro.

CAPÍTULO 6

PADRÕES OSMORREGULATÓRIOS DA ARRAIA DE ÁGUA DOCE, *Paratrygon aiereba* MÜLLER & HENLE (CHONDRICHTHYES: POTAMOTRYGONIDAE) DA ÁGUA PRETA E ÁGUA BRANCA DA BACIA AMAZÔNICA

Palavras-chave: *Paratrygon aiereba*, Rio Negro, Rio Solimões/Amazonas, Água branca, Água preta, Osmorregulação.

INTRODUÇÃO

As arraiais de água doce Neotropicais (Potamotrygonidae Garman, 1877) são os únicos elasmobrânquios completamente adaptados para viver e se reproduzir exclusivamente no ambiente de água doce (COMPAGNO & COOK, 1995; LOVEJOY, 1996; CHARVET-ALMEIDA et al., 2002; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a). A família Potamotrygonidae é constituída por três gêneros (*Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*) distribuídos nas grandes bacias da América do Sul (ROSA, 1990; COMPAGNO & COOK, 1995).

Este grupo tem desenvolvido várias características fisiológicas durante sua história evolucionária no ambiente de água doce, tais como inabilidade para acumular uréia nos tecidos como soluto osmorregulador (THORSON, 1970; BITTNER & LANG, 1980; TAM et al., 2003; TREBER et al., 2006), presença de albumina no plasma (GRIFFITH et al., 1973), e glândula rectal não-funcional (THORSON et al., 1978; EVANS et al., 2004). Vários estudos têm demonstrado que a osmorregulação dos potamotrigonídeos ocorre de maneira similar aos teleósteos de água doce e é caracterizada pela baixa concentração de eletrólitos (THORSON et al., 1967; GRIFFITH et al., 1973; BITTNER & LANG, 1980). Recentemente, Wood et al. (2002) descreveram que o mecanismo de transporte iônico na arraia esteno-halina, *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), uma espécie nova e endêmica das águas ácida e pobre em íons do Rio Negro. Segundo estes autores, os mecanismos de transporte iônico nesta espécie ocorrem de maneira similar aos ciclídeos (teleósteos) que ocorrem naquele mesmo rio, ou seja, são caracterizados por um sistema de transporte de baixa afinidade, mas é compensado por uma baixa perda difusiva de íons.

Paratrygon aiereba (Müller & Henle) é uma espécie monotípica amplamente distribuída na bacia do Orinoco e nos sistemas aquáticos da bacia Amazônica (ROSA, 1990; LASSO et al., 1996). Esta espécie forma população local com baixa variabilidade genética, padrão não-migratório e baixo fluxo gênico entre populações (FREDERICO, 2006). Estas características fazem desta espécie um excelente modelo para estudos sobre as estratégias osmorregulatórias em diferentes ambientes aquáticos na Amazônia.

A bacia Amazônica se caracteriza pela presença de diferentes corpos d'água. Rios de água branca da bacia Amazônica são ricos em solutos dissolvidos e

extremamente túrbidos devido às altas concentrações de sedimentos em suspensão. Em contraste, os rios de água preta possuem baixa carga de sedimentos dissolvidos, baixo conteúdo iônico e são extremamente ácidos devido ao elevado conteúdo de ácidos húmicos e fúlvicos provenientes da lixiviação da liteira em decomposição na floresta Amazônica (FURCH et al., 1982; KONHAUSER et al., 1994; AUCOUR et al., 2003). Enquanto *Potamotrygon* sp. é uma espécie endêmica e adaptada às águas pretas e ácidas do Rio Negro e seus tributários (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003; CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a; ver Capítulo 5), *Paratrygon aiereba* vive em ambos os tipos de águas (preta e branca). Até o presente momento, nenhuma informação está disponível sobre os aspectos da regulação iônica das espécies que vivem nestes ambientes. Portanto, este estudo tem como objetivo caracterizar a concentração dos principais osmólitos dos fluidos corporais e a atividade da Na^+/K^+ - ATPase branquial e renal de *P. aiereba* de água preta (rio Negro) e água branca (rio Solimões). Os parâmetros hematológicos dos espécimes destes dois habitats também foram analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e captura dos animais

Juvenis de *Paratrygon aiereba* pesando entre 171 a 212 g (194 ± 33 g) e largura de disco variando entre 220 a 360 mm (302 ± 41 mm) foram coletados usando rapichés e puçás nas praias rasas do Rio Negro (próximo à cidade de Barcelos-AM, $\text{S}00^{\circ}51'$; $\text{W}62^{\circ}45'$) e no rio Solimões (no Lago Janauacá-AM, $\text{S}03^{\circ}21'$; $\text{W}60^{\circ}15'$). Em todos os sítios de coleta, as arraias foram capturadas durante o período de seca dos rios amazônicos. Os locais de coleta estão indicados na Figura 1. Concomitantemente com a captura das arraias, as variáveis físico-químicas pH, temperatura, concentração de oxigênio, sólidos totais dissolvidos e condutividade da água foram imediatamente determinados usando um analisador multiparâmetro Consort C535. Amostras da água foram coletadas para análises dos íons Na^+ e K^+ por fotometria de chama (Digimed DM-61).

Após as coletas, as arraias foram mantidas por 24 - 48 h na mesma água do rio onde foram capturadas. Após a aclimatização, os animais foram irreversivelmente anestesiados em ácido 3-amino-benzóico etil éster (MS-222, Sigma Chemical Co.)

tamponado (Tampão fosfato 10 mM; pH 7,3). O sangue foi retirado por meio de punção cardíaca usando seringa com agulha hipodérmica heparinizada. Os animais foram sacrificados por contusão espinal e o fluido perivisceral, brânquias e rins foram removidos após incisão cirúrgica ventral. Sub-amostras de sangue foram utilizadas para os procedimentos hematológicos e o restante foi centrifugado (12.500 g por 5 min) para remover o plasma. Tanto o plasma quanto o fluido perivisceral foram congelados em N₂-líquido até o momento das análises laboratoriais.

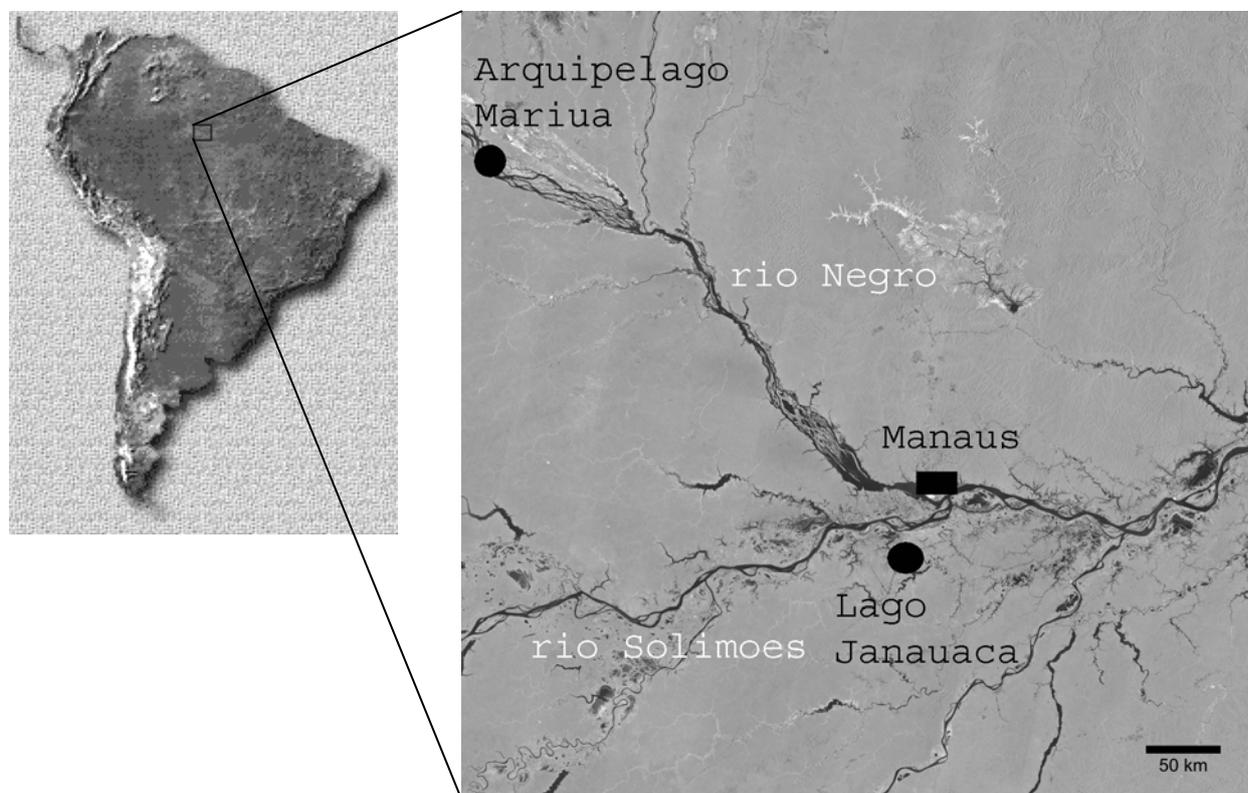


Figura 1. Mapa indicando os locais de coleta das arraias (*Paratrygon aiereba*) no Rio Negro (água preta do Arquipélago de Mariuá, Barcelos) e Rio Amazonas/Solimões (água branca do Lago Janauacá). Imagem do satélite JERS-1 (NASDA) do “Global Rain Forest Mapping Project South America”, setembro/dezembro de 1995, volume AM2.

Análises hematológicas

As variáveis hematológicas foram imediatamente analisadas. O hematócrito (Ht, %) foi determinado por meio de centrifugação a 12.000 g por 10 min. A concentração de hemoglobina ([Hb], g/dl) foi estimada espectrofotometricamente (540 nm) pelo método da cianometahemoglobina. O número de eritrócitos circulantes (RBC $\times 10^6$ mm^3) foi contado utilizando-se uma câmara de Neubauer. As constantes hematológicas: concentração de hemoglobina corpuscular média ([CHCM, pg]), concentração de hemoglobina média (HCM, %) e volume corpuscular médio (VCM, μm^3) foram estimados por meio de equações após as determinações das variáveis hematológicas.

Procedimentos analíticos

As análises do plasma e do fluido perivisceral foram feitas usando um espectrofotômetro Spectrum SP-2000 UV. A concentração de proteína total foi quantificada pelo método da reação do Biureto (550 nm). Os níveis de albumina foram estimados por meio da reação do verde de bromocresol em pH 4,2. Este procedimento forma um complexo verde-azulado, onde a mudança de absorbância em 628 nm é diretamente proporcional à concentração de albumina presente na amostra. A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase (550 nm). O método da ortocresolftaleína complexona foi utilizado para se estimar os teores de cálcio. O método da urease, uma modificação da reação de Berthelot foi utilizada para determinação dos níveis de uréia presentes na amostra. A concentração de cloreto foi determinada por meio de titulação colorimétrica. Todos os métodos analíticos foram adquiridos da In Vitro Diagnostica (Barbacena, São Paulo, Brasil) e cada ensaio foi realizado em duplicata. As concentrações de íons Na^+ e K^+ foram determinadas por fotometria de chama (Digimed Model DM-61), enquanto a osmolalidade foi realizada por osmometria de ponto de congelamento (μ -Osmette Precision Systems microsmometer).

Atividade específica da Na^+/K^+ - ATPase

Amostras de ambos os arcos branquiais e dos rins foram armazenados em tampão SEI (sacarose 300 mM, EDTA 20 mmol, Imidazol 100 mmol, pH 7,4) e congelados em N_2 -líquido até o momento das análises. Os homogeneizados foram preparados em baixa temperatura (~ 4 °C) usando um homogeneizador Dispensor

Extratur (Quimis). Após isso, foram centrifugados em 17.500 g por 30 min em baixa temperatura. Sub-amostras dos homogeneizados foram usados para determinação da concentração de proteína e atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA). As análises da NKA foram ensaiadas em tampão NaCl, 100 mM; MgCl, 5 mM; KCl, 13 mM; ATP, 3 mM e imidazol, 30 mM, em pH 7,4 incubados durante 30 min a 25°C. Simultaneamente, outro ensaio foi realizado em iguais condições, mas com a presença da ouabaína (2 mM) e ausência de KCl. A reação foi interrompida com TCA (25%) e o fosfato inorgânico foi determinado em 620 nm por meio da modificação do método Fiske-Subbarow (1925). A atividade da NKA foi definida como sendo a diferença no fosfato liberado na presença e ausência da ouabaína e expressa como atividade específica em $\mu\text{moles de Pi/mg proteína/h}$.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado inicialmente para analisar a distribuição dos dados. As comparações feitas entre os grupos coletados na água preta *versus* água branca, bem como os dados do plasma *versus* fluido perivisceral foram realizadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Em todos os casos, o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Variáveis físicas e químicas da água

Os valores das variáveis físicas e químicas das águas do Rio Negro e rio Solimões estão apresentados na Tabela 1. Como esperado, as águas pretas do Rio Negro são pobres em eletrólitos (Na^+ e K^+), tem menores valores de pH, de condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos do que a água branca do rio Solimões. Nesse aspecto, a água do rio Solimões pode ser considerada rica em eletrólitos quando comparada às águas do Rio Negro. A concentração de oxigênio não foi significativamente diferente entre os dois locais de coleta, muito embora, ligeiramente mais baixa na água do rio Solimões do que no Rio Negro.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas (media±erro padrão) do Rio Negro (água preta) e Rio Solimões/Amazonas (água branca). *Indica diferença significativa entre os rios (P<0,05).

Variáveis ambientais	Rio Negro	Rio Solimões
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,1 ± 0,2	3,2 ± 0,3
Temperatura (°C)	29,6 ± 0,7	28,3 ± 0,9
pH	4,5 ± 0,9	6,4 ± 0,7*
Condutividade (µS/cm)	9,4 ± 0,7	18,9 ± 0,5*
Sólidos Dissolv. Totais (mg/L)	5,2 ± 0,1	17,3 ± 0,6*
[Na ⁺] (µEq/L)	10,3 ± 0,4	183,0 ± 3,1*
[K ⁺] (µEq/L)	14,2 ± 2,1	34,3 ± 1,0*

Hematologia

Os resultados das variáveis hematológicas estão apresentados na Tabela 2. O hematócrito, o volume celular médio e a concentração média de hemoglobina corpuscular das arraias de água branca (rio Solimões) estão mais elevados (P<0,05) que aquelas provenientes de água preta (Rio Negro), muito embora, nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada no número de eritrócitos circulantes e concentração de hemoglobina.

Tabela 2. Variáveis hematológicas (media±erro padrão), hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos circulantes (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de exemplares de *P. ajereba* do Rio Negro (água preta, N=8) e Rio Solimões/Amazonas (água branca, N=6).

	Água preta	Água branca
Ht (%)	14,2 ± 1,2	22,9 ± 1,0*
[Hb] (g/dL)	4,9 ± 0,5	4,4 ± 0,5
RBC (x 10 ⁶ /mm ³)	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
VCM (mm ³)	71,2 ± 5,2	114,5 ± 9,4*
HCM (pg)	24,5 ± 2,3	22,0 ± 1,8
CHCM (%)	34,9 ± 3,6	19,4 ± 2,3*

(*) indica diferença significativa entre os grupos: água preta *versus* água branca (P<0,05).

Composição química do plasma e fluido perivisceral

A concentração de proteína total e os níveis de glicose de *P. aiereba* são mais elevados ($P < 0,05$) no plasma do que no fluido perivisceral. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre as duas populações, i.é, das arraias de água preta e água branca (Tabela 3). A albumina, encontrada apenas no plasma, não difere entre os espécimes de diferentes sítios de coleta.

Tabela 3. Proteínas totais (g/100 mL), albumina (g/100 mL) e concentração de glicose (mmol/L) no plasma e no fluido perivisceral de exemplares de *P. aiereba* do Rio Negro (água preta, N=8) e Rio Solimões/Amazonas (água branca, N=6).

	Água preta		Água branca	
	Plasma	Fluido perivisceral	Plasma	Fluido perivisceral
Proteínas totais	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,01 [#]	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,02 [#]
Albumina	0,3 ± 0,1	Nd	0,5 ± 0,1	Nd
Glicose	1,7 ± 0,2	0,4 ± 0,01 [#]	1,5 ± 0,3	0,5 ± 0,01 [#]

([#]) indica diferença significativa entre plasma e fluido perivisceral ($P < 0,05$). Nd= não detectado pelo método. Valores como média ± erro padrão.

Os teores de uréia plasmática de *P. aiereba* de água branca são mais elevados ($P < 0,05$) do que nos exemplares de água preta, de igual modo foi observado nos valores de osmolalidade plasmática (Fig. 2). A osmolalidade do fluido perivisceral entre as duas populações de *P. aiereba* não foram diferentes. Por outro lado, os níveis de uréia são mais elevados ($P < 0,05$) no fluído perivisceral do que no plasma, muito embora, os valores de osmolalidade tenham sido similares entre estes fluidos.

As concentrações de Na^+ e Cl^- plasmático em *P. aiereba* foram significativamente mais elevadas nos exemplares de água branca que naqueles de água preta (Fig. 3). Em *P. aiereba* do Rio Negro, as concentrações dos íons Na^+ e Cl^- foram 138,9±2,2 e 146,2±2,8 mEq/L, respectivamente. Nos espécimes do rio Solimões as $[\text{Na}^+]$ e $[\text{Cl}^-]$ foram 156,6±1,9 e 177,5±2,9 mEq/L, respectivamente. Por outro lado, as concentrações dos íons K^+ e Ca^{+2} foram similares nas arraias água preta, Rio Negro

($4,8 \pm 0,2$ e $5,2 \pm 0,2$ mEq/L, respectivamente) e da água branca, rio Solimões ($5,7 \pm 0,1$ e $5,8 \pm 0,2$ mEq/L, respectivamente).

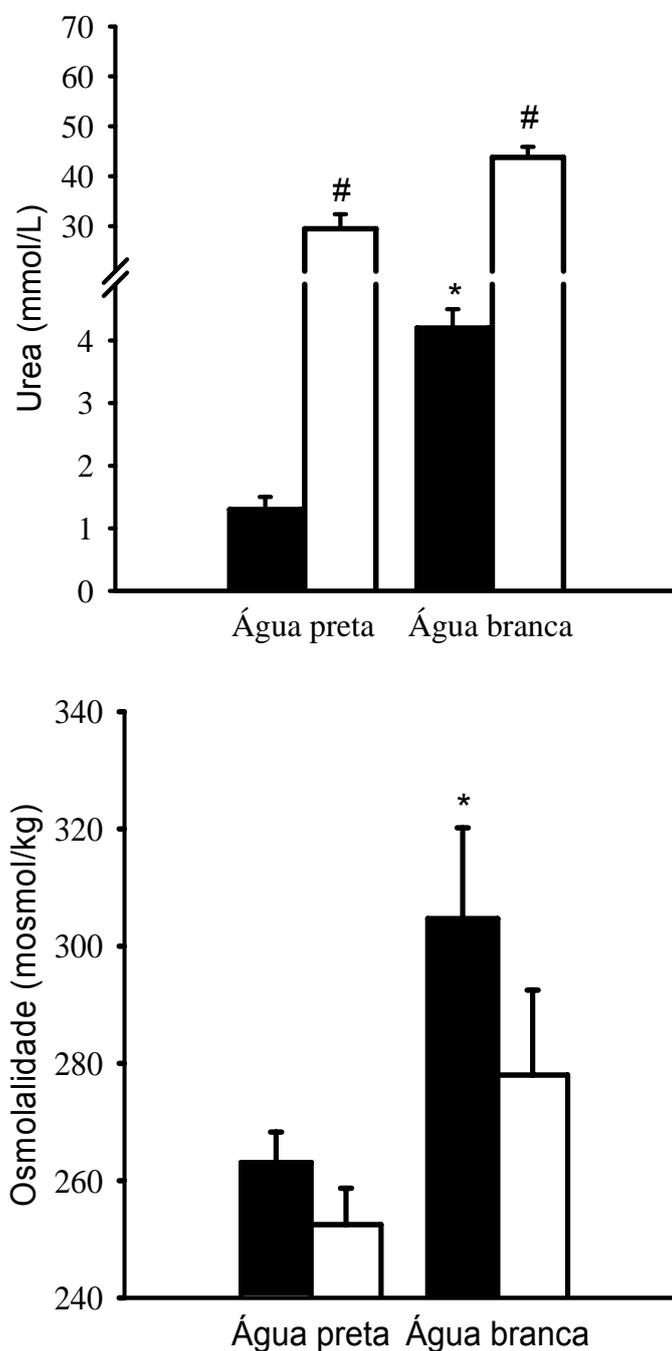


Figura 2. Valores médios \pm erro padrão da concentração de uréia e osmolalidade no plasma (barras pretas) e no fluido perivisceral (barras claras) de exemplares juvenis de *P. aereba* de água preta (Rio Negro, N=8) e água branca (Rio Solimões/Amazonas, N=6). (*) diferença significativa entre arraias de água preta e água branca. (#) indica diferença significativa entre plasma e fluido perivisceral ($P < 0,05$).

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas concentrações dos eletrólitos (Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{+2}) no fluido perivisceral das araias provenientes dos dois sítios de coleta. Contudo, nos espécimes do rio Solimões (água branca) as concentrações de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} estavam significativamente mais elevadas no plasma ($P < 0,05$) do que no fluido perivisceral. As concentrações de K^+ não variaram entre o plasma e o fluido perivisceral.

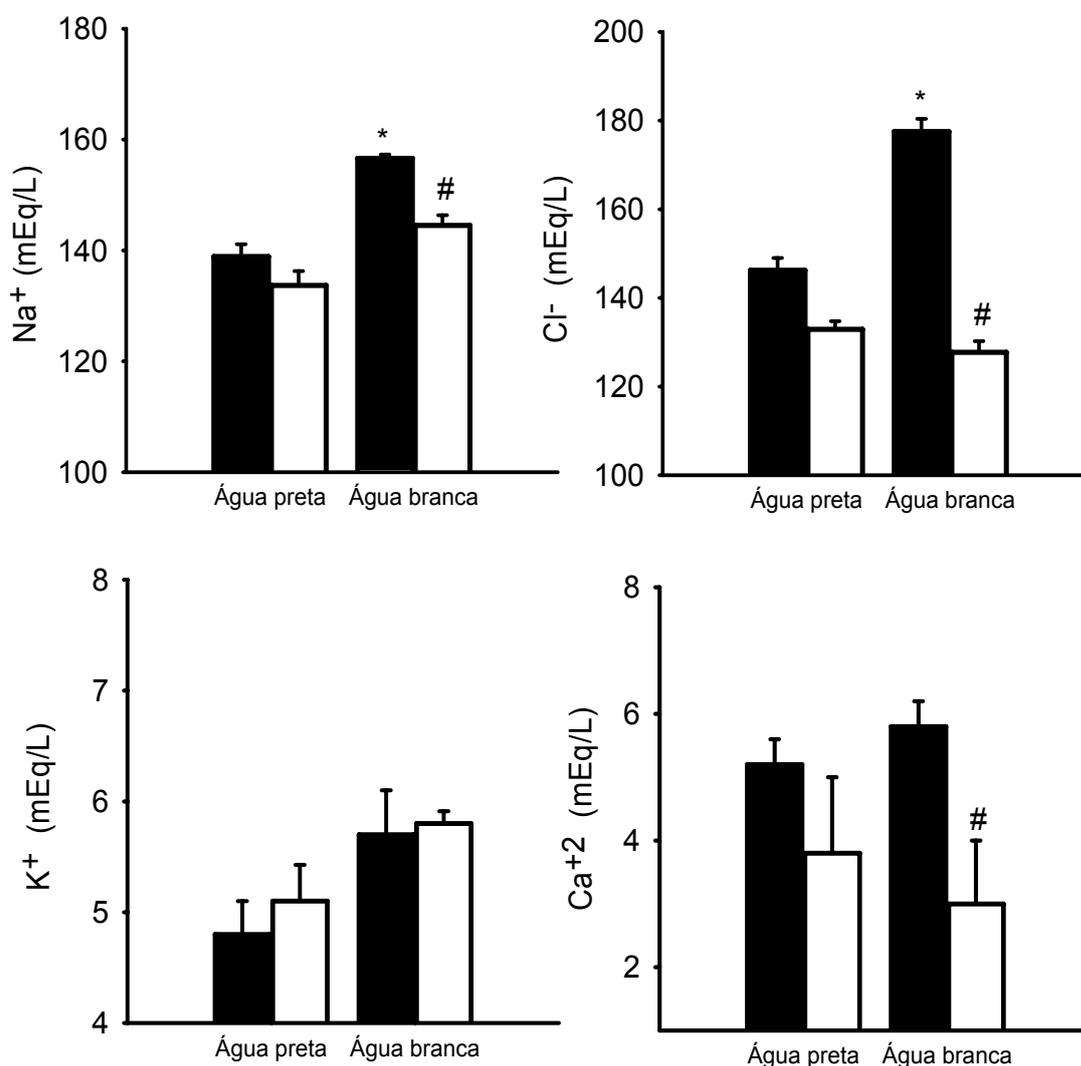


Figura 3. Concentração média \pm erro padrão dos íons no plasma (barras escuras) e fluido perivisceral (barras claras) em exemplares de *P. aiereba* de água preta (Rio Negro, N=8) e água branca (Rio Solimões/Amazonas, N=6). (*) indica diferença entre as duas populações. (#) diferença significativa entre plasma e fluido perivisceral ($P < 0,05$).

Atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal

As atividades específicas da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) nas brânquias e rins das arraiais de água preta (Rio Negro) são mais elevadas ($P < 0,05$) que dos espécimes que vivem na água branca, rio Solimões (Fig. 4). Nos exemplares do Rio Negro, a atividade da NKA branquial foi 2,5 vezes maior do que nos espécimes do rio Solimões. De igual modo foi observado nos rins, onde a NKA estava 1,6 vezes mais elevada nos exemplares do Rio Negro $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$ do que nos de água branca ($8,2 \pm 0,4$).

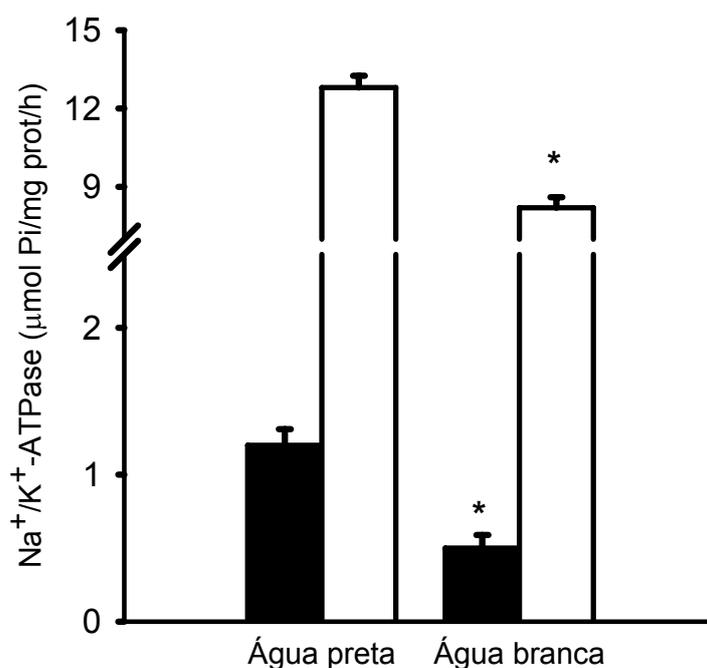


Figura 4. Atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias (barras escuras) e nos rins (barras claras) de exemplares juvenis de *P. aiereba* da água preta (Rio Negro, N=8) e da água branca (Rio Solimões/Amazonas, N=6). (*) indica diferença significativa entre os valores das duas populações de arraiais ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

As diferenças nos parâmetros hematológicos e osmorregulatórios entre as duas populações de *Paratrygon aiereba* são explicadas pelo conceito da plasticidade fenotípica. Plasticidade fenotípica é a chave para a adaptação, e pode ser definida como a “amplitude” da variação fisiológica de um dado genótipo quanto exposto à diferentes condições ambientais abióticas ou bióticas (ALMEIDA-VAL et al., 1999).

A habilidade de algumas espécies de peixes amazônicos para tolerar baixos níveis de oxigênio é uma vantagem adaptativa se comparada às espécies menos tolerantes. Durante o período de seca, quando os níveis de oxigênio estão extremamente reduzidos muitas espécies sensíveis morrem. As espécies mais tolerantes apresentam inúmeras estratégias morfológicas, bioquímicas e fisiológicas para aumentar a eficiência na captação e transferência de oxigênio do ambiente aos tecidos. Ajustes nos parâmetros hematológicos podem aumentar a capacidade de transporte de O₂ pelo sangue durante os períodos de baixo teor de oxigênio ambiental (ALMEIDA-VAL et al., 1999).

Diferente dos teleósteos, *Paratrygon aiereba* apresenta um número reduzido de eritrócitos circulantes e baixa concentração de hemoglobina. Os parâmetros hematológicos desta espécie estão dentro dos intervalos relatados para outros potamotrigonídeos (GRIFFITH et al., 1973). No período de seca, as águas do Lago Janauacá, no Rio Amazonas/Solimões apresentam baixos teores de oxigênio dissolvido (hipóxia moderada). Os elevados valores de hematócrito das arraias desse local sugerem hemo-diluição, e, portanto uma redução dos fosfatos orgânicos, os moduladores alostéricos da hemoglobina (Hb), favorecendo o aumento da afinidade da Hb-O₂. Em condições de hipóxia, estes ajustes podem auxiliar na redução da ventilação branquial e, portanto reduzir a perda de íons pelas brânquias (EVANS et al., 2005).

Com relação aos mecanismos da interação organismo-ambiente, um dos mais interessantes aspectos da fisio-ecologia é: como uma mesma espécie é capaz de conquistar diferentes habitats? A espécie *P. aiereba* tem ampla distribuição geográfica e suas populações locais parecem bem adaptadas ao tipo de ambiente onde vivem.

Alguns parâmetros fisiológicos são similares, enquanto outros estão associados ao habitat. Por exemplo, exemplares das duas populações de *P. aiereba* estudados apresentaram similares valores para os níveis de proteínas totais e glicose plasmáticos, sendo que estes valores estão dentro dos intervalos relatados para potamotrigonídeos (THORSON et al., 1967; WOOD et al., 2002). Os níveis de albumina plasmática, que é ausente ou extremamente baixa em elasmobrânquios (GRIFFITH et al., 1973) está presente em *P. aiereba* em quantidades que variam de 20 a 40% do total de proteínas plasmáticas, confirmando os primeiros relatos para potamotrigonídeos. A presença de albumina pode sugerir um papel associado ao transporte de lipídeos, ou mesmo um importante constituinte da pressão osmótica no plasma.

As duas populações de *P. aiereba* apresentaram diferenças nos teores de uréia do plasma. Os níveis de uréia plasmática nesta espécie são baixos se comparados aos valores relatados para espécies marinhas. Isto sugere que a osmorregulação de *P. aiereba* é realizada principalmente pelos eletrólitos plasmáticos. Esta característica foi sugerida por vários autores (THORSON et al., 1967; GEST & THORSON, 1977; WOOD et al., 2002; TAM et al., 2003; IP et al., 2003). Porém, quantidades significativas de uréia foram encontradas no fluido perivisceral de *P. aiereba*, o que sugere que a uréia ainda pode exercer um importante papel como osmólito neste fluido. Estes valores são 135 vezes superiores aos encontrados para vários potamotrigonídeos relatados por Thorson et al. (1967).

As concentrações dos íons plasmáticos também foram diferentes entre as duas populações de *P. aiereba*. Estas diferenças podem ser explicadas pela plasticidade fenotípica usualmente observada em uma espécie que se adapta em habitats aquáticos com diferenças na composição química. Comparando os Rios Negro e Solimões/Amazonas em relação às suas características limnológicas, observa-se uma grande diferença entre os valores de pH, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos. O Rio Solimões/Amazonas é rico em íons, se comparado ao Rio Negro. O sistema Amazonas/Solimões tem 6,2 mais [Cl⁻]; 7,3 mais [Na⁺]; 3,3 mais [K⁺] e 39,4 mais [Ca⁺²] do que o Rio Negro (FURCH et al., 1982; AUCOUR et al., 2003). Portanto, alguns traços osmorregulatórios de *P. aiereba* parecem ter uma natureza plástica. Esta característica é similar àquelas observadas em outros elasmobrânquios expostos ao

gradiente salino, ou seja, as concentrações dos íons plasmáticos aumentam, na medida em que a osmolaridade ambiental aumenta (BITTNER & LANG, 1980; TAM et al., 2003; PILLANS & FRANKLIN, 2004).

Em teleósteos, as brânquias e os rins são os principais órgãos osmorreguladores (LIN et al., 2004; EVANS et al., 2005). No ambiente de água doce, a manutenção do balanço hídrico requer dos rins a formação e excreção de uma urina diluída, cujo volume é semelhante ao influxo líquido de água pelas brânquias e tegumento (JANECH & PIERMARINI, 2002). Além disso, a perda difusional de Na^+ e K^+ pelas brânquias requer o balanço entre os mecanismos de absorção iônica e a reduzida perda pela urina (SHUTTLEWORTH, 1988). Em geral, os mecanismos adaptativos para reduzir a perda de íons em elasmobrânquios de água doce incluem a baixa permeabilidade branquial (EVANS et al., 2005), a glândula rectal não funcional (THORSON et al., 1978), e o aumento da reabsorção tubular renal (LACY & REALE, 1995). A arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) quando aclimatizada nas águas ácidas e pobre em íons da bacia do Rio Negro parece osmorregular de maneira similar aos ciclídeos que vivem nesta bacia (WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003). De acordo com Gonzales & Wilson (2001), alguns teleósteos do Rio Negro apresentam duas estratégias osmorregularórias: (i) sistema de transporte de Na^+ de alta afinidade insensível à inibição pelo baixo pH da água, porém com uma elevada taxa de perda difusiva. Esta estratégia é comum em muitos caracídeos; (ii) sistema de transporte de baixa afinidade relativamente sensível à inibição pelo baixo pH, porém com reduzida taxa de perda iônica. Este mecanismo foi observado nos ciclídeos. Para Wood et al. (2002), a arraia cururu, *Potamotrygon* sp. mantém-se em balanço iônico (Na^+ , Cl^- e Ca^{+2}) negativo com o ambiente aquático, e representa uma versão extrema da segunda estratégia.

A elevada atividade renal da Na^+/K^+ -ATPase de *P. aiereba* pode ter contribuído para aumentar a reabsorção tubular dos íons Na^+ e Cl^- . Porém, é importante enfatizar que *Paratrygon aiereba* é predominantemente ictiofágica (LASSO et al., 1996; RINCON, 2006a) e pode obter quantidades suplementares de íons pela dieta carnívora.

Concluindo, *P. aiereba* ajusta as variáveis hematológicas em relação às características físicas e químicas do ambiente. Esta espécie possui a capacidade para osmorregular em diferentes habitats aquáticos da bacia amazônica com diferentes características limnológicas.

PARTE V



Considerações finais

CAPÍTULO 7

BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO DE POTAMOTRYGONIDAE

A Biologia da conservação adapta conceitos e teorias ecológicas para propor metodologias apropriadas para que sejam implantadas ações práticas que facilitem a conservação de um dado recurso biológico. Dessa forma, ela combina ciência e manejo dentro do espectro da interação espécies-habitats-ecossistemas (MARTIN, 2004; MARTIN, 2005). O ser humano não pode ser excluído do processo, pois os esforços e ferramentas desenvolvidas no campo da biologia da conservação foram criadas para minimizar os efeitos da ação antrópica. A biologia da conservação procura, inicialmente, identificar e estudar os impactos das atividades antropogênicas em cada um dos níveis hierárquicos da organização biológica (indivíduo, populações, comunidades e ecossistemas); e numa segunda etapa criar e implementar ações para recuperar e/ou minimizar o processo biológico afetado (LÈVÊQUE & MOUNOLOU, 2003).

Os objetivos deste capítulo direcionam-se à primeira das ações descritas acima, constitui-se de um breve relato sobre a complexa e confusa sistemática dos potamotrigonídeos e em seguida, discute-se o uso das arraias de água doce da família Potamotrygonidae como recurso natural e os mecanismos legais que permitiram o uso desse recurso. As principais atividades antropogênicas que comprometem as ações conservacionistas das arraias de água doce foram identificadas. Em cada um dos tópicos será dada ênfase aos processos orgânicos inerentes aos potamotrigonídeos que merecem atenção diferenciada para as futuras ações conservacionistas do grupo.

1. A sistemática atual: um grande problema para a biologia da conservação

Os problemas da biologia da conservação dos potamotrigonídeos começam com a ausência de conhecimento sobre a biologia básica do grupo. Para a grande maioria das espécies, desconhecem-se os limites físicos de sua distribuição geográfica, história natural, aspectos reprodutivos, adaptação e sistemática. Como citado anteriormente, o atual status da sistemática do grupo é complexa, confusa, e em muitos casos, até contraditória. A dificuldade para estabelecer as relações filogenéticas deve-se, em parte, ao pequeno grupo de especialistas em sistemática filogenética. A ampla distribuição geográfica do grupo nas grandes bacias sul-americanas requer um elevado esforço humano e financeiro para a obtenção de exemplares. Podem ser destacadas ainda as dificuldades burocráticas na obtenção de autorizações dos órgãos competentes para coleta e transporte das espécies, o elevado grau de morfotipos e padrões policromáticos. Na maioria dos casos, o padrão de coloração dorsal tem sido o único critério adotado na identificação das espécies, no entanto vários estudos têm mostrado que diversas espécies compartilham o mesmo padrão de cor (ALMEIDA, 2003; RINCON, 2006a; TOFFOLI, 2006).

A despeito das dificuldades em se identificar corretamente as espécies, ao longo de quatro décadas foram publicados vários estudos sobre osmorregulação dos potamotrigonídeos (GRIFFITH et al., 1973; GERST & THORSON, 1977; BITTNER & LANG, 1980; WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003). Embora estas informações sejam relevantes para o grupo inteiro, a incerteza na identificação do espécime mantém a ausência de dados para espécies individuais, e, portanto, não altera o status de conservação da espécie. O trabalho pioneiro de Thorson et al. (1967) é dos melhores exemplos. Estes autores foram um dos primeiros a notar que as arraias de água doce da América do Sul (Potamotrygonidae) não acumulam uréia em seus tecidos, além de manter valores de eletrólitos (Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{+2}) nos fluidos corporais em níveis semelhantes aos encontrados para peixes teleósteos de água doce. No entanto, os próprios autores deixam evidente que a identificação dos exemplares utilizados no estudo foi inadequada.

As arraias de água doce da América do Sul estão incluídas em uma única família (Potamotrygonidae Garman 1877). O grupo é composto por 3 gêneros: *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*. McEachran & Aschliman (2004) incluíram as

arraias do gênero *Himantura* dentro da família Potamotrygonidae. Entretanto, os estudos sobre sistemática molecular não dão suporte a esta topologia, sugerindo que as espécies do gênero *Himantura* representam espécies-irmãs da família Potamotrygonidae (LOVEJOY et al., 1998; MARQUES, 2000).

Outro problema é a posição filogenética dos membros da família Potamotrygonidae. Inicialmente, a espécie *Plesiotrygon iwamae* foi apontada como sendo o membro mais basal da família (ROSA et al., 1987). No entanto, o atual consenso é que *Paratrygon aiereba* seja a espécie mais basal (LOVEJOY, 1996; LOVEJOY et al., 1998). A posição filogenética de *Plesiotrygon iwamae* ficou dúbia quando os estudos de MARQUES (2000) e TOFFOLI (2006) sugeriram que esta espécie é filogeneticamente agrupada dentro do gênero *Potamotrygon*. Isso complica ainda mais as relações filogenéticas dentro deste gênero, que é altamente especioso. São aproximadamente 16-18 espécies nominais válidas (CARVALHO et al., 2003; MARTIN, 2005), com duas espécies novas descritas recentemente, *Potamotrygon marinae* das bacias Maroni, Grand Inini e Oyapock da Guiana Francesa (DEYNAT, 2006), e *Potamotrygon boesemani* procedente da bacia do rio Corantijn, Suriname (ROSA et al., 2008). Para este gênero, cerca de sete espécies estão em processo de descrição, sendo pelo menos 3 para a bacia do Rio Tapajós, 2 para a bacia do Rio Tocantins, 1 para a bacia do Rio Negro e 1 para a Ilha de Marajó. Este número ainda pode aumentar, pois nem todas as bacias foram suficientemente amostradas, principalmente as cabeceiras dos principais tributários. Além disso, segundo Rosa et al. (2008), dada a ampla distribuição geográfica e a diversidade de morfotipos, *P. motoro* e *P. orbigny* podem ser complexos de espécies e não espécies individuais. As espécies do gênero *Potamotrygon* são as mais difíceis para se identificar. O elevado grau de policromatismo, morfotipos e compartilhamento de padrões de coloração entre diferentes espécies contribuem para a confusa e complexa identificação das espécies do gênero *Potamotrygon*. Por exemplo, ARAÚJO (2004) relata a existência de pelo menos 9 padrões de coloração em *P. motoro* do Médio Rio Negro.

Um fator importante que dificulta o conhecimento sobre as relações filogenéticas entre as espécies deste gênero, é que a taxa de mutação dos elasmobrânquios quando comparada a dos mamíferos é bastante reduzida (MARTIN et al., 1992), e provavelmente muitas das ferramentas em genética molecular (amplamente utilizadas em teleósteos) têm falhado em separar ou agrupar indivíduos em nível específico.

Exemplos disso estão bem relatados nos atuais estudos sobre as relações filogenéticas de espécies do gênero *Potamotrygon* (ver MARQUES, 2000; ALMEIDA, 2003; TOFFOLI, 2006). Outros fatores incluem a falta de material biológico adequado e o péssimo estado de conservação dos holótipos e parátipos nos Museus. Por exemplo, o holótipo MNHN 2333 de *P. orbignyi* se resume a um pedaço de pele, cauda e nadadeiras pélvicas (RINCON, 2006a).

Os gêneros *Paratrygon* e *Plesiotrygon* até o presente momento são monotípicos. Porém, CHARVET-ALMEIDA et al. (2005b) relatam que o gênero *Paratrygon* é um complexo de espécies, com pelo menos 5 morfotipos que podem ser identificados pelas características morfológicas externas e internas. Estas informações foram consideradas durante o desenvolvimento deste estudo. Considerando as informações disponíveis até o presente momento, optou-se por utilizar apenas exemplares com traços morfológicos semelhantes, embora atualmente não exista na literatura nenhuma descrição nominal para estas espécies.

A família Potamotrygonidae tem representantes em quase todas as grandes bacias da América do Sul, sobretudo naquelas que drenam para o Oceano Atlântico. Por isso, dada a dimensão geográfica de sua distribuição, além dos problemas citados anteriormente, torna-se uma tarefa árdua estimar um número total de espécies para a família Potamotrygonidae. Diante de tudo isso, faz-se necessário uma tarefa-especial que concentre todos os esforços e estudos disponíveis para esta singular família de arraia de água doce, para que as ações conservacionistas e de manejo possam ser realmente implantadas.

2. Uso dos recursos: conflitos de pesca, legislação e controvérsias

As populações ribeirinhas na Amazônia não consideram as arraias de água doce como um recurso valioso para alimentação. Na bacia amazônica, raras são as localidades onde as arraias de água doce são utilizadas como alimento. Na região de Colares, na Baía de Marajó, próximo ao estuário Amazônico, ocasionalmente as arraias capturadas são consumidas como alimento. Nesta localidade, os animais adultos já eviscerados são vendidos por R\$ 1,00/kg no Mercado Municipal (Fig. 1). Os neonatos que constituem a fauna acompanhante durante a pesca da prateira (*Mugil* spp.) nas praias de Colares também são consumidos (observação pessoal; CHARVET-ALMEIDA, 2001; ALMEIDA, 2003). Há relatos de consumo na região do Meio Médio

Amazonas (ARAÚJO et al., 2004a), mas não há registro de consumo no Rio Negro ou nas outras sub-bacias na Amazônia.

Atualmente, o maior problema para os potamotrigonídeos passa a ser a pesca comercial em larga escala. Desde 2001 que o aumento na captura de *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae* direcionada à pesca comercial tem chamado a atenção dos especialistas em elasmobrânquios e dos órgãos públicos de fiscalização (citado em IBAMA, 2005). Segundo Araújo (2005) esta prática tem sido realizada principalmente nos rios Purus, Madeira e na calha do Rio Amazonas, atualmente já está ocorrendo no Médio Rio Negro (Fig. 2). A Instrução Normativa do IBAMA, IN nº 118 de 19 de setembro de 2006, proibiu a captura de arraias para exportação, mas não para fins de consumo. Segundo os dados do PROVÁRZEA/IBAMA (citado em IBAMA, 2005), entre os anos de 2001 a 2004 a produção anual de carcaças de arraias de água doce nas regiões de Santarém e Óbidos (Estado do Pará) aumentou mais de 1.700%. O aumento na pressão de pesca de arraias para fins de consumo fez com o IBAMA realizasse urgentemente encontro técnico para discutir o assunto para se propor planos com ações emergenciais e levantamento de dados sobre pesca e estoque pesqueiro (I Reunião Sobre A Pesca de Arraias de Água Continentais Para Fins de Consumo, Belém-PA, 26 e 27 de junho de 2008). Se considerarmos o baixo consumo local, fica evidente que o destino deste pescado é a exportação. A média de peso dos exemplares encontrados nos desembarques pesqueiros em Santarém oscilava entre 30 e 70 kg, sendo que esta modalidade de pesca incide principalmente sobre o estoque parental de *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro* (ARAÚJO, 2005). Uma vez que as fêmeas são maiores que os machos (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a), a pressão da pesca recai principalmente sobre as fêmeas adultas. Do ponto de vista conservacionista, a pesca comercial direcionada aos potamotrigonídeos deve ser observada com mais cautela, principalmente para *Paratrygon aiereba*, devido às suas estratégias reprodutivas que não sustentam uma pressão pesqueira dessa natureza (ARAÚJO, 2005).

Os elasmobrânquios são particularmente vulneráveis à sobre-exploração devido às características inerentes à sua história de vida, tais como: crescimento lento, maturidade tardia, longo período de gestação, baixa fecundidade e longevidade elevada (MARTIN, 2005). Todas estas características fazem dos elasmobrânquios

animais *K*-estrategistas, ou seja, apresentam uma taxa intrínseca de crescimento populacional muito lenta (CORTÉS, 2000).



Figura 1. Venda de *Potamotrygon scobina* no Mercado Municipal de Colares, Estado do Pará.



Figura 2. “Bóia” de uma arrastadeira na calha do Rio Negro em Mariuá, Barcelos, AM.

Nas espécies-alvo da pesca comercial, a fecundidade uterina é muito baixa, varia entre 2 e 7 em *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon motoro*, respectivamente. O período de gestação é longo, cerca de 6 meses em *P. motoro*, e 9 meses em *P. aiereba* (CHARVET-ALMEIDA et al., 2005a). Segundo ARAÚJO (2005), a espécie *P. aiereba* é a mais capturada (72% de ocorrência nos desembarques). Justamente a espécie com menor fecundidade ovariana, uterina e longo período de gestação (ARAÚJO et al., 2004a). Portanto, se considerarmos as limitações devido ao forte padrão *K*-estrategista de *P. aiereba* e o elevado crescimento da produção anual da pesca comercial, em curto espaço de tempo as populações locais desta espécie poderão entrar em situação de vulnerabilidade ou mesmo criticamente em perigo. Vale ressaltar que casos de depleção dos estoques populacionais de várias espécies de elasmobrânquios em níveis globais estão bem documentados na literatura (FOWLER et al., 2002; MARTIN, 2005).

Além da pesca comercial para exportação, outra forma de exploração das arraias de água doce como recurso econômico é por meio da pesca ornamental. O aquarismo é um hobby consagrado em todo o mundo e tem como foco principal espécies exóticas de cores, formas e comportamentos chamativos e graciosos. As arraias de água doce da família Potamotrygonidae reúnem todas estas qualidades: são achatadas dorso-ventralmente, possuem alto grau de policromatismo, comportamento natatório elegante e a presença de um ferrão caudal.

Na bacia Amazônica, as arraias são capturadas para fins de ornamentação há mais de 25 anos. Vários estudos relatam que pelo menos 10 mil famílias nas bacias do Rio Negro (ARAÚJO, 1998; ARAÚJO et al., 2004b), Rio Xingu (CHARVET-ALMEIDA, 2006), Rio Tocantins (RINCON, 2006a) e do Rio Tapajós (RINCON, 2006b) estão envolvidas com a pesca ornamental. Porém, as arraias de água doce representam uma pequena fração (<0,1%) do número total de peixes ornamentais exportado pelos Estados do Amazonas e Pará. Por exemplo, segundo os dados do IBAMA/AM-NTPO¹ em 2003 foram exportados 17.836.766 indivíduos vivos de diversas espécies de peixes ornamentais. Neste mesmo ano, a legislação do IBAMA (Portaria nº 036/2003) só permitia a exportação de 16.000 unidades de arraias/ano. As espécies de potamotrigonídeos regularmente exportadas com propósitos para o aquarismo foram: *Potamotrygon* sp. (arraia cururu), *P. motoro*, *P. schroederi*, *P. orbignyi*, *P. henlei* e *P. leopoldi* (ARAÚJO et al., 2004a; DUNCAN, 2005). A maioria capturada principalmente no Médio Rio Negro, na região de Barcelos (Estado do Amazonas). Segundo Araújo et al. (2004a; 2004b), as arraias da região de Barcelos correspondiam a 57% do total de arraias que foram exportadas durante a vigência da Portaria 036/2003 - IBAMA que regulamentou a exportação de arraias de água doce (Potamotrygonidae) nos Estados do Amazonas e Pará durante as safras dos anos 2003-2005. Se considerarmos que todas as empresas do setor exportaram todas as suas cotas, na Fig. 3 estão apresentados o percentual de cada espécie capturadas ao longo de 8 safras com legislações específicas que regulamentaram a exportação.

¹www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CConferencia%5CDocumentos/2.ppt

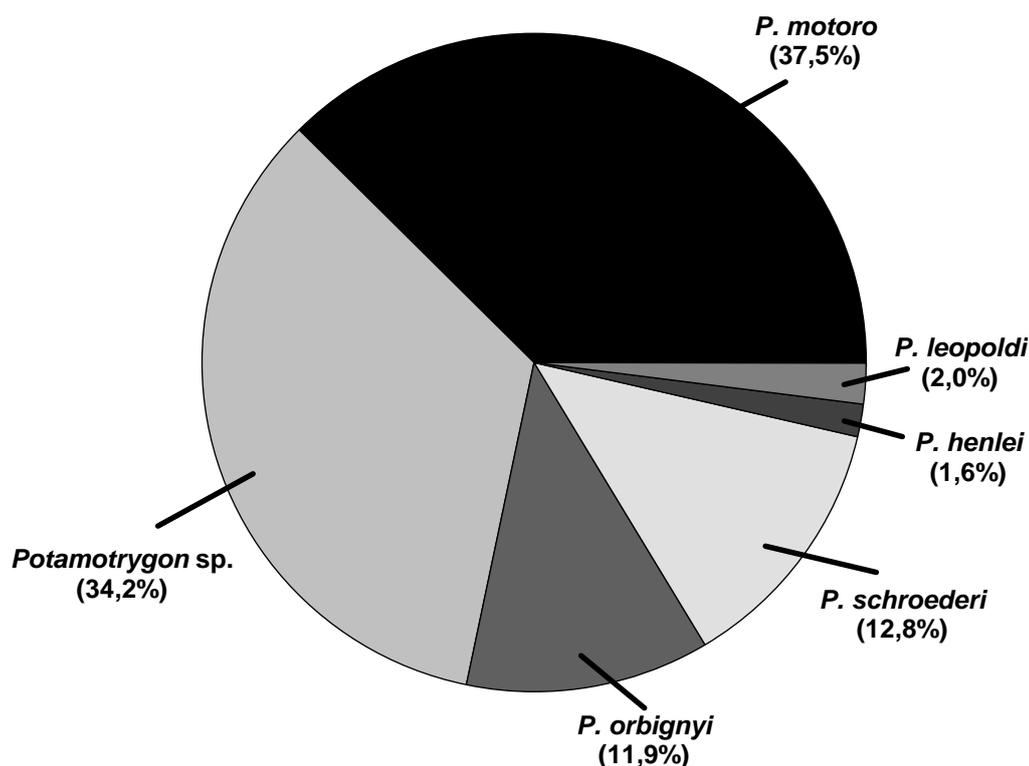


Figura 3. Percentual das espécies de Potamotrygonidae provavelmente capturadas da natureza para fins de ornamentação (percentual de captura espécie-específica foi baseado nos dados estimados a partir da Tabela 2).

Antes de 1998, não havia regulamentação específica sobre a exploração para fins ornamentais dos potamotrigonídeos. As arraias eram exportadas ilegalmente. O Estado do Amazonas foi pioneiro ao regulamentar a exploração de arraias de água doce. Mas, somente em 1998 foi estabelecida a primeira portaria federal (Portaria IBAMA N° 022/98), e subseqüentemente duas novas legislações regulamentaram o ordenamento deste recurso biológico. Em todas elas adotou-se um sistema de cota/espécie (ver Tabela 1). As autorizações foram periodicamente renovadas, e se for considerado que todas as empresas de exportação utilizaram suas cotas, teoricamente quase 110 mil neonatos e/ou juvenis de arraias foram exportadas legalmente durante a vigência dessas legislações entre os anos de 1998 a 2006 (Tabela 2). Neste período, os principais destinos das arraias foram para os aquários de Taiwan, Japão, Alemanha e Estados Unidos².

²www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CConferencia%5CDocumentos/2.ppt

Tabela 1. Número de exemplares/espécie de Potamotrygonidae permitidos para exportação conforme legislações (portarias e instrução normativa) do IBAMA para exportação de arraias de água doce para fins de ornamentação.

Espécies/Regulamentação	Port. N° 22/98	Port n.º 36/2003	IN n.º 27/2005	IN n.º 204/2008¥
<i>Potamotrygon motoro</i>	5.000	5.500	3.900	5.200
<i>Potamotrygon</i> sp.	5.000	5.000	3.000	6.000
<i>P. orbignyi</i>	1.500	2.000	1.200	2.400
<i>P. schroederi</i>	2.000	1.500	300	1.000
<i>P. henlei</i>	*	1.000	600	1.000
<i>P. leopoldi</i>	*	1.000	1200	5.000
Total	13.500	16.000	10.200	20.600

* Espécies que não foram listadas no Art. 1º da Portaria N° 22/98 de 18 de fevereiro de 1998.

¥Instrução Normativa em vigor até a realização deste estudo. Esta IN permite a exploração (captura e comercialização) de arraias para fins de ornamentação para as safras 2008-2009.

A Instrução Normativa do IBAMA (IN 118 de 19 de setembro de 2006) proibiu a exportação de arraias pelo Brasil. Embora na prática isto significa: (i) aumento do comércio ilegal; (ii) e super-valorização das espécies endêmicas e de padrão atrativo para o mercado internacional. Mesmo durante o período de vigência das legislações específicas, o comércio ilegal de potamotrigonídeos encontrou uma oportunidade para exportar “legalmente” espécies valiosas e não incluídas na lista de espécies permitidas. Por exemplo, ARAÚJO (2001) relata que as espécies *Potamotrygon henlei* e *P. leopoldi* representavam 6 e 26%, respectivamente das arraias de água doce exportada pelo Estado do Amazonas. Estas duas espécies são endêmicas do Estado do Pará. *P. henlei* é endêmica da bacia do Rio Tocantins, enquanto *P. leopoldi* é somente capturada na bacia do Rio Xingu. Estas espécies só foram incluídas na lista de espécies para exportação no ano de 2003, a partir da publicação da Portaria IBAMA N° 032/2003.

Outro fato importante, é que duas espécies novas do gênero *Potamotrygon* (“pretinha” P14-Itaituba e arraia Jabuti) endêmicas da bacia do Rio Tapajós estão entre as mais valiosas no comércio internacional de arraias de água doce. Estas espécies não foram incluídas nas cotas anuais autorizadas pelo IBAMA. Provavelmente ainda estão sendo comercializadas ilegalmente. A clandestinidade tem efeito imediato sobre o valor do produto no comércio internacional. Por isso, um exemplar da arraia denominada de “P14-Itaituba” foi cotada em torno de € 1.500,00 no mercado

internacional. Como estas espécies podem ter sido exportadas? Parte desta pergunta pode ser respondida pela dificuldade de identificação dos potamotrigonídeos. Identificar uma espécie é tarefa árdua até mesmo para especialistas, e os motivos pelos quais foram relatados anteriormente. Sob tais condições, P14-Itaituba pode ser simplesmente denominada de *Potamotrygon* aff. *leopoldi* ou *P.* aff. *henlei*, já que o padrão de coloração é compartilhado entre estas espécies, enquanto, a arraia-jabuti pode ter sido considerada uma “variante” de *P. motoro* ou mesmo de *Potamotrygon* sp. (arraia cururu).

A Instrução Normativa do IBAMA em vigor até a realização deste estudo (IBAMA IN n. 204 de 22 de outubro de 2008) permite a captura, comercialização e exportação das 6 espécies de potamotrigonídeos listadas na IN Nº.27/2005 por um ano (safra 2008/2009). A cota global permite a captura de 20.600 animais nesta safra, i.é, quase 30% superior à cota permitida na Portaria 036/2003. Esta nova IN aumentou em 5 vezes a cota anual para a venda de *Potamotrygon leopoldi*, e em 1,2 vezes a cota de *Potamotrygon* sp. em relação à cota anual da Portaria 036/2003. É importante mencionar que as arraias do Rio Tapajós (“pretinha”-P14 Itaituba e jabuti) não constarão nesta nova permissão do IBAMA. Provavelmente, estas espécies serão incluídas nas novas solicitações das cotas a partir de 2009. No entanto, para alguns pesquisadores, a ausência de dados biológicos para estas espécies requer medidas cautelares para que possam ser incluídas nas próximas cotas anuais. Por outro lado, a ausência dessas espécies pela nova IN do IBAMA sugere a manutenção dos mesmos problemas relacionados à ilegalidade já elencados anteriormente, porém, com fortes evidências que a arraia “pretinha” P14-Itaituba poderá ser exportada dentro da cota de *P. leopoldi* (5.000/ano), enquanto a arraia jabuti continuará a ser exportada dentro da cota de *P. motoro* (5.200/ano) ou *Potamotrygon* sp. (\approx *Potamotrygon* cf. *histris*, 6.000/ano), ou mesmo *P. orbigny* (2.400/ano). É importante mencionar que *P. orbigny* é extremamente sensível ao manejo e tem pouco valor comercial no mercado internacional.

Um importante problema para a biologia da conservação das arraias de água doce é que o número total de indivíduos exportados legalmente não traduz o número total de arraias retiradas das áreas de pesca. Por exemplo, quando se contabilizam as taxas de mortalidade espécie-específica durante o transporte e a taxa de rejeição sobre as cotas/espécies. O total de arraias capturadas na natureza supera os 160 mil

exemplares ao longo dos anos em que a exportação foi legalizada (Tabela 3). Além disso, é bem provável que este número ainda possa estar subestimado, pois neste cálculo não foram incluídas as taxas de mortalidade pós-captura durante o período de quarentena nas áreas de pesca, nos tanques dos intermediários e dos exportadores. Segundo ARAÚJO et al. (2005) a taxa de mortalidade pós-captura é espécie-específica e a taxa de rejeição nas áreas de captura oscilava entre 30 a 42% do total de arraias comercializadas. Estes autores estimaram que a taxa de mortalidade pós-captura para as espécies capturadas no Rio Negro variam de 2 a 12%, sendo que *P. schroederi* (10-12%) > *P. orbignyi* (8-10%) = *P. motoro* (8-10%) > *Potamotrygon* sp. (2-5%). Taxas de mortalidade tão elevadas representam grandes problemas para ações conservacionistas. Nesse contexto, o conhecimento prévio sobre a biologia básica das espécies, tais como estudos sobre efeito do pH da água e do material nitrogenado de excreção sobre os processos osmorregulatórios podem servir de subsídios teóricos para o desenvolvimento de técnicas de manejo mais apropriadas para cada uma das espécies visando reduzir as taxas de mortalidades durante o transporte.

Tabela 2. Número total de Potamotrygonidae exportados foi calculado a partir das safras durante a vigência das legislações do IBAMA, considerando que todas as empresas de exportação de peixes ornamentais utilizaram suas cotas.

Potamotrygonidae	1998-2003* Port. Nº 22/98	2003-2005 Port. Nº 36/2003	2005-2006 IN Nº 27/2005	Total/espécie
<i>P. motoro</i>	25.000	11.000	3.900	39.900
<i>Potamotrygon</i> sp.	25.000	10.000	3.000	38.000
<i>P. orbignyi</i>	7.500	4.000	1.200	12.700
<i>P. schroederi</i>	10.000	3.000	300	13.300
<i>P. henlei</i>	⊙	2.000	600	2.600
<i>P. leopoldi</i>	⊙	2.000	1200	3.200
Total/safras/regul	67.500	32.000	10.200	109.700

* Inicialmente regulamentada pela Portaria Nº 22/98 com validade de 1 ano, e depois mantida por Portarias da Executiva do IBAMA Amazonas; ⊙= proibida para exportação.

Com tanto indivíduos removidos da natureza, não se sabe qual foi o impacto da pesca ornamental sobre as populações da condrofauna? Segundo ARAÚJO et al. (2004a), os dados de CPUE indicam que esta atividade não tem afetado as populações de *Potamotrygon* sp., *P. orbignyi* e *P. motoro* do Rio Negro. Alguns pesquisadores têm argumentado que esta modalidade de pesca das arraias incide somente sobre indivíduos neonatos e juvenis que morreriam naturalmente e, portanto com pouco ou

nenhum efeito sobre as populações de elasmobrânquios capturados com propósitos para o aquarismo (ARAÚJO, 2001; CHARVET-ALMEIDA & ARAÚJO, 2002; ARAÚJO, 2004; ARAÚJO, 2005). No entanto, este argumento não tem base científica para sustentá-lo, uma vez que, atualmente não se conhecem os estoques naturais ou a curva de sobrevivência natural das espécies de potamotrigonídeos.

Tabela 3. Estimativa das principais espécies de Potamotrygonidae retiradas da bacia Amazônica durante a vigência das legislações que regulamentavam a exportação de arraias de água doce para fins ornamentais. Estes valores foram calculados a partir dos dados da Tabela 1 onde foram incluídas as taxas de mortalidade espécie-específica durante o transporte (Araújo, 2005) e a taxa de rejeição pós-captura (Araújo, 2004).

Espécies	1998-2003* Port. Nº 22/98	2003-2005 Port. Nº 36/2003	2005-2006 IN Nº 27/2005	Total/ espécie
<i>P. motoro</i>	39.050	15.730	5.577	60.357
<i>P. sp.</i>	37.275	13.650	4.095	55.020
<i>P. orbignyi</i>	11.715	5.720	1.716	19.151
<i>P. schroederi</i>	15.904	4.368	437	20.709
<i>P. henlei*</i>	⊙	2.000	600	2.600
<i>P. leopoldi*</i>	⊙	2.000	1200	3.200
Total	103.944	43.468	13.625	161.037

⊙= proibida para exportação.

* As taxas de mortalidade e de rejeição não são conhecidas, por isso, para efeito de cálculo foram mantidas apenas os valores estimados de arraias exportadas ao longo das safras/portarias regulamentando a exportação.

O comércio de peixes ornamentais é uma atividade bem consolidada. Algumas espécies são extremamente valorizadas no mercado internacional. As lojas de aquarismo exibem na Internet os preços, disponibilidade e origem das arraias (Apêndice IV). Animais cultivados geralmente têm cotação inferior àqueles capturados na natureza. Animais cuja exportação é ilegal também são mais valorizados do que aqueles com comércio legal. Além disso, matrizes (fêmeas adultas reprodutivas) são muito mais valiosas que jovens. Ressalte-se que a IN do IBAMA nº 027/2005 tenha proibido a exportação de matrizes.

Nos dias de hoje, se forem considerados apenas os número total de arraiais de água doce comercializadas legalmente durante as 8 safras, o movimento geraria cerca de US\$ 17 milhões no mercado internacional. Se considerarmos os dados do IBAMA-NTPO³ sobre o valor individual/espécie, os exportadores de peixes ornamentais no Brasil apenas movimentaram <3% desse valor. Se levamos em conta os custos operacionais, fiscais, mão-obra e financiamento de pesquisa, entre outros encargos, torna-se evidente que o comércio de arraia de água doce não é um mercado lucrativo. Fica difícil explicar porque as arraiais sempre fizeram parte do mercado de peixes ornamentais para exportação. Talvez isso não seja objeto de investigação científica. Para muitos pesquisadores, a venda das arraiais estimula o comércio das demais espécies comercializadas. O cardinal (*Paracheirodon axelrodi*) é o teleósteo do Rio Negro mais comercializado no mercado internacional e tem seu preço contado a US\$ 2,95/unidade. Assim sendo, o comércio dessa espécie movimentou cerca de US\$ 29,6 milhões somente no ano de 2003.

Se considerarmos toda a cadeia produtiva, os pescadores de peixes ornamentais receberam apenas cerca 0,3% do total movimentado pelo comércio internacional durante os anos das safras legalmente permitidas foram para os pescadores (Fig. 4). Na região de Barcelos, no Médio Rio Negro, a unidade de qualquer espécie de arraia é comercializada a R\$ 1,00 (Tabela 4). Se considerarmos a cotação do dólar em US\$ 1,00= R\$ 1,74 (28/03/2008), os pescadores de Barcelos receberam um pouco mais de R\$ 100 mil pelas arraiais coletadas durante todas as 8 safras (ou cerca de R\$ 12 mil/ano) legalmente permitidas (Tabela 4).

3. Degradação dos habitats

Esta falta de valorização dos pescadores de peixes ornamentais tem reflexo na sua relação para com as arraiais, além de fortalecer outras modalidades de pesca na região do Médio Rio Negro, tais como a pesca comercial para fins de consumo e a pesca esportiva. Todas elas têm provocado impactos diretos ou indiretos sobre as populações de elasmobrânquios de água doce e os conflitos de pesca têm sido documentados para as áreas de pesca de potamotrigonídeos no Médio Rio Negro (ARAÚJO et al., 2004a; DUNCAN, 2005).

³www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CConferencia%5CDocumentos/2.ppt

Tabela 4. Valor comercializado em US\$ por exemplar/espécie de Potamotrygonidae em cada segmento do setor produtivo.

Espécies	Área pesca em Barcelos-AM	Preços em US\$	
		Exportador Manaus-AM*	Mercado Internacional#
<i>Potamotrygon motoro</i>	0,57	9,37	125,00
<i>Potamotrygon</i> sp.	0,57	5,33	98,00
<i>P. orbignyi</i>	0,57	6,32	95,00
<i>P. schroederi</i>	0,57	3,66	325,00
<i>P. henlei</i>	-	VD	500,00
<i>P. leopoldi</i>	-	VD	500,00

IBAMA/AM-NTPO, 2005 (WWW.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CConferencia)

*Valores obtidos por meio de cotação em lojas de aquarismo com site na Internet (ver Apêndice IV); VD=valor desconhecido.

Tabela 5. Valores estimados (US\$) pelo faturamento em cada segmento do setor produtivo a partir da Tabela 4 durante o período de vigência das legislações 1998-2006, e considerando que todas as empresas utilizaram completamente suas cotas/espécie.

Espécies	Pescadores Barcelos-AM	Preços em US\$	
		Exportadores Manaus-AM	Mercado Internacional
<i>P. motoro</i>	22.743,00	373.863,00	4.907.500,00
<i>Potamotrygon</i> sp.	21.660,00	202.540,00	3.724.000,00
<i>P. orbignyi</i>	7.239,00	80.264,00	1.286.500,00
<i>P. schroederi</i>	7.581,00	48.678,00	4.322.500,00
<i>P. henlei</i>	-	NC	1.300.000,00
<i>P. leopoldi</i>	-	NC	1.600.000,00
Total	59.223,00	505.345,00	17.140.500,00

NC= não calculado

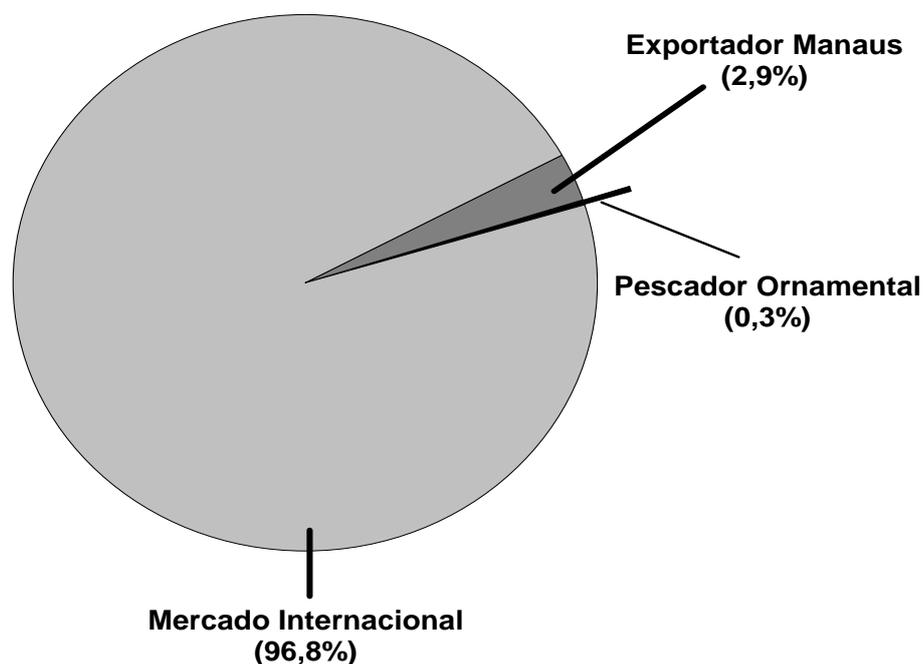


Figura 4. Percentual do faturamento pelo comércio de arraias de água doce (*Potamotrygonidae*) em cada um dos três segmentos do setor produtivo ao longo das 8 safras com exportação legalizada pelo IBAMA. O movimento no comércio internacional nesse período foi estimado em cerca de US\$ 17 milhões (ver apêndice IV para valor individual/espécie em dólares).

A região de Barcelos, no Médio Rio Negro, é cercada de belezas naturais cênicas, com imensas praias que aparecem durante a vazante do Rio Negro. Outro setor que tem atraído turistas para a região é a pesca esportiva. As principais espécies-alvo desse setor são os tucunarés (*Cichla spp.*), que é uma das principais fontes de proteínas para a população ribeirinha. Isto tem gerado um intenso conflito em várias comunidades ribeirinhas do Médio Rio Negro. Como a pesca esportiva tem como públicos-alvo os turistas que também usufruem das praias do Rio Negro, os empresários do setor estabeleceram “parcerias” com os pescadores para a chamada “operação limpeza das praias”. Esta prática foi adotada para evitar acidentes com as arraias. A operação “limpeza das praias” representa o aspecto mais perverso da pesca negativa dos potamotrigonídeos do Rio Negro. Entende-se como pesca negativa a remoção ou mutilação do indivíduo da população sem que haja aproveitamento econômico do recurso (COMPAGNO, 1990; ARAÚJO et al., 2004a). O relatório de ARAÚJO (2004) estimou que cerca de 20% das arraias capturadas na região do Médio

Rio Negro estavam mutiladas, e principalmente tiveram seu ferrão caudal removido. Segundo esta autora, cerca de 300 arraias foram mortas nas praias de Barcelos no início da vazante do Rio Negro no ano de 2001. A operação “limpeza das praias” foi mais intensa nas espécies cujos habitats preferenciais são os locais arenosos. Por isso, *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon orbignyi* foram as espécies que representaram mais de 50% das arraias mortas durante as operações “limpeza das praias” (ARAÚJO et al., 2004a). Atualmente, arraias ainda são encontradas mortas nas praias do Rio Negro (Fig. 5), indicando que esta modalidade de pesca negativa ainda é praticada na região de Barcelos.

A região do Médio Rio Negro é um ambiente de contradições. Enquanto as empresas de turismo investem na remoção das arraias como uma forma de ampliar o uso das praias, as empresas da construção civil retiram as areias das praias (Fig. 6). Uma forma ainda mais degradante, pois afeta o ecossistema como um todo.

De maior impacto são as mega-construções na bacia Amazônica. Entre eles estão as hidrovias e as usinas hidrelétricas (UHEs). O potencial hidrelétrico da Amazônia é imenso. A idéia de que a Amazônia poderia se tornar uma província energética para o país surgiu pelo menos há três décadas (ANEEL, 1999). Embora necessárias, a construção de barragens hidrelétricas é um das atividades mais controversas, pois representam grandes problemas ambientais e sociais. Atualmente, cinco hidrelétricas estão em plena operação na Amazônia. No entanto, há uma lista de 79 barragens planejadas para a região (FEARNSIDE, 2005). As maiores UHEs estão projetadas para os rios Madeira, Tapajós e Xingu. Nestes rios, as UHEs poderão alterar a distribuição Zoogeográfica das espécies, especialmente no Rio Tapajós (Fig. 7) onde muitas espécies são endêmicas e que possui uma das condrofaunas mais desconhecidas. Em outras bacias, a construção de hidrelétricas alterou a distribuição geográfica de várias espécies de potamotrigonídeos. Por exemplo, a construção da UHE de Itaipu na bacia do Rio Paraná criou uma imensa planície de inundação fazendo desaparecer as barreiras naturais (Cachoeiras de Sete Quedas de Guaíra), com isso as espécies *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon cf. motoro* alcançaram o Alto Rio Paraná expandido suas áreas de ocorrências e colonizaram os rios Paranapanema e a boca do rio Tieté, no Estado de São Paulo (HADDAD Jr., 2005; GARRONE-NETO & HADDAD Jr., 2007). A densidade populacional de *P. aff. motoro* à jusante da UHE de Ilha Solteira, Alto Rio Paraná (Estado de São Paulo) já inspira

cuidados. Em recente campanha naquela localidade foram coletados seis indivíduos (incluindo adultos reprodutivos) logo abaixo da barragem, no paredão de concreto da UHE (Fig. 8). Há relatos de que alguns exemplares foram introduzidos à montante, no lago da UHE de Ilha Solteira nas áreas freqüentadas por banhistas. Como as arraias são peçonhentas, com células glandulares secretoras de toxinas próximas ao ferrão caudal (HADDAD Jr. et al., 2004), acidentes decorrentes da interação entre homem e arraias poderão se tornar freqüentes, pois os ribeirinhos ou banhistas dessas regiões desconhecem os perigos oferecidos pelos potamotrigonídeos.

Resumindo, os problemas acadêmicos e ambientais indicam que se nenhum plano de ação começar a agir, muitas das espécies de potamotrigonídeos na Amazônia desaparecerão sem que sejam conhecidas pela comunidade científica. Os agentes antrópicos são os mais diversos possíveis, os quais incluem pressão dos estoques populações pelas pescas comercial e ornamental, a pesca negativa estimulada pelo turismo e as futuras mega-construções planejadas para os grandes rios da Amazônia. As hidrovias e UHEs poderão se tornar os maiores problemas para os programas de conservação e manejo dos potamotrigonídeos.



Figura 5. Exemplares de *Potamotrygon* aff. *orbignyi* mortos, provavelmente durante a operação “limpeza das praias” no Médio Rio Negro, Amazônia Central.



Figura 6. As areias retiradas das praias do Arquipélago de Mariuá (Estado do Amazonas), habitats preferencial das espécies *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon* aff. *orbignyi* e *P. schroederi*.



Figura 7. Região de Cachoeiras de São Luís no Rio Tapajós, no município de Itaituba (Estado do Pará), ameaçada pela construção de uma UHE planejada para gerar 11 mega-watts de energia, principalmente para alimentar as máquinas das gigantescas mineradoras que exploram bauxita e calcário na região.



Figura 8. Registro de ocorrência de *Potamotrygon* cf. *motoro* (A) à jusante da UHE de Ilha Solteira (B), Alto Rio Paraná (Estado de São Paulo). Há relatos de introdução no lago à montante da UHE, situação potencialmente perigosa pois é uma área muito freqüentada pelos banhistas (C).

CONCLUSÕES FINAIS

Se comparados com a vasta literatura sobre teleósteos, elasmobrânquios marinhos ou eurialinos, os estudos sobre fisiologia osmorregulatória relacionados à interação organismo-ambiente das arraias de água da família Potamotrygonidae são relativamente escassos. Os poucos estudos sobre osmorregulação dos potamotrigonídeos usualmente limitam-se às medidas dos parâmetros osmóticos do plasma. Porém, até o presente momento, não existe qualquer estudo sobre morfologia funcional das brânquias ou sobre os aspectos osmorregulatórios relacionados à natureza da interação organismo-ambiente de potamotrigonídeos coletados *in situ*.

Portanto, as principais conclusões deste estudo foram:

- As variações espaciais nas características físicas e químicas das águas dos rios Amazonas, Negro e Tapajós se devem às descargas dos afluentes (e das regiões geológicas) que abastecem o canal principal. Portanto, embora heterogêneos longitudinalmente o Rio Amazonas, Rio Negro e Rio Tapajós conservam características físicas e químicas peculiares ao tipo de água onde são classificados: água branca, preta e clara, respectivamente;
- As variáveis físicas e químicas das águas agem como barreiras hidrológicas que delimitam a distribuição de várias espécies de potamotrigonídeos. Por exemplo, a influência salina no canal Sul do estuário do Rio Amazonas determina o limite zoogeográfico para distribuição das espécies do gênero *Potamotrygon* até a Ilha de Colares, na região Baía de Marajó;
- Os estudos sobre a morfologia funcional das brânquias das arraias de água de doce ressaltam cinco características interessantes peculiares à

família Potamotrygonidae: a) uma ou mais protuberâncias (constituídas de tecido conjuntivo mucoso) localizadas em cada filamento branquial; b) várias camadas celulares no epitélio branquial que contém material mucoso (alcian blue-PAs positivas), exceto nas células mais basais; c) células pavimentosas que possuem numerosos grânulos subapicais contendo mucosubstâncias; d) grandes células mucosas quando comparadas às outras células epiteliais; e) numerosas células cloretos no espaço interlamelas, e especialmente em *Potamotrygon* sp. estas células organizam-se em complexos multicelulares, sendo até o presente considerada uma autapomorfia dentro do grupo;

- A atividade da bomba eletrogênica Na^+/K^+ -ATPase está intimamente relacionada ao número de células cloretos presentes no epitélio branquial, sendo expressiva no quarto arco branquial que nos demais;
- Os teores dos íons e de uréia, bem como os valores de osmolalidade (no plasma e fluido perisceral) de várias espécies de potamotrigonídeos estão relacionados às características físicas e químicas dos habitats, sendo geralmente mais elevados nas espécies que vivem no Rio Amazonas que no Rio Negro, exceto para os níveis de atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal, pois estão relacionados aos mecanismos ativos de absorção de íons da água e reabsorção renal, principalmente nos habitats considerados altamente diluídos como o Rio Negro;
- Os mecanismos osmorregulatórios da arraia *Potamotrygon* sp. (arraia cururu) indicam uma tolerância limitada às águas do Rio Branco, pois a exposição em curto prazo revelou desequilíbrio iônico caracterizado pela perda de Na^+ , e principalmente de Cl^- ;
- *Paratrygon aiereba*, uma espécie de ampla distribuição geográfica na bacia Amazônica, possui a capacidade para osmorregular em diferentes habitats aquáticos com diferentes características físicas e químicas;
- A pesca ornamental, a pesca esportiva e a pesca comercial para fins de consumo constituem-se nos principais conflitos de interesses (entre população ribeirinha, setor produtivo e órgãos públicos de fiscalização) dentro do cenário da biologia da conserção dos potamotrigonídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. P. **Pesca, policromatismo e aspectos sistemáticos de *Potamotrygon scobina* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) da região da Ilha de Colares – Baía de Marajó – Pará.** Dissertação de Mestrado. PPG-Zoologia, MPEG/UFPa, Belém, 2003.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F., VAL, A. L. & WALKER, I. Long- and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In **Biology of Tropical Fishes** (VAL, A. L. & ALMEIDA-VAL, V. M. F. eds), pp.185-203, 1999. Manaus: INPA.
- ANDERSON, W.G.; TAYLOR, J.R.; GOOD, J.P.; HAZON, N. & GROSELL, M. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comparative Biochemistry Physiology A*, v. 148, p. 3-13, 2007.
- ANEEL, BRASIL. s/d. **Sistemas Georeferenciados de Interesse dos Setores de Energia e Hidrologia. Bacia 1.** Sistema de Estatísticas e Informações Hidrológicas (SIH)/Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), Brasília, DF, 1999. (CD ROM).
- ARAÚJO, M.L.G. **Biologia reprodutiva e pesca de *Potamotrygon* sp (Chondrichthyes – Potamotrygonidae) no Médio Rio Negro, Amazonas.** Manaus, 164p. Dissertação (mestrado)-PPG-BTRN-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas (INPA/FUA), 1998.
- ARAÚJO, M.L. **Plano de monitoramento de arraias de água doce – Convênio IBAMA-AM/ACEPOAM.** 29 p., 2001.
- ARAÚJO, M.L. **Resultados do monitoramento da pesca de arraias de água doce utilizadas como peixe ornamental no Médio rio Negro.** Relatório Técnico do IBAMA nº 04. 42 p., 2004.
- ARAÚJO, M. L. G.; CHARVET-ALMEIDA, P. & ALMEIDA, M. P. Conservation status of freshwater stingrays (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon. In **Biology and Conservation of Elasmobranchs: Symposium Proceedings** (VAL, A. L.; RANDAL, D. J. & McKINLEY, D. Eds). VI International Congress on the Biology of Fish, American Fisheries Society (Physiology Section), Manaus, Hotel Tropical, p. 49 – 59, 2004b.
- ARAÚJO, M.L.G., CHARVET-ALMEIDA, P., ALMEIDA, M.P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. *Information Document AC20*, v. 8, p. 1-6, 2004a.
- ARAÚJO, M.L. **Plano de monitoramento de arraias de água doce – Rio Negro, Estado do Amazonas.** Relatório Final do IBAMA, 100 p., 2005.
- AUCOUR, A. M., TAO, F. X., MOREIRA-TURCQ, P., SEYLER, P., SHEPPARD, S. & BENEDETTI, M. F. The Amazon river: behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. *Chem. Geology*, v. 197, p. 271-285, 2003.

- BARTELS, H. & POTTER, I.C. Cellular composition and ultrastructure of the gill epithelium of larval and adult lampreys Implications for osmoregulation in fresh and seawater. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, p. 3447-3462, 2004. doi:10.1242/jeb.01157.
- BERMINGHAM, E., MARTIN, A.P. Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecology*, v. 7, p. 499–518, 1998.
- BITTNER, A. & LANG, S. Some aspects of the osmoregulation of Amazonian freshwater stingrays (*Potamotrygon hystrix*). I. Serum osmolality, sodium and chloride content, water content, hematocrit, and urea level. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 67A, p. 9-13, 1980.
- BURGER, J.W. & HESS, W.N. Function of the rectal gland in the spiny dogfish. *Science*, v. 131, p. 670–671, 1960.
- BUTLER, P. Respiratory system. In **Sharks, skates, and rays. The biology of elasmobranch fish** (HAMLETT, W.C., ed). Chigago: Johns Hopkins University Press, p.174-196, 1999.
- CARVALHO, M.R.; LOVEJOY, N.R. & ROSA, R.S. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** (REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 22–28, 2003.
- CHARVET-ALMEIDA, P. **Ocorrência, biologia e uso das raias de água doce na Baía de Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. Dissertação de Mestrado. PPG-Zoologia, MPEG/UFPa, Belém, 2001.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G. **Informações Científicas Complementares Referentes às Espécies de Arraias de Água Doce, Correspondentes a Quota Compartilhada Amazonas-Pará e a Quota Pará Segundo Portaria IBAMA em Elaboração Para o Estabelecimento de Quotas para Exportação de Exemplares de Arraias de Água Doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. Relatório IBAMA. 12 p. 2002.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ROSA, R. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. *Shark News*, v. 14, p. 1-2, 2002.
- CHARVET-ALMEIDA, P., ARAÚJO, M. L. G. & ALMEIDA, M. P. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, v. 34, p. 165-171, 2005a.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ROSA, R.; ALMEIDA, M.P. *Paratrygon aiereba*: a multi-species complex (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Abstract Book, Joint meeting of ichthyologists and herpetologists, Florida, USA. p. 92, 2005b.
- CHARVET-ALMEIDA, P. **Historia Natural e Conservação das Raias de Água Doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) no Médio Rio Xingu, Área de Influência do Projeto Hidrelétrico de Belo Monte (Pará, Brasil)**. Tese. Universidade Federal da Paraíba, 2006.

- CHOE, K.P. & EVANS, D.H. Compensation for hypercapnia by a euryhaline elasmobranch: effect of salinity and roles of gills and kidneys in fresh water. *J. Physiol. Zool.*, v. 297A, p. 52-63, 2003.
- CHOE, K.P., VERLANDER, J.W., WINGO, C.S. & EVANS, D.H. A putative H^+/K^+ -ATPase in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*: primary sequence and evidence for expression in gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 287, p. R981–R991, 2004.
- CHOE, K.P., EDWARDS, S.L., CLAIBORNE, J.B. & EVANS, D.H. The putative mechanism of Na^+ absorption in euryhaline elasmobranchs exists in the gills of the stenohaline marine elasmobranch, *Squalus acanthias*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 146A, p. 155-162, 2007.
- CLAIBORNE, J.B.; WALTON, J.S. & COMPTON-McCULLOUGH, D. Acid-base regulation, branchial transfers and renal output in a marine teleost fish (the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*) during exposure to low salinity. *Journal Experimental Biology*, v. 193, p. 79-95, 1994.
- CLAIBORNE, J.B., EDWARDS, S.L. & MORRISON-SHETLAR, A.I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.*, v. 293, p. 302–319, 2002.
- COMPAGNO, L.J.V. Shark exploitation and conservation. NOAA Technical Report NMFS, v. 90, p. 391-414, 1990.
- COMPAGNO, L. & COOK, S. F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In **The Biology of Freshwater Elasmobranchs, a Symposium to Honor Thomas B. Thorson** (OETTINGER M. I., ZORZI, G.D., eds.), pp. 62-90, 1995. *Journal Aquaculture & Aquatic Sciences*.
- CORDEIRO, C. A. **Estudo da salinização no estuário do Rio Pará no trecho Belém-Mosqueiro**. Dissertação de Mestrado, PPG-Geociências, UFPa, Belém, 1987.
- CORTÉS, E. Life history patterns and correlations in sharks. *Reviews in Fisheries Science*, v. 8, p. 299-344, 2000.
- DE JAGER, S. & DEKKERS, W.J. Relations between gill structure and activity in fish. *Neth. J. Zool.*, v. 25, p. 276-308, 1975.
- DEYNAT, P. *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de reies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, Potamotrygonidae). *Biologie et Pathologie Animale/Animal Biology and Pathology*, C.R. Biologies, v. 329, p. 483-493, 2006.
- DUNCAN, W.P. Os conflitos da pesca e a pesquisa com as arraias de água doce na Amazônia. *Jornal do Biólogo 4ª Região*, n. 39, p. 6-7 (janeiro-março), 2005.
- EMERY, S.H. & SZCZEPANSKI, A. Gill dimensions in pelagic elasmobranch fishes. *Biol. Bull.*, v. 171, p. 441-449, 1986.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M. & POTTS, W.T.W. Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.*, 283: 641–652, 1999.
- EVANS, D. H., PIERMARINI, P. M. & CHOE, K. P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation and nitrogen excretion. In **Biology of sharks and their relatives** (CARRIER, J. C., MUSICK, J. A. & HEITHAUS, M. R., eds.), pp. 247-268, 2004. Boca Raton, FL: CRC Press.

- 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 wastes. *Physiology Review* 85, 97-177, 2005.
- FEARNSIDE, P. M. Deforestation in Brazilian Amazonia: History, rates and consequences. *Conservation Biology*, v. 19, p. 680-688, 2005.
- FERNANDES, M.N. & PERNA-MARTINS, S.A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zoologica*, Stockholm, v. 83, p. 321-328, 2002.
- FERNANDES, M.N., MORON, S.E. & SAKURAGUI, M.M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In **fish respiration and environment**. (FERNANDES, M.N., RANTIN, F.T., GLASS, M.L. & KAPOOR, B.G. eds.), p. 93-120. Enfield: Science Publishers, 2007.
- FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, p. 375-388, 1925.
- FOWLER, S.L.; REED, T.M.; DIPPER F.A. Elasmobranch biodiversity, conservation and management: Proceedings of the International Seminar and Workshop, Sabah, Malasia, July 1997. Gland & Cambridge: IUCN SSC Shark Specialist Group, 2002.
- FREDERICO, R. G. **Filogenia e conservação de *Paratrygon aiereba* Dumeril (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na região Amazônica**. Dissertação de Mestrado, PPG-BTRN, Manaus, INPA/UFAM. 2006.
- FURCH, K. Water chemistry of the Amazon Basin: the distribution of chemical elements among freshwater. In: **The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty Tropical river and its basin** (Eds. SIOLI, H.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 167-200, 1984.
- FURCH, K., JUNK, W. J. & KLINGE, H. Unusual chemistry of natural waters from the Amazon region. *Acta Cientifica Venezuelana*, v. 33, p. 269-273, 1982.
- GARRONE-NETO, D. & HADDAD Jr., V. Ocorrência de arraias fluviais (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) na região do baixo Paranapanema, Sudoeste do Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, n. 88 (Setembro), 2007.
- GREGORY, T. R. & QUINN, P. T. Horizontal and vertical movements of adult steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss*, in the Dean and Fisher Channels, Britain Columbia. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, v. 149, p. 1963-1968, 1990.
- GERST, J. W. & THORSON, T. B. Effects of saline acclimation on plasma electrolytes, urea excretion, and hepatic urea biosynthesis in a freshwater stingray, *Potamotrygon* sp. Garman, 1877. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 56A, p. 87-93, 1977.
- GIBBS, R. J. Water chemistry of the Amazon River. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 36, p. 1061-1066, 1972.

- GONZALEZ, R. J. & WILSON, R. W. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acid Rio Negro. *Journal of Fish Biology*, v. 58, p. 1680-1690, 2001.
- GONZALEZ, R. J., PREEST, M. Mechanisms for exceptional tolerance of ion-poor, acidic waters in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). *Physiol. Biochem. Zool.*, v. 72, p. 156–163, 1999.
- GONZALEZ, R. J., 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. *Physiol. Zool.*, v. 70, p. 428–435, 1997.
- GONZALEZ, R.J.; WILSON, R.W.; WOOD, C.M.; PATRICK, M.L. & VAL, A.L. Diverse strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 75, p. 37-47, 2002.
- GRIFFITH, R. W., PANG, P. K. T., SRIVASTAVA, A. K & PICKFORD, G. E. Serum composition of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and diluted sea water. *Biology Bulletin*, v. 144, p. 304-320, 1973.
- HADDAD Jr., V. Ocorrência de arraias da família Potamotrygonidae no rio Paraná e relato da presença no rio Tietê: resultados preliminares. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, n. 78 (Março), 2005.
- HADDAD Jr., V., GARRONE NETO, D., PAULA NETO, J. B., MARQUES, F. P. L. & BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects and some enzymatic activities of the venom based on 84 envenoming in humans. *Toxicon*, v. 48, p. 287-294, 2004.
- HAMMERSCHLAG, N. Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, v. 39, n. 3, p. 209-228, 2006.
- HANDY, R.D. & EDDY, F.B. The absence of mucus on the secondary lamellae of unstressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.*, v. 38, p. 153-162, 1991.
- HAZON, N.; WELLS, A.; PILLANS, R.D.; GOOD, J.P.; ANDERSON, W.G. & FRANKLIN, C.E. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 136, p. 685-700, 2003.
- HOORN, C. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle–Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, v. 112, p. 187–238, 1994.
- HUBERT, N., RENNO, J-F. Historical Biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* v. 33, p. 1414-1436, 2006.
- HUGHES, G.M. General anatomy of the gills. In **Fish physiology** (HOAR, W.S. & RANDALL, D.J., ed.) Orlando: Academic Press v. XA, p. 1–72, 1984.
- HUGHES, G.M. & MORGAN, M. The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biology Review*, v. 48, p. 419-475, 1973
- HUGHES, G.M., PEYRAUD, C., PEYRAUD-WAITZENEGGER, M. & SOULIER, P. Physiological evidence for the occurrence of pathways shunting blood away from the secondary lamellae of eel gills. *J Exp Biol.*, v. 98, p. 277–288, 1982.

- HUGHES, G.M., I, S.F. & PIIPER, J. Morphometry of the gills of the elasmobranch *Scyliorhinus stellaris* of varied body size. J. exp. Biol., v. 121, p. 27-42, 1986.
- HWANG, P.P. Multicellular complex of chloride cells in the gills of freshwater teleosts. J. Morphol., v. 196, p.15–22, 1988.
- HYODO, S.; KATOH, F.; KANEKO, T. & TAKEI, Y. A facilitative urea transporter is localized in the renal collecting tubule of the dogfish *Triakis scyllia*. Journal of Experimental Biology, v. 207, p. 347-356, 2004.
- IBAMA. **Reunião para revisão da Portaria IBAMA nº 36/03**. Relatório CGREP. (NOTTINGHAM, M.; VERCILLO, U. Relatores). Brasília, DF. Junho, 2005.
- IP, Y. K., TAM, W. L., WONG, W. P., LOONG, A. M., HIONG, K. C., BALLANTYNES, J. S. & CHEW, S. F. A comparison of the effects of environmental ammonia exposure on the Asian freshwater stingray *Himantura signifer* and the Amazonian freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. Journal of Experimental Biology, v. 206, p. 3625-3633, 2003.
- JAISSER, F. & BEGGAH, A. The nongastric H⁺/K⁺-ATPases: molecular and functional properties. Am. J. Physiol. Renal Physiol., v. 276, p. F812–F824, 1999.
- JANECH, M. G. & PIERMARINI, P. M. Renal water and solute excretion in the Atlantic stingray in fresh water. Journal of Fish Biology, v. 61, p.1053-1057, 2002.
- JANECH, M.G.; FRITZGIBBON, W.R.; CHEN, R.; NOWAK. M.K.; MILLER, D.H.; PAUL, R.V. & PLOTH, D.W. Molecular characterization of a urea transporter from the kidney of the Atlantic stingray. Am. J. Physiol., v. 284, p. 996-1005, 2003.
- JUNK, W. J. **The Central Amazon Floodplain: ecology of a pulsing system. Ecological Studies**, vol. 126. Springer, Amsterdam, 1997.
- KANEKO, T. & KATOH, F. Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost with seawater preference. Fisheries Science, v. 70, p. 723-733, 2004.
- KARAKATSOULI, N., TANARIS, K., BALASKAS, C. & PAPOUTSOGLU, S.E. Gill area and dimensions of gilthead sea bream. Journal of Fish Physiology, v. 69, p. 291-299, 2006.
- KATOH, F. & KANEKO, T. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established “time-differential double fluorescent staining” technique. J. Exp. Biol., v. 206, p. 4113–4123, 2003.
- KATOH, F., HYODO, S. & KANEKO, T. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. J. Exp. Biol., v. 206, p. 793–803, 2003.
- KOELZ, H.R. Gastric acid in vertebrates. Scand. J. Gastroenterol., v. 193, p. 2–6, 1992.
- KONHAUSER, K. O., FYFE, W. S. & KRONBERG, B. I. Multi-element chemistry of some Amazonian water and soils. Chemical Geology, v. 111, p. 155-175, 1994.

- KÜCHLER, I.L.; MIEKELY, N. & FORSBERG, B.R. A Contribution to the Chemical Characterization of Rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 11, p. 286-292, 2000.
- LACY, E. R. & REALE, E. Functional morphology of the elasmobranch nephron and retention of urea. In **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation** (WOOD, C. M. & SHUTTLEWORTH, T. J., eds.), pp. 107-146, 1995. San Diego: Academic Press.
- LASSO, C. A., RIAL, A. B. & LASSO-ALCALÁ, O. Notes on the biology of the freshwater stingray *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841) and *Pommatrygon orbignyi* (Castenau, 1855) (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in Venezuelan Ihanos. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, v. 2, p. 39-52, 1996.
- LAURENT, P. Gill internal morphology. In **Fish Physiology**, (HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. eds). Orlando, FL: Academic, p. 73–183, 1984.
- LÈVÊQUE, C.; MOUNOLOU, J.C. Biodiversity. Chichester: JohnWiley & Sons Ltd, 2003.
- LIN, Y.M.; CHEN, C.N.; YOSHINAGA, T.; TSAI, S.C.; SHEN, I.D. & LEE, T.H. Short-term effects of hyposmotic shock on Na⁺/K⁺ -ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 135, p. 489-497, 2003.
- LIN, C. H., TSAI, R. S. & LEE, T. H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138A, p. 287-295, 2004.
- LOMBARDI, J.; JONES, K.B.; GARRITY, C.A. & FILES, T. Chemical composition of uterine fluid in four species of viviparous sharks (*Squalus acanthias*, *Carcharhinus plumbeus*, *Mustelus canis* and *Rhizoprionodon terraenovae*). *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 105A, p. 91-102, 1993.
- LOVEJOY, N.R. Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zool. J. Linn. Society*, v. 117, p. 207-257, 1996.
- LOVEJOY, N. R., BERMINGHAM, E. & MARTIN, A. P. Marine incursion into South America. *Nature*, v. 396, p. 421-422, 1998.
- LOVEJOY, N. R. & ARAÚJO, M. L. G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Mol. Ecology*, v. 9, p. 259–268, 2000.
- LOVEJOY, N.R.; ALBERT, J.S. & CRAMPTON, W.G.R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 21, p. 5-13, 2006.
- LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERRERO, J., HORTON, B., MALABARBA, M.C.S.L., WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: **Phylogeny and classification of Neotropical fishes** (ed. MALABARBA, L. R., REIS, R. E., VARI, R. P., LUCENA, Z. M., LUCENA, C. A. S.), p. 13–48. Edipucrs, Porto Alegre, 1998.

- LYNDON, A.R. Method for measuring oxygen consumption in isolated perfused gills. *Journal of Fish Biology*, v. 44, p. 707-715, 1994.
- LYNDON, A.R. & BRECHIN, J.G. Evidence for partitioning of physiological functions between holobranchs: protein synthesis rates in flounder gills. *Journal of Fish Biology*, v. 54, p. 1326-1328, 1999.
- MARQUES, F. P. L. **Evolution of Neotropical freshwater stingrays and their parasites: taking into account space and time.** Tese PhD, University of Toronto.
- MARSHALL, W.S. & BRYSON, S.E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cell: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comp. Biochem. Physiology*, v. 119A, p. 97-106, 1998.
- MARSHALL, W.S., BRYSON, S.E., DARLING, P., WHITTEN, C., PATRICK, M., WILKIE, M., WOOD, C.M. & BUCKLAND-NICKS, J. NaCl transport and ultrastructure of opercular epithelium from a freshwater-adapted euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, v. 277, p. 23-37, 1997.
- MARTIN, A.P.; NAYLOR, G.J.P.; PALUMBI, S.R. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* v. 357, p. 153-155, 1992.
- MARTIN, R.A. Evolution and Zoogeography of freshwater elasmobranchs with notes on their conservation. In: **Biology of conservation of freshwater elasmobranchs** (MARTIN, A. & MACKINLEY, D. eds.). Int. Cong. Biol. Fish. Manaus: INPA, 2004.
- MARTIN, R.A. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs: a review. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, v. 85, p. 1049-1073, 2005.
- MATSUO, A. & VAL, A.L. Acclimation to humic substances prevents whole body sodium loss and stimulates branchial calcium uptake capacity in cardinal tetras *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) subjected to extremely low pH. *Journal of Fish Biology*, v. 70, p. 989-1000, 2007.
- McEACHRAN, J.D.; ASCHLIMAN, N. Phylogeny of Batoidea. In **Biology of sharks and their relatives** (CARRIER, J. C., MUSICK, J. A. & HEITHAUS, M. R., eds.), p. 79-113. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
- MITTAL, A.K., UEDA, T., FUJIMORI, O. & YAMADA, K. Histochemical analysis of glycoproteins in the epidermal mucous cells and sacciform cells of an Indian swamp eel *Monopterus albus* (Hamilton) (Synbranchiformes, Pisces). *Acta Histochem. Citochem.*, v. 27, p. 193-204, 1994.
- MOLINIER, M., GUYOT, J.-L., CALLEDE, J., GUIMARAES, V., OLIVEIRA, E., FILIZOLA, N. Hydrologie du bassin amazonien. In: **Environnement et développement en Amazonie brésilienne.** (Ed. They, H.). Publ. Berlin, Paris, pp. 24-41. 1997.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecology*, v. 12, p. 1855-1867, 2003.
- PERRY, S.F. Morphometry of vertebrate gills and lungs: a critical review. In: **Oxygen Transport in Biological Systems, Society for Experimental**

- Biology**, Seminar Series 51, (EGGINTON, S. & ROSS, H.F. eds.), London: Cambridge University Press. p 57-77, 1992.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gill of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiology*, v. 59, p. 325-344, 1997.
- PERRY, S.F. & FARRELL, A.P. Perfused preparation in comparative respiratory physiology. In **Techniques in comparative respiratory physiology: an experimental approach** (BRIDGES, C.R. & BUTLER, P.J., eds.), p. 223-257. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- PERRY, S.F., GOSS, G.G. & LAURENT, P. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, v. 70, p. 1775-1786, 1992.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater Lake Jesup of the St John River, Florida. *Physiol. Zoology*, v. 71, p. 553-560, 1998.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Effects of environmental salinity on Na⁺/K⁺ - ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis Sabina*). *J. Exp. Biology*, v. 203, p. 2957-2966, 2000.
- PIERMARINI, P.M. & EVANS, D.H. Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis Sabina*): effects of salinity and relation to Na⁺/K⁺ - ATPase. *J. Exp. Biology*, v. 204, p. 3251-3259, 2001.
- PIERMARINI, P.M., VERLANDER, J.W., ROYLAUX, I.E. & EVANS, D.H. Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 283, p. R983-R992, 2002.
- PILLANS, R.D. & FRANKLIN, C.E. Plasma osmolyte concentration and rectal gland mass of bull sharks *Carcharhinus leucas*, captured along a salinity gradient. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 138, p. 363-371, 2004.
- PINHEIRO, R. V. L. **Estudo hidrodinâmico e sedimentológico do estuário Guajará-Belém**. Tese Doutorado. PPG-Geociências, UFPa, Belém.
- PISAM, M. Membranous systems in the "chloride cell" of teleostean fish gill: their modifications in response to the salinity of the environment. *Anat. Rec.*, v. 200, p. 401-414, 1981.
- PISAM, M., BOEUF, G., PRUNET, P. & RAMBOURG, A. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *Am. J. Anat.*, v. 187, p. 21-31, 1990.
- RAMIREZ-GIL, H.; FELDBERG, E.; ALMEIDA-VAL. V.M.F. & VAL, A.L. Karyological, biochemical, and physiological aspects of *Callophrys macropterus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Solimões and Negro Rivers (Central Amazon). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1449-1458, 1998.
- RICKEY, 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. *Limnol. Oceanogr.*, v. 35, n. 2, p. 352-371, 1990.
- RINCON, G. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbignyi* (Castenau) (Elasmobranchii:**

- Potamotrygonidae) no Rio Paraná-Tocantins.** Tese Doutorado, Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2006a.
- RINCON, G. & CHARVET-ALMEIDA, P. O monitoramento da pesca ornamental de raias de água doce está sendo efetivo? Problemas e possíveis soluções nas esferas envolvidas. Elasmovisor, Novembro, 2006b. disponível em: <http://www.sbeel.org.br>.
- ROSA, R. S. *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 7, p. 425–437, 1990.
- ROSA, R.S.; CASTELLO, H.P.; THORSON, T.B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Copeia, n. 2, p. 447–458, 1987.
- ROSA, R. S.; CARVALHO, M. R. & WANDERLEY, C. A. *Potamotrygon boesemani* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae), a new species of Neotropical freshwater stingray from Surinam. Neotropical Ichthyology, v. 6 (n. 1), p. 1-8, 2008.
- SALATI, E. & VOSE, P. B. Amazon basin: a system in equilibrium. Science, v. 225, p. 129-138, 1984.
- SANTOS, U.M.; RIBEIRO, M.N.G. A hidroquímica do rio Solimões – Amazonas. Acta Amazonica, v. 18, n. 3-4, p. 145-172, 1988.
- SAROGLIA, M., TEROVA, G. & PRATI, M. Dissolved oxygen and Gill morphometry. In fish respiration and environment. (FERNANDES, M.N., RANTIN, F.T., GLASS, M.L. & KAPOOR, B.G. eds.), p. 167-190. Enfield: Science Publishers, 2007.
- SCOOT, G.R.; ROGERS, J.T.; RICHARDS, J.G.; WOOD, C.M. & SCHULTE, P.M. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. Journal Experimental Biology, v. 207, p. 3399-3410, 2004.
- SHUTTLEWORTH, T.J. Salt and water balance – extrarenal mechanisms. In: **Physiology of Elasmobranch Fishes** (SHUTTLEWORTH, T. J. Ed.) Berlin, Springer-Verlag, p. 171-199, 1988.
- SIBBING, F.A. & URIBE, R. Regional specialization in the oro-pharyngeal wall and food processing in the carp *Cyprinus carpio*. **Neth. J. Zool. Leiden**, v. 35, p. 377-422, 1985.
- SIOLI, H. The Amazon and its main effluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: **The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty Tropical river and its basin** (Eds. SIOLI, H.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 127-166, 1984.
- SMITH, C.P. & WRIGHT, P.A. Molecular characterization of an elasmobranch fish. Am. J. Physiol., v. 276, p. R622-626, 1999.
- SULIKOWSKI, J.A. & MAGINNISS, L.A. Effects of environmental dilution on body fluid regulation in the yellow stingray, *Urolophus jamaicensis*. Comparative Biochemistry and Physiology A, v. 128, p. 223-232, 2001.
- SULIKOWSKI, J.A.; TREBERG, J.R. & HOWELL, W.H. Fluid regulation and physiological adjustments in the winter skates, *Leucoraja ocellata*, following

- exposure to reduce environmental salinities. *Environmental Biology of Fishes*, v. 66, p. 339-348, 2003.
- TAM, W. L., WONG, W. P., LOONG, A. M., HIONG, K. C., CHEW, S. F., BALLANTYNE, J. S. & IP, Y. K. The osmotic response of the Asian freshwater stingray (*Himantura signifer*) to increased salinity: a comparison with marine (*Taeniura lymna*) and Amazonian freshwater (*Potamotrygon motoro*) stingrays. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 2931-2940, 2003.
- THOMÉ-SOUZA, M.J.F. & CHAO, N.L. Spatial and temporal variation of benthic fish assemblages during the extreme drought of 1997-98 (El Niño) in the middle rio Negro, Amazonia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 2, p. 127-136, 2004.
- THORSON, T. B. Freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp.: failure to concentrate urea when exposed to a saline medium. *Life Science*, v. 9, p. 893-900, 1970.
- THORSON, T.B. & GERST, J.W. Comparison of some parameters of serum and uterine fluid of pregnant, viviparous sharks (*Carcharhinus leucas*) and serum of their near-term young. *Comparative Biochemistry Physiology A*, v. 42, p. 33-40, 1972.
- THORSON, T. B., COWAN, C. M. & WATSON, D. E. *Potamotrygon* spp.: elasmobranchs with low urea content. *Science*, v. 158, p. 375-377, 1967.
- THORSON, T. B., WOOTON, R. M. & GEORGI, T. A. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Biology Bulletin*, v. 154, p. 508-516, 1978.
- THORSON, T.B.; LANGHAMMER, J.K. & OETINGER, M.I. Reproduction and development of the South American freshwater stingrays, *Potamotrygon circularis* and *P. motoro*. *Environ. Biol. Fishes*, v. 9, n. 1, p. 3-24, 1983.
- TOFFOLI, D. **História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica**. Dissertação de Mestrado. PPG-BTRN, INPA/UFAM, Manaus, 2006.
- TORRES, M. F. **Variação sazonal e espacial da estrutura de comunidades dos peixes demersais da foz dos rios Amazonas e Tocantins – PA (0°10' S – 2°30'N; 47°50'W – 50°30'W) – Brasil**. Dissertação Mestrado, PPG-Zoologia, MPEG/UFPA, Belém.
- TREBERG, J. R., SPEERS-ROESCH, B., PIERMARINI, P. M., IP, Y. K., BALLANTYNE, J. S. & DRIEDZIC, W. R. The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, p. 860-870, 2006.
- VENTURINI, G.; CATALDI, E.; MARINO, G.; PUCCI, P.; GARIBALDI, L. & BRONZI, P. Serum ions concentration and ATPase activity in gill, kidney and oesophagus of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces, Perciformes) during acclimation trials to fresh water. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 103A, p. 451-454, 1992.
- WILSON, J.M., MORGAN, J.D., VOGL A.W, & RANDALL D.J. Branchial mitochondria-rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comp. Biochem. Physiology*, v. 132A, p. 365-374, 2002.

- WOOD, C. M., MATSUO, A. Y. O., GONZALEZ, R. J., WILSON, R. W., PATRICK, M. L. & VAL, A. L. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwater of the Rio Negro. *J. Exp. Biology*, v. 205, p. 3039-3054, 2002.
- WOOD, C.M.; MATSUO, A.Y.O.; WILSON, R.W.; GONZALEZ, R.J.; PATRICK, M.L.; PLAYLE, R.C. & VAL, A.L. Protection by natural blackwater against disturbances in ions fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 12–27, 2003.
- WOOTTEN, R. The spatial distribution of *Dactylogyrus amphibotrium* on the gills of ruffe *Gymnocephalus cernua* and its relation to the relative amounts of water passing over the parts of the gills. *Journal of Helminthology*, v. 48, p. 167-174, 1974.

ANEXOS

APÊNDICE I.

Informações sobre os sítios de análise da água do Rio Amazonas (Maio/2007).

Sítios	GPS	Localidade	Distância (km)
1	S00°44'653"/W48°00'986"	S. Caet. Odivelas	0,0
2	S00°55'443"/W48°17'439"	Colares, PA	37,0
3	S01°14'872"/W48°24'288"	Outeiro, Belém	77,2
4	S01°13'200"/W48°33'288"	Cotijuba, PA	88,8
5	S01°30'971"/W48°31'105"	Foz r. Guamá	121,8
6	S01°30'051"/W48°37'412"	Barcarena, PA	133,8
7	S01°31'146"/W48°51'277"	Baía de Marajó	160,3
8	S01°37'252"/W49°07'531"	Baía de Marapatá	193,5
9	S01°38'195"/W49°16'572"	Ponta Negra, PA	210,4
10	S01°49'682"/W49°51'522"	Rio Pará	269,6
11	S01°49'342"/W49°46'507"	Currálinho, PA	278,9
12	S01°48'259"/W50°04'074"	Rio Pará	302,3
13	S01°47'336"/W50°19'524"	Furo de Breves	331,0
14	S01°40'304"/W50°36'471"	Estreito de Breves	365,0
15	S01°20'158"/W50°49'271"	Estreito de Breves	409,1
16	S01°07'676"/W51°10'785"	Estreito de Breves	458,1
17	S01°28'415"/W52°10'067"	--	577,7
18	S01°33'168"/W52°40'028"	Almeirim, PA	634,0
19	S01°45'561"/W53°04'030"	--	684,0
20	S01°58'336"/W53°58'230"	--	787,2
21	S02°00'031"/W54°01'774"	Monte Alegre	794,5
22	S02°24'129"/W54°19'829"	Santarém, PA	850,1
23	S02°16'000"/W54°46'915"	Santarém, PA	902,5
24	S01°58'530"/W55°23'561"	Óbidos, PA	977,7
25	S02°01'548"/W55°46'686"	--	1.021,0
26	S02°10'234"/W56°08'701"	Juruti, PA	1.064,8
27	S02°19'797"/W56°25'531"	--	1.100,6
28	S02°33'394"/W56°36'183"	Parintins, AM	1.132,5
29	S02°31'728"/W57°00'180"	--	1.177,1
30	S02°26'758"/W57°21'815"	--	1.218,2
31	S02°47'989"/W57°47'577"	--	1.287,6
32	S03°03'669"/W58°12'921"	--	1.342,7
33	S03°09'630"/W58°28'697"	Itacoatiara, AM	1.373,9
34	S03°13'957"/W58°35'512"	Ns. Sra. Graças	1.388,9
35	S03°14'729"/W58°57'173"	--	1.429,1
37	S03°13'526"/W59°02'878"	--	1.439,9
38	S03°08'857"/W59°23'616"	--	1.479,3
39	S03°04'202"/W59°36'450"	--	1.504,6
40	S03°04'391"/W59°40'182"	Encontro das águas	1.511,5
41	S03°04'443"/W59°40'415"	Encontro das águas	1.511,9
42	S03°04'623"/W59°40'985"	Encontro das águas	1.513,0
43	S03°04'391"/W59°41'736"	Encontro das águas	1.514,5
44	S03°06'776"/W59°50'887"	Encontro das águas	1.532,0
45	S03°08'364"/W59°55'808"	Manaus, AM	1.541,6

* Distância do estuário (Estuário Amazônico, sendo que o marco 0 km foi considerado o município São Caetano de Odivelas, PA).

Informações sobre os sítios de análise da água do Rio Amazonas (Maio/2008).

Sítios	GPS	Localidade	Distância (km)*
1	S00°44'653"/W48°00'986"	S. Caet. Odivelas	0,0
2	S00°55'445"/W48°18'300"	Colares, PA	21,0
3	S00°54'616"/W48°25'887"	Colares, PA	55,0
4	S01°30'716"/W48°30'909"	F. Guamá, Belém	136,0
5	S01°32'153"/W48°50'986"	Baía de Marajó	155,0
6	S01°38'443"/W49°17'439"	--	279,6
7	S01°49'872"/W49°46'288"	--	339,1
8	S01°47'200"/W50°19'288"	Furo Breves	376,0
9	S01°07'971"/W51°10'105"	Estreito Breves	436,8
10	S01°12'826"/W51°21'456"	--	526,6
11	S01°28'443"/W52°10'268"	--	568,2
12	S01°33'435"/W52°40'653"	Almeirim	627,0
13	S02°00'076"/W54°01'876"	Monte Alegre	780,2
14	S02°16'099"/W54°46'423"	Santarém, PA	843,1
15	S01°58'577"/W55°23'123"	Óbidos, PA	970,7
16	S02°10'274"/W56°08'094"	Juruti, PA	1014,0
17	S02°33'544"/W56°36'234"	Parintins, AM	1125,5
18	S02°25'776"/W57°32'745"	--	1231,0
19	S03°13'534"/W58°35'234"	Itacoatiara	1381,9
20	S03°08'879"/W59°23'453"	--	1497,6
21	S03°05'048"/W59°46'849"	Manaus, AM	1534,6
	S03°08'400"/W59°55'836"	Manaus, AM	1568,0

* km (Estuário Amazônico, sendo que o marco 0 km foi considerado o município São Caetano de Odivelas, PA).

APÊNDICE II

Informações sobre os sítios de análise da água do rio Negro (Março de 2007).

Sítios	GPS	Localidade	Distância da foz*
1	S03°29'250"/W59°55'808"	Manaus	0
2	S03°05'850"/W60°08'378"	Manaus	5,4
3	S03°04'261"/W60°08'325"	Anavilhanas	14,2
4	S02°54'823"/W60°29'227"	Anavilhanas	56,6
5	S02°31'746"/W60°52'357"	--	115,2
6	S02°21'384"/W61°00'277"	--	138,3
7	S02°14'273"/W61°03'359"	--	151,1
8	S01°55'960"/W61°17'788"	--	193,6
9	S01°44'833"/W61°25'275"	--	217,7
10	S01°37'767"/W61°27'418"	--	229,8
11	S01°25'130"/W61°36'813"	Moura	258,7
12	S01°23'693"/W61°48'693"	Foz r. Branco	276,0
13	S01°23'646"/W61°52'429"	Foz r. Branco	281,1
14	S01°13'479"/W62°22'325"	Com. Carvoeiro	330,1
15	S01°06'049"/W62°40'297"	--	372,8
16	S01°02'828"/W62°43'790"	--	382,5
17	S01°01'754"/W62°46'334"	--	403,6
18	S00°58'942"/W62°53'030"	Barcelos	419,3
19	S 00°50'536"/W62°57'074"	Mariuíá	432,5
20	S00°49'815"/W62°57'277"	Mariuíá	435,6
21	S00°47'970"/W62°56'755"	--	438,8
22	S00°47'487"/W62°56'729"	--	440,9
23	S00°46'720"/W62°56'609"	Foz r. Demini	446,4
24	S00°46'306"/W62°56'505"	Foz r. Demini	451,2
25	S00°46'116"/W62°56'539"	Foz r. Demini	452,3
26	S00°46'027"/W62°56'930"	Foz r. Demini	453,2
27	S00°45'843"/W62°56'979"	Foz r. Cuiuni	458,6
28	S00°42'373"/W63°05'008"	Foz. r. Cuiuni	463,4
29	S00°42'293"/W63°06'740"	Foz r. Cuiuni	467,3
30	S00°41'588"/W63°07'930"	--	476,2
31	S00°41'245"/W63°09'101"	--	480,5

* km

Informações sobre os sítios de análise da água do rio Negro (Abril de 2008).

Sítios	GPS	Localidade	Distância da foz*
1	S03°04'891"/W60°10'578"	Manaus	19,4
2	S03°03'372"/W60°19'740"	Manaus	36,6
3	S02°51'473"/W60°30'617"	Anavilhanas	66,4
4	S02°36'884"/W60°98'799"	Novo Airão	109,5
5	S02°27'507"/W60°55'335"	Com. Sto Antônio	130,6
6	S02°16'563"/W61°02'215"	--	154,5
7	S02°08'483"/W61°07'261"	--	172,0
8	S01°56'397"/W61°16'324"	Boca r. Jau	200,1
9	S01°46'793"/W61°24'720"	--	223,7
10	S01°38'092"/W61°26'792"	Com. Canta Galo	240,3
11	S01°27'227"/W61°38'313"	Moura	269,6
12	S01°23'828"/W61°50'737"	--	293,5
13	S01°23'569"/W61°52'807"	Boca r. Branco	297,4
14	S01°12'073"/W62°23'674"	Carvoeiro	358,4
15	S01°08'194"/W62°31'500"	--	375,3
16	S01°04'271"/W62°31'900"	--	400,5
17	S01°02'042"/W62°47'091"	Barcelos	406,3
18	S00°56'044"/W62°56'998"	Ilha da Metada	428,8
19	S00°53'556"/W62°57'775"	Mariuá	431,9
20	S00°51'588"/W62°58'360"	Mariuá	435,7
21	S00°50'630"/W62°58'833"	Mariuá	437,7
22	S00°50'823"/W62°58'122"	Ilha dos Pombos	439,1
23	S00°51'341"/W62°56'828"	Iauana	441,7

* km

APÊNDICE III

Informações sobre os sítios de análise da água do Rio Tapajós (Junho de 2007).

Sítios	GPS	Localidade	Distância da foz*
1	S02°25'631"/W54°53'091"	Santarém	19,8
2	S02°37'057"/W55°01'501"	Belterra	46,0
3	S02°54'578"/W55°05'879"	--	79,3
4	S03°17'435"/W55°12'564"	--	123,2
5	S03°38'404"/W55°20'554"	Aveiros	164,6
6	S03°51'897"/W55°32'409"	Forlândia	197,8
7	S04°03'227"/W55°39'757"	Brasília Legal	222,7
8	S04°13'099"/W55°52'420"	Itaituba	252,4
9	S04°20'581"/W56°04'518"	Maloquinha	278,7
10	S04°22'337"/W56°06'445"	--	283,5
11	S04°22'509"/W56°08'864"	--	288,0
12	S04°23'722"/W56°13'824"	--	299,7
13	S04°27'678"/W56°15'046"	São Luís	300,3
14	S04°28'340"/W56°15'753"	São Luis	308,4
15	S04°28'570"/W56°16'009"	--	310,2
16	S04°28'496"/W56°16'182"	--	312,0
17	S04°27'355"/W56°16'182"	--	312,5
18	S04°30'502"/W56°14'782"	Cach. Papagaio	312,8
19	S04°30'790"/W56°14'999"	Cach. Maranhão	313,1
20	S04°30'640"/W56°15'210"	Cachoeira Flexal	313,5
21	S04°28'592"/W56°16'213"	Corredeira Tracoá	309,9

* km

Informações sobre os sítios de análise da água do Rio Tapajós (Maio de 2008).

Sítios	GPS	Localidade	Distância da foz*
1	S02°24'966"/W54°43'618	Santarém	2,52
2	S02°23'971"/W54°47'229	Alter do Chão	8,70
3	S02°30'904"/W55°00'370	Belterra	35,32
4	S02°45'143"/W55°04'737	--	56,49
5	S03°23'335"/W55°13'620	--	123,4
6	S03°35'175"/W55°20'606	Aveiros	148,7
7	S03°49'783"/W55°30'093	Forlândia	190,7
8	S04°00'866"/W55°38'175	--	205,9
9	S04°10'376"/W55°47'270	--	229,6
10	S04°16'969"/W55°59'727	Itaituba	252,3
11	S04°19'973"/W56°03'433	Itaituba	260,8
12	S04°22'652"/W56°09'766	Paraná-Mirim	271,7
13	S04°23'241"/W56°12'934	Maloquinha	276,1
14	S04°25'169"/W56°15'398	São Luís	281,6
15	S04°30'502"/W56°14'782	Cach. Papagaio	312,3
16	S04°30'617"/W56°15'189"	Cach. Cabano	312,5

* km

APÊNDICE IV

Valores em dólares (US\$) das espécies de arraias de água doce Potamotrygonidae.

Espécies	Nome vulgar internacional	Preço (US\$)	Loja Aquariorfilia
<i>P. castexi</i>	Jaguar stingray	700,00	Aquatic Predator
<i>P. menchacai</i>	Tiger stingray	695,00	Cichlid City Aquariums
<i>P. leopoldi</i>	Black ray	500,00	Fish Keeping
<i>P. castexi</i>	Otorongo ray	450,00	Aquatic Predator
<i>P. schroederi</i>	Peru flower fem	450,00	Aquatic Predator
<i>Potamotrygon</i> sp.	Star stingray	379,00	Cichlid City Aquariums
<i>P. schroederi</i>	True Flower ray	325,00	Aqua Scape Online
<i>P. castexi</i>	Otorongo	300,00	Aqua Scape Online
<i>P. castexi</i>	Jaguar	300,00	Aqua Scape Online
<i>P. castexi</i>	Otorongo ray	290,00	Cichlid City Aquariums
<i>P. motoro</i>	Marble motoro	275,00	Aqua Scape Online
<i>P. motoro</i>	Orange spot	250,00	Cichlid City Aquariums
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Antenna stingray	250,00	Aqua Scape Online
<i>P. schroederi</i>	Flower Ray Peru	225,,00	Aqua Scape Online
<i>Paratrygon aiereba</i>	China stingrays	200,00	Aqua Scape Online
<i>P. motoro</i>	Motoro stingray	145,00	Cichlid City Aquariums
<i>Dasyatis sabina</i>	Florida stingray	125,00	Aqua Scape Online
<i>P. motoro</i>	Motoro stingray	125,00	Aqua Scape Online
<i>P. motoro</i>	Motoro pup	125,00	Monster Fish Keepers
<i>P. motoro</i>	Motoro pup	125,00	Aquatic Predator
<i>P. yepezi</i>	Yepezi stingray	125,00	Aqua Scape Online
<i>P. motoro</i>	Wild caught fem	110,00	Aquatic Predator
<i>Potamotrygon</i> sp.	Mottled ray	98,00	Cichlid City Aquariums
<i>P. humerosa</i>	Humerosa ray	95,00	Cichlid City Aquariums
<i>Potamotrygon</i> sp.	Common stingray	75,00	Aqua Scape Online

*Entrega= US\$ 80,00 por caixa (28/03/2008).



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS

AUTORIZAÇÃO Nº 127, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2004.

O DIRETOR DA DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA, no uso da competência que lhe foi conferida com base no disposto no art. 1º do Decreto nº 4.579, de 21 de janeiro de 2003, e tendo em vista o que consta do Processo IBAMA/MMA nº 02005.000817/04-14, resolve:

1º - Autorizar a Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, na pessoa dos pesquisadores **Wallice Luiz Paxiúba Duncan** e **Marisa Narciso Fernandes**, a coletar e transportar raias de água doce das espécies *Paratrygon aiereba* e *Potamotrygon orbignyi*, para fins científicos, visando a execução do projeto *Osmorregulação e Morfologia Branquial em Arraias de Água Doce (Chondrichthyes, Potamotrygonidae)*.

2º - Está autorizada a coleta de 20 (vinte) exemplares de cada uma das duas espécies mencionadas, em cada estação de coleta. As estações de coleta são: (i) médio rio Negro (0°55' N); (ii) baixo rio Solimões/alto rio Amazonas (03°02' S; 59°57' W); (iii) médio rio Amazonas (01°48' S; 54°41' W); (iv) médio-baixo rio Amazonas (0°54' S; 48°44' W), e (v) estuário do rio Amazonas (0°54' S; 48°44' W). Para a captura das raias, está autorizado somente o uso de puçás e rapichés.

3º - Aos pesquisadores acima mencionados, enquanto prepostos da UFSCar, caberá a responsabilidade pelas atividades a serem desenvolvidas, pela coleta e transporte dos espécimes, assim como por qualquer dano, porventura causado, ao meio ambiente.

4º - A Instituição, representada pelos pesquisadores ora autorizados, deverá apresentar relatórios semestrais à Gerência Executiva do IBAMA no Estado do Amazonas - GEREX/AM, Gerência Executiva do IBAMA no Estado do Pará - GEREX/PA, ao Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Norte - CEPNOR/IBAMA, assim como relatório final à Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros - DIFAP/IBAMA sobre os estudos realizados, bem como cópia de qualquer publicação científica produzida.

5º - O não cumprimento do disposto nos itens anteriores implicará na revogação desta Autorização e na aplicação das sanções e penalidades previstas na legislação pertinente.

6º - Esta Autorização é válida por 1 (um) ano e 6 (seis) meses, a partir da data de sua assinatura, e não exime os pesquisadores de cumprirem o disposto na Medida Provisória nº 2.186-16/01 e no Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético.


Rômulo José Fernandes Barreto Mello
Diretor



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 10085-1	Data da Emissão: 28/10/2007 09:38	Data de Validade: 27/10/2008
Dados do titular		
Registro no Ibama: 562614	Nome: WALLICE LUIZ PAXUBA DUNCAN	CPF: 304.905.962-15
Título do Projeto: OSMORREGULAÇÃO E MORFOLOGIA BRANQUIAL EM ARRAIAS DE ÁGUA DOCE (CHONDRICHTHYES: POTAMOTRYGONIDAE)		
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA		CNPJ: 04.378.626/0001-97

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
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, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio de material biológico não consignado ao exterior deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/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.

Outras ressalvas

1	A autorização é válida apenas para exemplares neonatos e/ou subadultos.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Naara Ferreira da Silva	Pesquisadora, coleta, transporte e análise de dado	811.998.562-15	18484050 SSP-AM	Brasileira
2	Maria Lúcia Góes de Araujo	Pesquisadora	276.286.205-15	678495 SSP-SE	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BARCELOS	AM	Mariuá	Fora de UC
2	MANAQUIRI	AM	Lago Janauacá	Fora de UC
3	SAN TAREM	PA	Comunidade Arapema	Fora de UC
4	COLARES	PA	Ilha de Colares	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Potamotrygon scobina, Potamotrygon orbignyi, Potamotrygon schroederi, Potamotrygon motoro, Plesiopygion iwamae, Potamotrygon histrix, Paratrygon aiereba
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Potamotrygon orbignyi (*Qtde: 20), Potamotrygon schroederi (*Qtde: 20), Potamotrygon motoro (*Qtde: 20), Plesiopygion iwamae (*Qtde: 20), Potamotrygon histrix (*Qtde: 20), Paratrygon aiereba (*Qtde: 20), Potamotrygon scobina (*Qtde: 20)

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

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Outros petrechos(Rapichés e puçás)
---	-----------------------------------	------------------------------------

Destino do material biológico coletado

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: 64672156



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: 15068-1	Data da Emissão: 11/07/2008 17:13	Data de Validade: 11/07/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 562614	Nome: WALLICE LUIZ PAXIUBA DUNCAN	CPF: 304.905.962-15
Título do Projeto: Estudo sobre a osmorregulação das arraias de água doce, <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>Potamotrygon falkneri</i> (Potamotrygonidae: Elasmobranchii), da bacia do Paraná		
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA		CNPJ: 04.378.626/0001-97

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 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, 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/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, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Tayrine Paschoaletti Benze	Coletar, transportar, analisar	321.613.438-58	43.966.593-0 ssp-SP	Brasileira
2	Pamela Thais Gabriel	Coletar, transportar e analisar	368.262.628-00	414697029 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	ILHA SOLTEIRA	SP	Rio Paraná, Ilha Solteira	Fora de UC
2	ITAPURA	SP	Itapura	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Potamotrygon motoro</i> , <i>Potamotrygon falkneri</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Potamotrygon motoro</i> , <i>Potamotrygon falkneri</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Potamotrygon motoro</i> (*Qtde: 30), <i>Potamotrygon falkneri</i> (*Qtde: 30)

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

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Outros petrechos (Rapichês, puçás)
---	-----------------------------------	------------------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
---	--------------------	--------------

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: 16942441

