Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - BADPI

Mecanismos de regulação de Na^+ nas brânquias de peixes da Amazônia: modulação por fatores ambientais e ajustes espécie-específicos.

Rafael Mendonça Duarte

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2012

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - BADPI

Mecanismos de regulação de Na^+ nas brânquias de peixes da Amazônia: modulação por fatores ambientais e ajustes espécie-específicos.

Orientador: Dr. Adalberto Luis Val

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2012

Ficha catalográfica

Duarte, Rafael Mendonça

Mecanismos de regulação de Na^+ nas brânquias de peixes da Amazônia: modulação por fatores ambientais e ajustes espécie-específicos / Rafael Mendonça Duarte.--- Manaus: [sn], 2012

xiii+138

Tese (doutorado) --- INPA, Manaus, 2012

Orientador: Dr. Adalberto Luis Val

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior

Sinopse:

Os mecanismos fisiológicos relacionados ao transporte de Na^+ nas brânquias de diferentes espécies de peixes da Amazônia foram avaliados, em condições naturais e em laboratório. Além disso, a influência e o papel de fatores ambientais físicos e químicos na regulação de Na^+ dos animais foi também verificada. A importância dos padrões de resposta observados foi discutida em função dos mecanismos de transporte iônico determinados para peixes teleósteos de água, e suas implicações durante o processo de adaptação às condições ambientais de igarapés da bacia do Rio Negro.

Palavras chave: 1. H^+-ATPase. 2. Na^+/K^+-ATPase. 3. Fluxo unidirecional de Na^+. 4. Peixes de igarapés. 5. Respostas intraespecíficas e interespecíficas

Dedicatória

A minha mãe, Vera Sonia Mendonça

Aos meus irmãos Alexandre, André, Fábio e Marcela

Aos meus sobrinhos Irina, Daniel, Felipe e Juliano

A minha companheira Helen

Por tudo

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Adalberto Luis Val e a Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida-Val pela orientação, amizade, paciência, confiança, estímulo e, principalmente, por terem me acolhido com imenso carinho a quase 10 anos atrás.

A todos os amigos que fiz no LEEM durante esse longo tempo por me ajudarem a manter o equilíbrio e o foco, e por todos os momentos de alegria e descontração que fazem tudo valer a pena. Em especial a D.Sonia, a Maria de Nazaré e Alzira Miranda pelo grande carinho, pelas "quebradas de galho" e pelos puxões de orelha quando precisei.

Aos amigos, Rubens Tomio Honda, Daniel Fagundes, Murilo Sversut Dias, Thiago Nascimento, Carlos "patati" Henrique dos Santos, Gabriel Henrique de Mendonça Cardoso, Franscisco Marques Bezerra (Flexa) e Jurúna pela inestimável ajuda nas coletas. Sem a perseverança e obstinação de vocês em subir ladeiras esse trabalho não teria acontecido.

Aos Dr(a)s. Jansen Zuanon, Andrea Ghelfi e Christopher Rawson, e também ao meu amigo Helder Espírito-Santo, por todas as discussões, ensinamentos e assistência com a coleta e análise dos dados.

Às duas famílias (RepManos: Carlos Eduardo Mounic, Marciel Ferreia, Ricardo Romero e Ricardo Sampaio-agregado; Asilo do galo: Caroline Kawakami, Marcelo da Silveira Rodrigues, Higor Daniel Rodrigues e Bebel-agregada) que me receberam, me aguentaram e fizeram a minha estada em Manaus muito mais leve.

Aos amigos, de perto e de longe, que sempre me deram força e coragem para seguir em frente. Em especial a Rubens Tomio Honda, Patricia Maciel, César Oishi, Taia Cacciamalli, família Galuch, Diogo Souza e Leonardo da Silveira Rodrigues. Muito Obrigado!

A Dra. Marthe Monique Gagnon, a seu esposo Graham e ao seu filho Mathew Gagnon, por me mostrarem um mundo novo e, principalmente, por me fazer entender que o equíbrio nas nossas ações é o primeiro passo para a felicidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superio (CAPES) pelo auxílio recebido

À Helen Sadauskas Henrique, pelo amor, zelo, amizade, alegria e por todos os sentimentos bons que você me faz sentir, sobretudo, por fazer voltar a sonhar.

Facts are necessary materials; but their working up by experimental reasoning, i.e., by theory, is what establishes and really builds up science. (Bernard 1927, pp. 15, 23–26)

Resumo

Os mecanismos de transporte de Na^+ nas brânquias de peixes da Amazônia permanece pouco estudado, particularmente no que se refere aos ajustes fisiológicos relacionados à adaptação às condições ambientais peculiares das águas da região. O presente estudo teve como objetivo analisar os mecanismos fisiológicos relacionados ao transporte de Na^+ nas brânquias de diferentes espécies de peixes da Amazônia, em condições naturais e em laboratório. Para tanto, foi avaliada a influencia das condições físicas e químicas da água no fluxo unidirecional e propriedades cinéticas para a absorção de Na^+ dos animais, assim com a atividade da Na^+/K^+-ATPase e H^+-ATPase, verificando a presença de ajustes intra e interespecíficos na regulação do transporte de Na^+ em função das condições ambientais. As respostas no transporte branquial de Na^+ foram fortemente relacionadas a atividade da H^+-ATPase, sugerindo que essa enzima exerce um papel na manutenção do equilíbrio iônico e ácido base das espécies estudadas durante os processos de aclimatização e aclimatação a condições ácidas e com baixa disponibilidade iônica. Contudo, outros transportadores parecem estar envolvidos no transporte branquial de Na^+, particularmente em *Hyphessobrycon copelandi* durante a exposição aguda a maiores temperaturas Foi observado também que diferenças no controle da permeabilidade branquial influenciam na tolerância de alguns ciclídeos, como *Pterophyllum scalare* e *Symphysodon discus*, a distúrbios ionoregulatórios decorrentes da exposição a águas ácidas e pobre ionicamente. Além disso, variações intraespecíficas e interespecíficas na regulação da atividade da H^+-ATPase, e em menor grau da Na^+/K^+-ATPase, foram associadas a ajustes adaptativos dos peixes às condições ambientais naturais de igarapés da bacia do Rio Negro.

Abstract

The mechanisms of Na^+ transport in gills of Amazonian fish species remains poorly understood, particularly regarding to the physiological adjustments involved in adaptation to the singular environmental conditions of Amazon waters. The aim of the present study was analyze the physiological mechanisms involved in Na^+ transport in gills of different Amazonian fish species, at both natural and laboratory conditions. Therefore, we evaluated the influence of water physical and chemical conditions on Na^+ unidirectional fluxes and Na^+ uptake kinetic properties of fishes, as well as on Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activity, looking for intraespecific and interespecific adjustments in Na^+ transport according to environmental conditions. The responses in branchial Na^+ transport were strongly related to H^+-ATPase activity, suggesting that this enzyme plays a importante role in the maintenance of the ionic and acid-base balance in the studied fish species during the process of acclimatization and acclimation to acidic conditions ion-poor conditions. However, others Na+ transporters seems to be involved in branchial transport of Na^+, particularly in *Hyphessobrycon copelandi* during acute exposure to higher temperatures. There was also seen that differences in controlling gill permeability modulate the tolerance of some cichlid fish species, as *Pterophyllum scalare* and *Symphysodon discus*, to ionoregulatory disturbances from the exposure to acidic water and ion-poor conditions. Moreover, intraspecific and interspecific variation in the response of H^+-ATPase activity, and in a lower extent to the Na^+/K^+-ATPase activity, were associated with adaptive adjustments of fish to the natural environmental conditions founded in streams of the Rio Negro basin.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA: MODULAÇÃO POR CONDIÇÕES ABIENTAIS EXTREMAS

Effect of low pH exposure on Na^+ regulation in two cichlid fish species of the Amazon

Table 1 ..... ***50***

CAPÍTULO 2. PADRÕES IONOREGULATÓRIOS DE SETE ESPÉCIES DE PEIXES DE IGARAPÉS DE UMA MICROBACIA DE DRENAGEM DA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

Tabela 1. ..... ***102***

Tabela 2. ..... ***103***

Tabela 3. ..... ***104***

Tabela 4. ..... ***104***

Tabela 5. ..... ***106***

Tabela 6. ..... ***107***

Tabela 7. ..... ***108***

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA: MODULAÇÃO POR CONDIÇÕES ABIENTAIS EXTREMAS

H^+-ATPase involvement in Na^+ regulation of two Amazonian fish exposed to low pH in naturally ion-poor and high dissolved organic carbon conditions

Figure 1. ..... ***33***

Figure 2 ..... ***34***

Effect of low pH exposure on Na^+ regulation in two cichlid fish species of the Amazon

Figure 1 ..... ***51***

Figure 2 ..... ***52***

Figure 3 ..... ***53***

Figure 4 ..... ***54***

Na^+ regulation in gills of the Amazonian Hyphessobrycon copelandi: in vitro and in vivo responses to low pH and high temperature conditions.

Figure 1 ..... ***70***

Figure 2 ..... ***71***

Figure 3 ..... ***72***

Figure 4 ..... ***73***

Figure 5 ..... ***74***

CAPÍTULO 2. PADRÕES IONOREGULATÓRIOS DE SETE ESPÉCIES DE PEIXES DE IGARAPÉS DE UMA MICROBACIA DE DRENAGEM DA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

Figura 1 ..... ***109***

Figura 2 ..... ***110***

Figura 3 ..... ***111***

Figura 4 ..... ***112***

Figura 5 ..... ***113***

Figura 6 ..... ***113***

Figura 7.....*114*
Figura 8.....*115*
Figura 9.....*116*
Figura 10.....*117*
Figura 11.....*119*
Figura 12.....*119*
Figura 13.....*121*
Figura 14.....*122*
Figura 15.....*122*
Figura 16.....*124*
Figura 17.....*125*
Figura 18.....*125*
Figura 19.....*127*
Figura 20.....*128*
Figura 21.....*128*
Figura 22.....*130*
Figura 23.....*131*
Figura 24.....*131*
Figura 25.....*133*

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL *14*

OBJETIVOS GERAIS *19*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS *19*

CAPÍTULO 1. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA: MODULAÇÃO POR CONDIÇÕES ABIENTAIS EXTREMAS *21*

H^+-ATPase involvement in Na^+ regulation of two Amazonian fish exposed to low pH in naturally ion-poor and high dissolved organic carbon conditions **21**

INTRODUCTION 21
MATERIAL AND METHODS 23
RESULTS 26
DISCUSSION 27

Effect of low pH exposure on Na^+ regulation in two cichlid fish species of the Amazon *35*

INTRODUCTION 35
MATERIAL & METHODS 36
RESULTS 42
DISCUSSION 44

Na^+ regulation in gills of the Amazonian Hyphessobrycon copelandi: in vitro and in vivo responses to low pH and high temperature conditions. *56*

INTRODUCTION 56
MATERIAL & METHODS 57
RESULTS 61
DISCUSSION 63

CAPÍTULO 2. PADRÕES IONOREGULATÓRIOS DE SETE ESPÉCIES DE PEIXES DE IGARAPÉS DE UMA MICROBACIA DE DRENAGEM DA AMAZ *75*

1. INTRODUÇÃO 75
2. MATERIAL & MÉTODOS 77
3. RESULTADOS 82
4. DISCUSSÃO 93
5. CONCLUSÕES 101

CONCLUSÕES GERAIS *134*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *136*

INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes de água doce habitam uma vasta faixa de ambientes aquáticos marcadamente variáveis em suas propriedades físicas e químicas, que são ainda fortemente influenciadas pela distribuição espacial do corpo d'água, e pelo regime hidrológico local (Junk, 1989; Affonso et al., 2011). Assim, características como temperatura, pH, concentração de oxigênio e gás carbônico, além da composição iônica e concentração de substâncias orgânicas dissolvidas, são altamente variáveis nos ambientes de água doce (Furch, 1984, Junk, 1993; Furch & Junk, 1997). A ampla distribuição dos peixes de água doce por um ambiente tão diverso, tanto em habitats quanto em composição, reflete na miríade de adaptações biológicas, no modo de vida e na morfologia dos peixes, assim como em ajustes nos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que mantêm sua homeostase interna (Hochachka & Somero, 2002). Por estarem em contato direto com o meio aquático, e com as variações naturais em sua composição, as brânquias dos peixes de água doce apresentam uma enorme variedade de ajustes morfológicos, e, consequentemente, funcionais, para realizar as trocas gasosas, a regulação iônica, e manter o equilíbrio ácido-base dos animais (Evans et al., 2005; Hwang et al., 2011). Dessa forma, assim como algumas adaptações morfológicas frequentemente resultam em espécies altamente especializadas, ou em grupos de espécies altamente adaptados a certos tipos de habitats (De Pinna, 2006), as respostas dos mecanismos funcionais das brânquias dos peixes de água doce refletem os ajustes bioquímicos e fisiológicos ao longo da história de vida das espécies em resposta às diferentes e variáveis pressões do ambiente aquático (Hochachka & Somero, 2002).

As brânquias dos peixes teleósteos são formadas por filamentos e lamelas, recobertos por um epitélio altamente especializado composto por diferentes tipos celulares. Essa interface proporciona aos peixes uma grande área superficial que atua como uma barreira seletiva entre os fluídos corpóreos internos, com maior concentração de sais dissolvidos (aproximadamente 300 mOsm l^{-1}), e o meio aquático externo, menos concentrado (em geral <1 mOsm l^{-1}) (revisto por Evans et al, 2005). Entre os diferentes tipos celulares presentes no epitélio branquial dos peixes, os ionócitos, *i.e.* células de cloreto (CCs) ou ricas em mitocôndrias (MRCs), se destacam por desempenhar um papel importante no transporte de íons contra um gradiente de concentração, ao mesmo tempo em que atuam na secreção de equivalentes ácidos e básicos oriundos do processo metabólico, participando ativamente da regulação iônica e do equilíbrio ácido base dos animais (Evans et al., 2005; Hwang & Lee,

2007). August Krough (1938) foi o primeiro a propor que a tomada de Na^+ pelos peixes de água doce é compensada com a excreção equimolar de um cátion (NH_4^+ e/ou H^+) por meio de trocador eletroneutro (Na^+/NH_4^+). Posteriormente, Kirschner e colaboladores (1973) confirmaram farmacologicamente que o influxo de Na^+ em peixes de água doce é reduzido na presença de amilorida, um inibidor geral para os trocadores $Na^+/NH4^+$ (NHEs). Nesse modelo, a Na^+/K^+-ATPase (NKA), localizada basolateralmente nos ionócitos, exerce um papel central, sendo responsável por gerar o gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento dos trocadores NHE presentes na membrana apical, promovendo a tomada de Na^+ do ambiente contra o gradiente de concentração (Kirschner, 2004; Evans 2008; Hwang, 2009). Recentemente, diversos estudos têm identificado e imunolocalizado diferentes isoformas de NHE nas brânquias de *Oreochromis mossambicus* (Wilson et al., 2000), *Oncorhynchus mykiss* (Edwards, 1999), *Tribolodon hackonensis* (Hirata et al., 2003) e *Danio rerio* (Yan et al., 2007), corroborando com o importante papel do trocador NHE nos mecanismos de absorção de Na^+ nos teleósteos de água doce.

No entanto, a partir de evidências de que a atividade da NKA presente em diferentes tipos de epitélios com equivalente função de transporte iônico, como a pele de sapo e a bexiga urinária de tartaruga, não é suficiente para o funcionamento do trocador NHE em ambientes extremamente hipotônicos (revisto por Jensen et al., 2003; Kirschner, 2004), novos modelos para absorção de Na^+ foram propostos. Utilizando esses modelos de epitélio transportador, estudos têm demonstrado que a entrada de Na^+ nos ionócitos ocorre por meio de canais apicais ligados eletroquimicamente à extrusão de H^+ por uma H^+-ATPase (VATPase) (Ehrenfeld & Garcia-Romeu, 1977; Ehrenfeld et al., 1985; Ehrenfeld & Klein, 1997). Em um estudo avaliando o transporte de Na^+ e NH_4^+ nas brânquias de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), Avella & Bornacin (1989) propuseram que a excreção eletrogênica de H^+ facilitaria a entrada passiva de Na^+ nas células através de canais apicais. Em um estudo farmacológico, Lin & Randall (1983) confirmaram a presença de uma VATPase com função de translocação de H^+ em homogenato de brânquias de truta arco íris, que seria responsável por facilitar a absorção de Na^+ nas membranas. A partir desses achados, a presença da VATPase têm sido também confirmada por imunoreatividade, ou por ensaios farmacológicos, em diferentes espécies de peixes teleósteos de água doce, como *Carassius auratus* (Preest et al., 2005; Parks et al., 2007) e *O. mossambicus* (Wilson, 2000), ou em espécies eurialinas aclimatadas a água com baixa disponibilidade iônica, como *Fundulus heteroclitus* (Katoh et al., 2003).

Estudos recentes avaliando os mecanismos celulares e moleculares relacionados ao transporte de Na^+ em teleósteos de água doce têm fortemente evidenciado que a NKA, a VATPase e o NHE são diferencialmente regulados em função das variáveis físicas e químicas da água (Marshal, 2002; Yan et al., 2007; Hwang et al., 2011), sugerindo que múltiplos mecanismos, espécie-específicos, podem estar envolvidos com a regulação de Na^+ durante a aclimatação a variações nas condições ambientais (Clairbone et al., 2002; Hwang, 2009; Evans, 2011). Em *O. mykiss*, foram identificados dois tipos de ionócitos que expressam diferencialmente o NHE (PNA^+ cells) e a VATPase (PNA^- cells), enquanto a NKA é colocalizada nos dois tipos celulares (X,C,V). Galvez e colaboradores (2002) demonstram que, em situações de acidose interna, a abundância de VATPase foi aumentada nas células PNA^- das brânquias da truta arco íris. Além disso, o papel da VATPase na regulação de Na^+ nessa espécie foi verificado em estudo com células isoladas, onde somente as células PNA^- apresentaram influxo de Na^+ sensível a inibidores como a bafilomicina e o femanil, que são específicos para VATPase e para os canais de Na^+, respectivamente (Reid et al., 2003). Em contraste, na espécie tolerante à acidez Osorezan dace (*T. hakonensis*) a aclimatação a pH 3.5 promoveu apenas pequenas alterações no *status* ácido-base e iônico sanguíneo, que foram acompanhadas por aumento na abundância do RNAm do NHE3 e da NKA, e de relativamente pequenas alterações nos níveis de expressão e abundância da VATPase, sugerindo que o NHE exerce um papel importante na regulação iônica nesta espécie durante a aclimatação a condições ácidas (Hirata et al., 2003).

Novos modelos de regulação iônica e acido-base nas brânquias e pele de *D. rerio* têm gerado informações relevantes sobre o funcionamento e regulação da NKA, VATPase e NHE durante o processo de aclimatação desta espécie a águas ácidas ou com baixa concentração iônica (Yan et al., 2007; Horng et al., 2007; Liao et al; 2009; Hwang et al., 2011). Análises de hibridização *in situ* com dupla fluorescência demonstraram que diferentes isoformas da sub-unidade alfa da NKA (zatp1a1a.1, zatp1a1a.2 e zatp1a1a.5) são expressas diferencialmente nos ionócitos das brânquias de *D. rerio* (células ricas em NKA, células expressoras do co-transportador Na^+-Cl^- e células ricas em H^+-ATPase, respectivamente), com respostas distintas em função da concentração iônica do meio, sugerindo que esta espécie apresenta diferentes vias regulatórias da NKA, o que permite aos animais ajustar sua atividade frente às oscilações das condições ambientais (Liao et al., 2009). A quantificação do número de transcritos de znhe3b e zatp6v0c nas brânquias de *D. rerio* revelou que a expressão do NHE e da VATPase foi diferencialmente regulada pela aclimatação a baixo pH (4.0) ou a baixa

disponibilidade de Na^+ (40-50 μM) e Cl^- (30-60 μM) (Yan et al., 2007). Segundo os autores, em águas com baixos níveis de Na^+ a VATPase é reduzida para gerar o gradiente de H^+ dentro dos ionócitos, necessário para a tomada apical de Na^+ via NHE3b, enquanto em condições ácidas a VATPase seria responsável pela extrusão de H^+ para manter o equilíbrio ácido-base interno do animal (Yan et al., 2007). Além disso, a supressão do gene responsável pela transcrição da sub-unidade alfa da VATPase em mutantes de *D. rerio* reduziu a taxa de sobrevivência e tolerancia dos animais a condições ácidas, além de inibição da secreção ácida, crescimento anormal e distúrbios na composição iônica corpórea nos peixes aclimatados em água com baixa concentração de sais dissolvidos (Horng et al., 2007). No entanto, Kumai & Perry (2011) demonstraram que a excreção de amônia nas brânquias de *D. rerio* foi fortemente correlacionada ao influxo de Na^+ via NHE, particularmente nos peixes criados em águas com baixo pH. As implicações termodinâmicas para o não funcionamento do NHE em condições ácidas seriam facilitadas pela presença da glicoproteína Rhcg (Rhesus proteins), uma vez que a Rhcg promoveria a dissociação da amônia em NH_3^+ e H^+, sendo o NH_3^+ excretado via Rhcg enquanto o acúmulo de H^+ dentro do ionócito geraria o gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento do NHE (Kumai & Perry, 2011). Porém, a exposição à bafilomicina em águas ácidas também inibiu significativamente o influxo de Na^+ nas brânquias de *D. rerio*, indicando que ambas as vias de transporte podem estar envolvidas na regulação de Na^+ nessa espécie (Kumai & Perry, 2011).

Ajustes marcantes na capacidade de transporte e na resistência do epitélio branquial ao efluxo de íons, particularmente em função da baixa composição iônica e elevada acidez da água, têm sido descritos para diferentes espécies da ictiofauna Amazônica (Wood et al., 1998; Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002; Matsuo & Val, 2007). Algumas espécies de caracídeos do Rio Negro como *Paracheirodon axelrodi*, *P. innesi*, *Gymn. Ternetzi*, *Hemigrammus* sp e *Carnegiella strigata* apresentam mecanismos de transporte de Na^+ altamente especializados em manter elevadas taxas de influxo (alto J_{max}), mesmo em condições extremas de baixas concentrações de Na^+ na água (> 50 μM) e elevada acidez (pH 3.5), evidenciado pela alta afinidade dos transportadores pelo Na^+ (baixo K_m). Por outro lado, espécies de ciclídeos como *Pterophyllum scalare* e *Satanoperca jurupari* apresentam um epitélio branquial com baixa permeabilidade a íons e resistente aos efeitos da elevada acidez do ambiente aquático, demonstrando poucas especializações no transporte de Na^+ em águas ácidas e pobres ionicamente (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). Contudo, diversas questões relacionadas aos mecanismos de regulação de Na^+ nas brânquias dos peixes

da Amazônia, particularmente sobre as vias de transporte de Na^+, e no papel modulador das variáveis físicas e químicas da água sobre a expressão, localização, abundância e funcionamento de diferentes trocadores e bombas nos ionócitos dos peixes da região ainda não foram claramente elucidadas.

Neste contexto, o foco principal da presente tese foram os ajustes fisiológicos relacionados à regulação de Na^+ nas brânquias de diferentes espécies de peixes da Amazônia em função das características físicas e químicas da água. Com isso, se espera contribuir para o entendimento dos mecanismos adaptativos que levaram os peixes da região a habitarem corpos d'água com condições naturais extremas, que impõem desafios adicionais para a manutenção da homeostase iônica e equilíbrio ácido base dos animais. Para tanto, esta tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo 1 engloba uma série de experimentos realizados com o intuito de avaliar o efeito modulador das características da água, particularmente da baixa disponibilidade de sais e pH, nas propriedades e capacidade de transporte de Na^+ nas brânquias de diferentes espécies de peixes da região (*Mesonauta insignis*, *Nannostomus marginatus*, *Pterophyllum scalare*, *Symphysodon discus* e *Hyphessobrycon copelandi*) , assim como no controle das perdas difusivas de íons pelas branquial dos animais. No capítulo 2 foi avaliado o padrão de resposta das enzimas NKA e VATPase nas brânquias de sete espécies de peixes de igarapés de água preta, comparando as respostas das ATPases entre dois períodos distintos do ciclo hidrológico local (chuvas x estiagem), além do efeito modulador do gradiente das condições ambientais naturais na atividade dessas enzimas.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os mecanismos fisiológicos relacionados ao transporte de Na^+ nas brânquias de espécies de peixes da Amazônia. Uma série de estudos, em condições naturais e em laboratório, foi realizada para compreender e avaliar a influência de fatores ambientais físicos e químicos na regulação de Na^+ dos animais, verificando a presença de ajustes espécie-específicos no funcionamento de enzimas relacionadas ao transporte de Na^+ em função das condições ambientais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Capítulo 1**: MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA: MODULAÇÃO POR CONDIÇÕES AMBIENTAIS EXTREMAS

    - **Manuscrito 1**: Verificar o envolvimento das enzimas NKA e VATP no transporte de Na^+ nas brânquias das espécies *Nannostomus marginatus* e *Mesonauta insignis* durante exposição aguda ao pH ácido, em água com disponibilidade naturalmente baixa de sais e alta concentração de carbono orgânico dissolvido;

    - **Manuscrito 2**: Determinar o efeito da exposição aguda a condições ácidas e com baixa concentração iônica sobre os mecanismos de transporte de Na^+ nas brânquias das espécies ciclídeos *Pterophyllum scalare* e *Symphysodon discus*;

    - **Manuscrito 3**: Analisar o efeito in vitro do pH ácido e de altas temperaturas na atividade das enzimas NKA e VATP, avaliando também a regulação dos mecanismos de transporte de Na^+ nas brânquias de *Hyphessobrycon copelandi* durante a exposição aguda e aclimatação a essas condições ambientais.

- **Capítulo 2**: PADRÕES IONOREGULATÓRIOS DE SETE ESPÉCIES DE PEIXES DE IGARAPÉS DE UMA MICROBACIA DE DRENAGEM DA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

    - Avaliar a relação alométrica para as ATPases nas brânquias de sete espécies de igarapés na micro bacia do Acara, na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

- Comparar as respostas na atividade de ATPases nas brânquias de sete espécies de peixes de igarapés entre dois períodos distintos do ciclo hidrológico local (chuvas x estiagem);

- Avaliar a presença de padrões de resposta intraespecíficos na atividade branquial de ATPases em sete espécies de peixes de igarapés em função das propriedades físicas e químicas da água da micro bacia do Acara, na Reserva Florestal Adolpho Ducke,

CAPÍTULO 1. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES DA AMAZÔNIA: MODULAÇÃO POR CONDIÇÕES AMBIENTAIS EXTREMAS

Manuscrito a ser submetido ao *Journal of Fish Biology*

H^+-ATPase involvement in Na^+ regulation of two Amazonian fish exposed to low pH in naturally ion-poor and high dissolved organic carbon conditions

INTRODUCTION

Freshwater fish maintain their ion body homeostasis through iono/osmoregulatory mechanisms developed to regulate the intrinsic permeability to ion loss in specialized organs (gills and skin), and actively transport various ions from the surrounding environment (Evans 2011), despite inhabiting hypotonic environments. The current models of Na^+ regulation evidence the presence of an apical Na^+ uptake system coupled to acid secretion functions in gills of freshwater teleost fish (Evans 2011; Hwang et al., 2011). Two different pathways are recognized to transport Na^+ through the gills: (1) *via* an amiloride-sensitive electroneutral exchanger (NHE) carrying out NH_4^+ instead H^+ ions, and (2) by the extrusion of H^+ through an bafilomycin-sensitive V-ATPase electrically linked to epithelial Na^+ channels (ENaC) (Kirschner, 2004; Evans 2011; Hwang et al., 2011). In both pathways, the basolaterally located Na^+,K^+-ATPase operates to maintain the electrochemical gradient to apical Na^+ uptake (Evans 2011; Hwang et al., 2011). Recent studies using zebrafish gills/skin as model have revealed the presence of both NHE and H^+-ATPase in the same type of ionocyte (H^+-ATPase-rich cells, HR) (Lin et al., 2006; Liao et al., 2009); however, upon acute environmental challenge, as acidic and low ionic content water, Na^+ transport pathways seems to be modulated as observed by up and/or down regulation of mRNA expression and activity of NHE and H^+-ATPase transporter (Shih et al., 2011). On the other hand, two subpopulations of mitochondria rich cells (MR), PNA^+ and PNA^-, were described in rainbow trout gills, but only PNA^- showed a much higher expression and acid-stimulated response of H^+-ATPase than PNA^+ cells, particularly during hypercapnia acidosis (Goss et al., 2001).

Although Amazonian fish are recognized to display specializations in branchial Na^+ transport mechanisms to thrive acidic ion-poor waters of the Rio Negro basin, different

strategies are employed to maintain ionic balance among them (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2006). Early studies by Wood et al (1998) and Wilson et al (1999) first reported that the acidic tolerance seen in Amazonian tambaqui, a characid that spend prolonged periods in black waters of the Rio Negro basin, involves no stimulation of net Na^+ and Cl^- losses and plasmatic acid-base disturbances, suggesting that the threshold to avoid ionic disruptions in this fish species is between pH 3.5 and 3.0. Flux measurements and kinetics analysis using radioisotopes revealed that Amazonian characidae *Paracheirodon innesi*, *P. axelrodi*, *Hemigrammus* sp and *Gymnocorymbus ternetzi* have an specialized acidic-insensitive Na^+ transport mechanisms, presenting high affinity (low K_m) and capacity for Na^+ uptake (J_{max}) with strong resistance to effects of low pH (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez & Preest, 1999; Gonzalez & Wilson, 2001). In contrast, the Amazon cichlid fish species *Pterophyllum scalare* and *Apistogramma* sp showed an acidic-sensitive Na^+ transport system, with low capacity and affinity for Na^+ uptake and low gill intrinsic permeability (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002; Gonzalez et al., 2006). Thus, it appears that Amazon characid fish would maintain the active ion uptake even at acidic and extremely diluted waters, while cichlid fish control branchial permeability to prevent significant ion loss in low pH waters. However, no information is available on the mechanisms of Na^+ transport system, particularly regarding to the pathways and transporters related to Na^+ uptake in gills of Amazon fish species native to naturally acidic ion-poor environmental conditions.

The drainage area of Rio Negro basin contains countless small streams from the uplands not seasonally flooded (locally called *Igarapés*) that have remarkably low pH (3.5-4.0) and ionic content (conductivity < 10 mS cm^{-1}), and high concentration of dissolved organic carbon (DOC; 10 to 35 mgC l^{-1}) (Junk, 1983; Walker, 1995, Furch & Junk, 1997). These *igarapé*s are very oligotrophic environments once light penetration is reduced by forest canopy causing the native ichtyofauna to be dependent of allochthonous material from the forest (Walker, 1995; Lowe-McConnell, 1999). Despite these challenges, these igarapés house some 50 species belonging to Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Gymnotiformes, Synbranchiformes and Cyprinodontiformes orders (Lowe-McConnell, 1999; Mendonça et al., 2005). Small fishes are the predominant fish fauna in the *igarapé*s. Among them are found the characid (Lebiasinidae) *Nannostomus marginatus* (Eigeinmann 1909) and the cichlid *Mesonauta insignis* (Heckel, 1840), that also inhabit uncontaminated *igarapé*s around Manaus city (Anjos & Zuanon, 2007; Mendonça et al., 2005).

The present study was designed to answer the following questions: 1) are the acidic insensitive Na^+ transport system present in gill of the Lebiasinidae *N. marginatus*, as seen in others Amazon characid fish species, after acute exposure to natural low pH water? 2) are the acidic sensitive mechanisms for Na^+ regulation also present in gills of the cichlid *M. insignis* after exposure to low pH? 3) What is the role of the branchial Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase in the regulation of Na^+ in both fish species exposed to low pH in natural ion-poor water?

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

Specimens of *N. marginatus* and *M. insignis* (average of body weight 0.425±0.007g and 0.343±0.095g, respectively) were collected in *Igarapé* Barro Branco, in Reserva Florestal Adolfo Ducke (RFAD) between 02° 55'- 03° 01'S and 59° 53'- 59° 59'W, approximately 30 km away from Manaus city. Water samples were taken directly from the stream and the natural water characteristics were: temperature= 25.18±0.08 °C, conductivity= 10.18±0.08 μS cm^{-1}, dissolved oxygen= 5.92±mg l^{-1}, DOC (dissolved organic carbon)= 13.72±0.21 mgC l^{-1}, [Na]= 8.91±0.22 μmol l^{-1}, [K]= 0.54 μmol l^{-1}, [Ca]= 1.17±0.25 μmol l^{-1}, [Mg]= 0.56 μmol l^{-1}, [Cl]= 4.97±0.72 μmol l^{-1}, pH= 4.89±0.02. After sampling, all fish were transported in the same natural water to the Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution in the National Institute for Research in the Amazon (LEEM/INPA), where the animals were held for 24 h without feed before the exposure to low pH. Collection, experimental and holding procedures followed INPA's animal care guidelines and were approved by INPA's animal care committee.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Unidirectional fluxes of Na^+ and Gill Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activities

The effects of low pH exposure on the mechanisms of Na^+ regulation at gills were evaluated by the measurement of Na^+ unidirectional fluxes. The measurement of Na^+ uptake (J_{in}) rates consists in monitoring the disappearance of radiotracer from the experimental solution, while Na^+ net fluxes (J_{net}) rates were determined monitoring changes in total Na^+ concentration in experimental chamber. Diffusive losses of Na^+ (J_{out}) were estimated by differences in Na^+ J_{in} and J_{net} in different water quality conditions.

Fish were transferred to aerated polyethylene chambers containing fresh stream water (100 ml) and allowed to recover for 1 h prior the experiments. Unidirectional Na^+ fluxes were determined in the same natural stream water with the pH adjusted to 5.0 and 4.0 using 0.01 M NaOH and 0.05M H_2SO_4 solutions, respectively (N=8 to each pH level). After the acclimation period, the water flux was stopped and the volume of each chamber was adjusted to 30 ml before the addition of ^{22}Na (0.9 μCi l^{-1}, PerkinElmer Life and Analytical Sciences). After 15 min, two 2 ml samples were taken at the beginning of the experiments (T0), and after 2 h of exposure to each pH levels. One water sample was used for radioactive counting and the other for measurement of total concentration of Na^+ in the solution. There was no significant change in solution pH during the flux period at both pH levels. After the flux period, fish were killed with an overdose of buffered anesthetic (1 g l^{-1} MS-222 and 2 g l^{-1} $NaHCO_3$, Sigma Aldrich) and gills were excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 ^oC prior the analyses of Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase.

ANALYTICAL TECHNIQUES

Na^+ unidirectional fluxes

Ion concentration in the experimental solution (Na^+) and in the natural water from the *Igarapé* Barro Branco (Na^+, K^+, Ca^{2+} and Mg^{2+}) were determined using flame atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst 800, PerkinElmer Singapore), while Cl^- concentration was determined spectrophotometrically by the mercuric thiocyanate method (Zall et al., 1956). DOC concentration in natural water samples was determined using combustion method with infrared detection in a total carbon analyzer (Apollo 9000TN, Teledyne Tekmar). Radioactivity in water samples was analyzed in 2 ml aliquots mixed with 4 ml Ultima Gold scintillation counting cocktail (PerkinElmer Life & Analytical Sciences), and determined using a liquid scintillation counting (LS6500; Beckman & Coulter, Fullerton, CA, U.S.A). Mean specific activity of the isotope (cpm μmol^{-1}) in water samples was determined as a relationship between total Na^+ concentration and ^{22}Na radioactivity. Influx rates (J_{in}; nmol g^{-1} h^{-1}) were based on the amount of ^{22}Na isotope incorporated by the fish during a exposure period of 2 h at each pH level, and calculated as:

$$J_{in}=(cpm_i-cpm_f)*V\ (Sa*T*W)^{-1},$$

where cpm_i= isotope counting (cpm ml^{-1}) in the beginning of flux period, cpm_f= isotope counting (cpm ml^{-1}) at the end of flux period, V=volume of water in experimental chamber

(ml), Sa= mean specific activity of the isotope, T=flux period (h) and W= the wet mass of fish (g). Na^+ net fluxes rates (J_{net}) were assessed by measuring the gain or loss of Na^+ from the fish to the water, and was calculated as:

$$J_{net}=(ion_1\text{-}ion_2)*V\ (T*W)^{-1},$$

where ion_1 and ion_2= were the initial and final Na^+ concentration (μmol) in the experimental solution during the flux period. Efflux rates of Na^+ (J_{out}) were estimated by the difference between Na^+ net fluxes and influx rates ($J_{out}=J_{net}-J_{in}$). All calculation followed the equations described by Wood (1992).

Gill Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activities

Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activities in whole gill baskets were measured using the basic procedure described by Kültz & Somero (1995). The assay is based on the oxidation of reduced NADH by the enzyme reaction coupled to the hydrolysis of ATP. Briefly, frozen gill were homogenate in ice-cold SEID buffer (150 mM sucrose, 50 mM imidazol, 10 mM EDTA, 0.5% Na-desoxycholate, pH 7.5) at 1:10 wet sample mass to buffer volume. Crude homogenates were then centrifuged (4^{o}C, 2000x g) for 10 min and the supernatant was collected to run the enzymatic assay. The supernatants (5 μl) were added to 12 wells of 96 well microplate and incubated with reaction solution (30 mM imidazol, 45 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ $6H_2O^{-1}$, 0.4 mM KCN, 1.0 mM ATP, 0.2 mM NADH, 0.1 mM fructose 1,6 difosfate, 2 mM PEP, 3 IU ml^{-1} PK and 2 IU ml^{-1} LDH). Four of twelve wells then received reaction solution with 2 mM ouabain, while crude homogenate in other four wells received reaction solution with 2 mM N-ethylmaleimide. The rate of NADH oxidation was monitored every 10 s over 10 min at 340 nm at room temperature. The difference in slope of NADH oxidation versus time reaction between reaction solution free of inhibitors and containing the inhibitors (ouabain and N-ethylmaleimide) were used to determine Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activity, respectively. Both enzyme activities are shown in μmol h^{-1} mg $protein^{-1}$. Protein concentration in gills crude homogenates was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

STATISTICAL ANALYSES

All data are expressed as mean±SEM. A two-tailed t-test was used to compare Na^+ influx, efflux and net flux rates, as well as activities of Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase in the

gills of animals of both species exposed to pH 5.0 and 4.0. All statistical significance was calculated at $P< 0.05$.

RESULTS

Na^+ UNIDIRECTIONAL FLUXES

Ionoregulatory responses to acute low pH exposure, evaluated as Na^+ unidirectional flux rates, exhibited very different pattern between the two fish species (Fig. I). At pH 5.0, both fish species showed high Na^+ uptake rates (J_{in}), around 460 and 790 nmol h^{-1} g^{-1} to *N. marginatus* and *M. insignis*, respectively, considering the extremely low Na^+ concentration in the stream water (below 10 μM). Acute exposure (2 h) to low pH induced substantial stimulation (approximately 2.6 fold) in both J_{in} and J_{out} of Na^+ ($P=0.016$ and $P=0.025$, respectively) in *N. marginatus*. However, there was no significant effect on Na^+ net losses in this fish species, with Na^+J_{net} slight positive even after acute exposure to pH 4.0 (Fig. IA). On the other hand, unidirectional Na^+ J_{in} rates were significantly inhibited in almost 70% ($P=0.004$) in *M. insigns* acutely exposed to low pH, while no effects were observed in Na^+ diffusive losses (J_{out}) in fish exposed to pH 4.0 compared to pH 5.0. Thus, at pH 4.0, the imbalance in Na^+ movements across the gills of *M. insigins*, particularly in Na^+ uptake, promotes significant stimulation of Na^+ net losses rates ($P=0.013$) when compared with fish at pH 5.0 (Fig. IB).

GILL Na,K^+-ATPASE AND H^+-ATPASE ACTIVITIES

Mean branchial Na^+,K^+-ATPase activity was slightly higher in *N. marginatus*, around 0.85 and 0.82 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$, than in *M. insigns* (0.65 and 0.46 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$) at pH 5.0 and pH 4.0, respectively. There was no significant effect of acute low pH exposure on gill Na^+,K^+-ATPase activity in both fish species (Fig. II). In contrast, mena gills H^+-ATPase activity was almost 3.4 fold higher in *M. insignis* (1.88 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$) than *N. marginatus* (0.54 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$) at pH 5.0. However, at pH 4.0 *N. marginatus* showed a 1.6 fold higher H^+-ATPase (1.28 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$) than *M. insigns* (0.80 μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$). Acute exposure to pH 4.0 induced a significant increase in H^+-ATPase activity (approximately 2.3 fold; $P=0.003$) in gills of *N. marginatus* (Fig. IIA). In contrast, branchial H^+-ATPase activity of *M. insigns* was inhibited approximately by 58% ($P=0.032$) after 2 h exposure to pH 4.0 (Fig. IIB).

DISCUSSION

The present study provides new information on the mechanisms regarding distinct patterns of Na^+ regulation in the gills of two Amazonian fish species living in naturally acidic ion-poor waters with high DOC content. Here, we confirm previous findings for the presence of a specialized (insensitive) and unspecialized (sensitive) Na^+ transport mechanisms in gills of Amazonian characid and cichlid fish species, respectively (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). More importantly, we provide evidence for the role of H^+-ATPase activity in maintenance of high Na^+ uptake rates in the lebiasinidade *N. marginatus* even at acidic (pH 4.0) ion-poor conditions, as well as for the acidic sensitive Na^+ transport system of the cichlid species *M. insignis*. The present results of Na^+ transport mechanisms are important for our understanding of Na^+ regulation in the gills of Amazonian fish species inhabiting naturally acidic and extremely ion-poor waters.

Na^+ UNIDIRECTIONAL FLUXES

Branchial unidirectional fluxes of Na^+ in fish collected at naturally acidic ion-poor waters from the Rio Negro basin revealed that the lebiasinidae *N. marginatus* present Na^+ J_{in} rates at pH 5.0 close to those reported to other Amazonian characid fish at circumneutral pH, at either reconstituted or natural waters from Rio Negro (Gonzalez et al., 2002; Gonzalez et al., 2006). Surprisingly, Na^+ uptake rates observed here for *M. insigns* at pH 5.0 were higher than those observed for other cichlid fishes under similar conditions. Gonzalez & Wilson (2001) reported Na^+ influx rates of almost 50 and 400 nmol h^{-1} g^{-1} to the cichlid angelfish and to characid cardinal tetras, respectively, in reconstituted water with Na^+ concentration of 50 μM and pH 4.5. Furthermore, the characid fish *Hemigrammus* sp and *Carnegiella strigata* collected directly from Rio Negro exhibited Na^+ J_{in} around 700 nmol h^{-1} g^{-1} in natural water with pH 6.0 and Na^+ concentration below 20 μM. In contrast, at same water conditions, Na^+ influx rate estimated for the cichlid *Geophagus* sp was only around 100 nmol h^{-1} g^{-1} (Gonzalez et al., 2002). High Na^+ uptake rates, as showed by the lebiasinidade *N. marginatus*, are characteristic of Characidae fish native from Rio Negro, once these fish species present very high Na^+ transport capacities in gills (Gonzalez et al., 2006). Despite the very high Na^+ J_{in} estimated to *M. insignis* at pH 5.0, high Na^+ uptake rates are unusual to the Amazonian cichlid species. Possibly, the much higher Na^+ J_{in} reported to *M. insigns* reflect the smaller size of the specimens analyzed (almost 7.7 times smaller) in this study compared to the cichlid fish species analyzed in previous works. As pointed by Grosell et al. (2002) once mass

specific gill area are inversely correlated with the body mass in fish, smaller fish can present higher ion uptake rates.

Previous studies (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002) had reported a slightly or no effects of low pH exposure on Na^+ uptake in Amazonian characid fish species; however, some fish species as *P. innesi* and *G. ternetzi*, also from the Characidae family, up regulate Na^+ transport after direct transfer to low pH, but only after 6 h of exposure to acidic conditions (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez & Preest, 1999). Our measurements of unidirectional influx rate of Na^+ in gill of the Lebiasinidae fish *N. marginatus* are in agreement with these findings, and an increased Na^+ J_{in} to around 1,200 nmol h^{-1} g-1 was observed in this fish species after 2 h of exposure to pH 4.0. Further, to our knowledge, there have been no previous reports of a quickly significant stimulation in Na^+ influx rates after low pH exposure in these two Amazonian characid fish species. Most importantly, increases in Na^+ influx rates were accomplished by enhanced Na^+ transport enzyme activity, manly H^+-ATPase, in gills of *N. marginatus* at pH 4.0 (see discussion below). Thus, our data revealed that a high specialized Na^+ transport system is also present in the gills of the Lebiasinidae *N. marginatus*, which can maintain Na^+ J_{in} at pH 4.0 and can stimulate Na^+ uptake when facing acidic ion-poor conditions in natural water from streams of Rio Negro basin. On the other hand, Na^+ uptake system in gills of Amazonian cichlid fish are recognized as acid-sensitive, with sharply reduction or virtually complete inhibition of Na^+ J_{in} at acidic conditions (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). After only 2 h exposure to pH 4.0, Na^+ influx rates in gills of *M. insignis* were inhibited to around 250 nmol h^{-1} g^{-1} (almost 70% of inhibition), also suggesting the presence of an unspecialized Na^+ uptake system in this Amazonian cichlid fish.

As observed for Na^+ influx, exposure to pH 4.0 promotes different responses in Na^+ efflux rates in both analyzed species; while at pH 4.0 Na^+ J_{out} was significantly stimulated to near 1,000 nmol h^{-1} g^{-1} in *N. marginatus*, the cichlid *M. insignis* maintained Na^+ efflux rates very close to those estimated in pH 5.0 (600 nmol h^{-1} g^{-1}). Several authors had previously suggested that increases in Na^+ efflux rates are the major determining condition to face low pH exposure (McDonald et al 1983; Freda & McDonald, 1988; Gonzalez et al., 1997). Acidic sensitive fish species, as salmonids and cyprinids from temperate regions, present high branchial ion permeability and no control of efflux at low pH (McWillians & Potts, 1978; McDonald et al 1983; Freda & McDonald, 1988), that reflect the lack of specialization of

these fish species to regulate Na^+ at acidic ion-poor conditions. Measurements of gill transepithelial potential (TEP) in acidic tolerant Amazonian tambaqui indicated that acidic conditions (pH below 4.0) at low Ca^{2+} levels (around 20 μM) acts raising the intrinsic branchial permeability to ions (Wood et al., 1998). Previous examination of Na^+ diffusive efflux had demonstrated higher intrinsic branchial permeability in Amazonian characid fish in acidic conditions, as seen in *P. innesi, Hemigrammus* sp and *C. strigatta* that had Na^+ J_{out} rates on average 2 or 3-fold greater at pH 3.5 than in pH 6.5 (Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). Thus, in order to maintain a positive Na^+ balance in acidic ion-poor conditions, the lebiasinid *N. marginatus* seems to compensate for the ion losses by stimulation of an acidic insensitive Na^+ transport system. In contrast, the cichlid *M. insigns* seems to have lower intrinsic gill permeability than the characid *N. marginatus*, as suggested by no stimulation of Na^+ J_{out} at pH 4.0. Na^+ diffusive efflux resistant to stimulation at low pH is an usual feature of Na^+ regulation in others Amazonian cichlid species, as *Geophagus* sp and *Apistogramma* sp (Gonzalez et al., 2002), and angelfish (Gonzalez & Wilson, 2001). In despite of strong control of Na^+ J_{out}, Na^+ net losses were significantly stimulated at pH 4.0 in *M. insignis* to around – 350 nmol h^{-1} g^{-1}, particularly by the inhibition in their sensitive Na^+ uptake mechanism.

One of the most remarkable features of Amazon black waters systems are the high concentration of DOC (Walker, 1995); however, the role of DOC on gill ion regulation mechanisms in Amazon fish species is poorly understood (Gonzalez et al., 2006; Matsuo & Val, 2007). In this study, the ionoregulatory responses to low pH exposure showed by both fish species were determined in natural water from the *Igarapé* Barro Branco that present high concentration of DOC (around 13 mg C l^{-1}). Previous analysis of Na^+ transport revealed that responses to low pH, particularly in Na^+ transport mechanisms and efflux rates, could be modulated in Amazon fish acclimated to high DOC concentration. Matsuo & Val (2007) reported an increase in Na^+ transport capacity (higher J_{max}) around 20% in the characid *P. axelrodi* acclimated for 5 weeks to 35 mg C l^{-1} (as a commercial humic substances, Sigma Aldrich) at pH 3.75; however, the mechanism behind such stimulation in Na^+ transport capacity is still unclear. Moreover, lower inhibition in Na^+ influx rates were observed in the cichlid *Geophagus* after exposure to pH 3.75 in natural Rio Negro than in reconstituted distilled water (Gonzalez et al., 2002). Recent study by Galvez et al. (2009) has shown that DOC can hyperpolarize gill epithelium membranes (i.e. generate a more negative TEP) resulting in a greater Na^+ and Cl^- permeability; however, this reduced opposite

electrochemical gradient promoted by DOC would favor Na^+ uptake in fish gills (Wood et al., 2011). Thus, one possible explanation to the increased Na^+ influx in gills of *N. marginatus* at pH 4.0 is that DOC can stimulate Na^+ transport system to maintain Na^+ homeostasis in fish against the ionoregulatory imbalances promoted by acidic ion-poor waters.

Other important role of DOC in naturally acidic waters is its "buffering" capacity against the detrimental effects of low pH exposure, particularly in reducing gill ion losses (Gonzalez et al., 2002; Holland et al., 2012). Campbell et al. (1997) reported that dissolved organic matter (DOM) can bind directly to biological membranes, as algae and isolated fish gill cells, changing the permeability of cell membrane thereby affecting the transport of molecules. Some authors (Gonzalez et al., 2006; Wood et al., 2011) had suggested that DOC could act as Ca^{2+} molecules in stabilizing and/or altering the permeability of paracellular channels, by binding to the tight junctions in gill epithelium and thereby controlling Na^+ and Cl^- permeability ratios. Thus, the very close and reduced Na^+ diffusive efflux rates estimated to *M. insignis* at both pH 5.0 and 4.0 would be explained by both the low branchial intrinsic permeability as seen in Amazon cichlid at low pH conditions, and the action of DOC in reducing ionic diffusive losses to the surrounding environment.

GILL Na^+,K^+-ATPASE AND H^+-ATPASE ACTIVITIES

Gill ATPase activities suggest that exposure to low pH at naturally ion-poor conditions had no effects on Na^+,K^+-ATPase activity for the two analyzed fish species. On the other hand, in a study conducted with the acidic tolerant freshwater fish *Tribolodon hakonensis* the level of Na^+,K^+-ATPase mRNA expression was markedly increased after 7 days of exposure to pH 3.5 (Hirata et al., 2003). Moreover, long term increases in branchial Na^+,K^+-ATPase activity were reported to rainbow trout exposed to DOC (as a HA) in soft water (McGeer et al., 2002). Thus, both previous studies suggest the contribution of Na^+K^+-ATPase activity in generating the driving force for Na^+ transport in gills of fish living in acidic conditions or in the presence of DOC. However, our data indicate that gill Na^+,K^+-ATPase activity is not amended by acute low pH exposure, and do not seem to be directly modulated in gills of Amazonian fish exposed to low pH at naturally ion-poor and DOC-rich waters.

Most importantly, increases in gill Na^+ uptake in the lebiasinid *N.marginatus* seems to be mediated by upregulation of H^+-ATPase activity, once both Na^+ J_{in} and H^+-ATPase activity were closely stimulated (around 2.3 times) after exposure to pH 4.0 in naturally ion-poor high

DOC water. Lin & Randall (1993) first reported the presence of an H^+-ATPase in gills of teleost fish, also showing an increase of H^+-ATPase activity in fish acclimated to low Na^+ levels or under respiratory acidosis. Recent studies using a molecular approach had demonstrated the involvement of gill H^+-ATPase in Na^+ uptake, and their linkage with metabolic acid secretion in freshwater acclimated fish (Evans 2011; Hwang et al 2011). Lin et al. (2006) detected an H^+-ATPase-dependent outward H^+ flux in HR cells in larvae skin of stenohaline zebrafish. Moreover, in a reverse genetic study by Horng et al. (2007), H^+-ATPase knockdown suppressed acidic secretion in morphants of zebrafish embryos, whereas acclimation to acidic (pH 4.0) local tap water downregulated mRNA expression of zatp6v0c (H^+-ATPase C-subunit) in HR cells of gills of zebrafish (Yan et al., 2007), suggesting a critical role of H^+-ATPase in acid-adaptation of fish. Thus, to cope with a natural ion-poor acidic waters with high DOC levels, that was recognized to raise branchial permeability to ions in Amazonin tambaqui (Wood et al., 1998), it is likely that H^+-ATPase activity in gills of the lebiasinid *N. marginatus* was upregulated to transport the accumulated H^+ out of the cells in order to maintain the transcelullar H^+ gradient for Na^+ absorption, allowing the fish to stimulate Na^+ influx as a compensatory response to the increased Na^+ diffusive losses, and thus maintain both a positive Na^+ balance and the internal acid-base status.

H^+-ATPase seems to be involved in inhibition of Na^+ uptake in the gills of *M. insignis*, once both H^+-ATPase activity and Na^+ J_{in} rates were downregulated after exposure to pH 4.0 at ion-poor high DOC conditions. Acclimation of whole larvae and adult zebrafish to low Na^+ content induces compensatory stimulation of Na^+ uptake, whereas the mRNA expression of atp6v 1a, a gene related with transcription of H^+-ATPase protein, was downregulated (Shih et al., 2011). In recent studies using zebrafish as model, the major role of H^+-ATPase seems to be in acid secretion and ammonia excretion rather than in Na^+ uptake, particularly at low environmental Na^+ concentration and acidic conditions (Hwang et al., 2011; Kumai & Perry, 2011; Shih et al., 2011); thus, H^+-ATPase is downregulated to promote accumulation of H^+ inside the cells, which is required to drive an NH_4^+-dependent Na^+ uptake mechanism through the activity of Na^+/NH_4^+ exchanger (NHE). In contrast, our data suggest the presence of an H^+-ATPase dependent Na^+ uptake in gills of Amazonian cichlid *M. insignis*, as well as in the lebiasinid *N. marginatus*. Thus, inhibition in Na^+ J_{in} exhibited by *M. insignis* at low pH can be explained by direct competitive action of increased external H^+ gradient on the apical H^+-ATPase activity.

Although Na^+ regulation has been relatively well studied and advances in molecular biology techniques had improved our knowledge about ionoregulatory patterns displayed by freshwater fish, some authors (Gonzalez et al., 2006) point to important questions regarding gill ionoregulatory responses underlying physiological adaptations of Amazon fish species to naturally acidic ion-poor and high DOC waters that remains poorly understood. The specialization of gill Na^+ regulation displayed by both the lebiasinid *N. marginatus* and the cichlid *M. insignis* analyzed in the present work differs from others teleost freshwater fish, particularly by the presence of an H^+-ATPase-dependent Na^+ uptake. Furthermore, the differences in Na^+ regulation patterns observed between both the lebiasinid *N. marginatus* and the cichlid *M. insignis* could reflect different ionoregulatory strategies to thrive in naturally acidic ion-poor and high DOC content as in the streams from Rio Negro basin.

Acknowledgment

Funded by FAPEAM and CNPq through INCT-ADAPTA grant to ALV. ALV is recipient of a research fellowship from CNPq. RMD is supported by CAPES PhD fellowship.

Figure 1. Unidirectional fluxes of Na^+ in gills of the Characid *Nannostomus marginatus* (A) and the Cichlid *Mesonauta insignis* (B). Values are mean±SEM (n=8). Asterisk (*) represents significant difference (unpaired t-test, $P<0.05$) in Na^+ influx (J_{in}), efflux (J_{out}) and net flux (J_{net}) rates for each species exposed to pH 5.0 and 4.0.

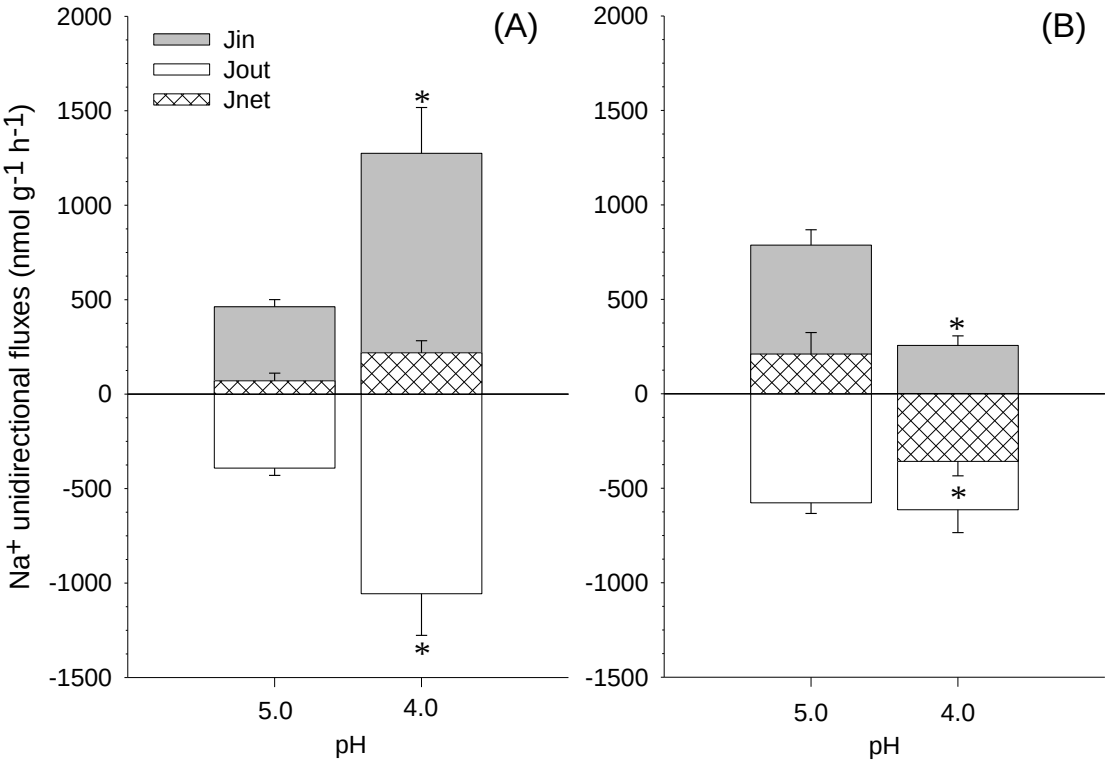
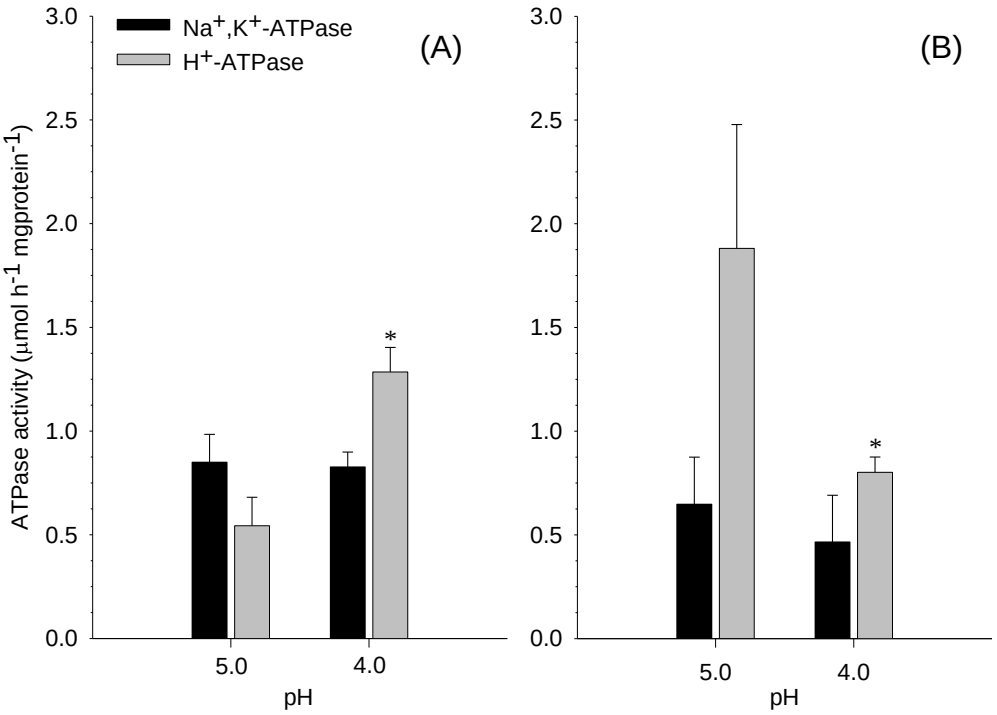


Figure 2. Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activity in gills of the Characid *Nannostomus marginatus* (A) and the Cichlid *Mesonauta insignis* (B). Values are mean±SEM (n=8). Asterisk (*) represents significant difference (unpaired t-test, $P<0.05$) in ATPase activity for each species animals exposed to pH 5.0 and 4.0.



Manuscrito publicado na revista *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 166 (2013) 441-448.* http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.022

Effect of low pH exposure on Na^+ regulation in two cichlid fish species of the Amazon

Rafael M. Duarte, Marcio S. Ferreia, Chris M. Wood, Adalberto L. Val

ABSTRACT

We evaluated the effects of acute exposure to low pH on Na^+ regulation in two Amazon cichlids collected from natural ion-poor "blackwaters", angelfish (*Pterophyllum scalare*) and discus (*Symphysodon discus*). Na^+ uptake kinetic parameters, unidirectional Na^+ fluxes, and net Cl^- fluxes were determined at pH 6.0 and 3.6. At pH 6.0, both species presented low unidirectional Na^+ flux rates, with kinetics showing a relatively low affinity for Na^+ (angelfish K_m = 79, discus K_m = 268 μmol L^{-1}), with similar maximum transport capacities (J_{max} ~ 535 nmol g^{-1} h^{-1}). Overall, there appeared to be high sensitivity to inhibition by low pH, yet low intrinsic branchial permeability limiting diffusive ion effluxes, resulting in relatively low net loss rates of Na^+, the same strategy as seen previously in other blackwater cichlids, and very different from the strategy of blackwater characids. At low pH, Na^+ uptake in angelfish was inhibited competitively (increased K_m = 166 μmol L^{-1}) and non-competitively (decreased J_{max} = 106 nmol g^{-1} h^{-1}), whereas in discus, only a decrease in J_{max} (112 nmol g^{-1} h^{-1}) was statistically significant. An acute reduction in H^+-ATPase activity, but not in Na^+/K^+-ATPase activity, in the gills of angelfish suggests a possible mechanism for this non-competitive inhibition at low pH. Discus fish were more tolerant to low pH than angelfish, as seen by lesser effects of exposure to pH 3.6 on unidirectional Na^+ uptake and efflux rates and net Na^+ and Cl^- loss rates. Overall, discus are better than angelfish in maintaining ionic balance under acidic, ion-poor conditions.

INTRODUCTION

To maintain ion homeostasis, freshwater fishes have specialized branchial transport mechanisms to actively take up ions from the hypotonic surrounding media and a tight gill epithelium to control ionic diffusive losses through the paracellular tight junctions (Evans, 2011; Hwang et al., 2011). In freshwater fish gills, Na^+ transport is coupled to acid excretion and occurs either via an as yet uncharacterized apical Na^+ channel electrically linked to extrusion of H^+ by a V-ATPase (Avella and Bornancin, 1989; Lin and Randall, 1993), or through an electroneutral Na^+/H^+ (or $Na^+/NH4^+$ or H^+ + NH3) exchanger (NHE) (Kirschner, 2004; Hwang et al., 2011), or by a combination of these mechanisms. In both different pathways for Na^+ uptake, Na^+/K^+-ATPase in the basolateral membrane of gill ionocytes exports Na^+ into the blood and contributes to the electrochemical gradient for Na^+ movement across the apical membrane (Marshall, 2002; Kirschner, 2004; Evans, 2011). On other hand, diffusive losses of ions through paracellular pathways are commonly related to the tightness of the gill epithelium, which reflect the properties of gill tight junction protein complexes (Chasiotis et al., 2012), and the interaction of these tight junctions complexes with environmental factors, such as the external H^+ and Ca^{2+} concentrations (McWilliams, 1982; McDonald, 1983b; Freda and McDonald, 1988).

Acidic ion-poor waters are physiologically challenging to freshwater fish since the branchial mechanisms of Na^+ regulation are strongly modulated by the external conditions (Wood, 1989; Lin and Randall, 1991; Hwang et al., 2011). For example, inhibitions of the active uptake of Na^+, as well as stimulation of massive Na^+ diffusive losses, were previously reported in salmonid fish at low pH (Milligan and Wood, 1982; McDonald, 1983; Wood, 1992; Randall and Lin, 1993). More recent studies using zebrafish as a model for branchial Na^+ regulation have demonstrated that acidic and ion-poor conditions can modulate the pathways for Na^+ uptake, suggesting a differential involvement of Na^+ transporters (H^+-ATPase and/or NHE) in the maintenance of Na^+ balance during acclimation to these extreme environmental conditions (Boisen et al., 2003; Yan et al., 2007; Liao et al., 2009; Kumai and Perry, 2011; Kumai et al., 2011; Shih et al., 2012). With respect to paracellular Na^+ losses, low pH and ionic concentrations (particularly Ca^{2+} and Na^+) have a negative effect on gill permeability, since at high H^+ concentration, Ca^{2+} is displaced from the binding sites in paracellular tight junctions, resulting in increased Na^+ diffusive losses (McWilliams, 1982; McDonald et al., 1983b). However, high external Ca^{2+} concentrations limit the extent of

stimulation of Na^+ diffusive losses, reducing the ionic and acid–base disturbances in freshwater fishes (McDonald et al., 1980; McWilliams, 1982; Gonzalez et al., 1998; Gonzalez and Wilson, 2001).

The adaptations to low pH of the fish endemic to the "blackwaters" of the Amazon basin are of particular interest. The Rio Negro and its tributaries drain an ancient alluvial flood plain; the waters here exhibit remarkably low ion concentrations (conductivity b 10 μS cm−1), whereas the high concentration of aquatic humic substances (AHS), generated by the decomposition of allocthonous organic material from the surrounding forest, increases the water acidity (Junk, 1983; Furch, 1984; Val and Almeida-Val, 1995; Furch and Junk, 1997). Usually the pH in Amazon "blackwaters" ranges from 5.0–6.0, but in water bodies associated with flooded forest, as well as in the small streams from the uplands, pH can be as low as 3.0–4.0 (Walker, 1995). Despite the physiological challenges imposed by such extreme conditions, particularly with respect to maintenance of ionic balance, Amazon "blackwaters" possess unique fish diversity among tropical aquatic environments (De Pinna, 2006).

Previous studies (reviewed by Gonzalez et al., 2006) have demonstrated that Amazon teleost fish display several different strategies to maintain their Na+ balance and thrive in these acidic ion-poor waters (Wood et al., 1998; Gonzalez and Preest, 1999; Wilson et al., 1999; Gonzalez et al., 2002; Matsuo and Val, 2007). For example, the acid tolerance seen in tambaqui (*Colossoma macropomum*) involves strong control of imbalances in branchial ion regulation mechanisms, particularly avoiding massive stimulation of net Na^+ and Cl^- losses with no significant declines in plasma Na^+ and Cl^- concentrations down to pH 4.0 (Wood et al., 1998; Wilson et al., 1999). Indeed, acid–base homeostasis was maintained even at pH 3.0. Furthermore, unidirectional fluxes of Na^+ and kinetic analyses of Na^+ uptake have revealed that the major component to maintain Na^+ balance in the characid fish *Paracheirodon axelrodi*, *Paracheirodon innesi*, *Gymnocorymbus ternetzi* and *Hemigrammus* sp. is an acid-insensitive Na^+ uptake system, which can maintain high Na^+ uptake rates in acidic ion poor conditions (high affinity for Na^+ uptake, i.e. low K_m). Notably, these same fish species display a weak control of intrinsic branchial permeability to ions, as seen as by the massive stimulation of Na^+ diffusive losses at low pH (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez and Preest, 1999; Gonzalez and Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). In contrast, an alternative pattern to maintain Na^+ balance under acidic conditions has been reported in the cichlid fishes angelfish (*Pterophyllum scalare*) and *Apistogramma* sp., which can maintain very low intrinsic

branchial permeability, in order to reduce the overall ionic losses, yet their Na^+ uptake systems have much lower affinity (high K_m) and are extremely sensitive to inhibition by low pH exposure (Gonzalez andWilson, 2001; Gonzalez et al., 2002).

The main goal of the present study was to analyze the patterns of Na^+ regulation, i.e., Na^+ uptake kinetic parameters and unidirectional fluxes of Na^+, in the cichlid fish species angelfish (*P. scalare*) and discus (*Symphysodon discus*) under circumneutral conditions and during acute exposure to pH 3.5. We hypothesized that the same high K_m systems, with high sensitivity to inhibition by low pH, yet low intrinsic branchial permeability limiting diffusive ion losses would be seen, as in other cichlids. Net Cl^- fluxes were also measured as another indicator of overall ionoregulatory homeostasis. While Na^+ transport in *S. discus* has not been studied previously, *P. scalare* was investigated by Gonzalez and Wilson (2001). However, the authors noted that their experimental fish were obtained from commercial sources in North America, and may have been cultured there for many generations under unknown conditions. Therefore an additional objective of our study, which employed angelfish collected from natural "blackwaters", was to evaluate potential differences from this earlier study by comparing them with the strategies for Na^+ regulation in the gill of discus challenged by acute low pH exposure at ion-poor conditions. Furthermore, Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activities in the gills of angelfish were assessed during short-term (3 h) exposure to low pH, in order to test whether acid effects on the active transport of Na^+ could be explained by effects on these enzymes.

MATERIAL & METHODS

Animals

Angelfish (*P. scalare*; 3.39±0.11 g) and discus (*S. discus*; 40.47 ± 1.15 g), collected in the upper sector of the Rio Negro (00°309 S; 63°129 W), were donated by Turky's Aquarium (Manaus, Amazonas, Brazil), and held in plastic swimming pools in the laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution (LEEM, INPA) in local well water (in μmol L−1: Na^+ = 31; Cl^- = 49; K^+ = 10, Ca^{2+} = 9; Mg^{2+} = 4; pH 6.0; temperature = 29 °C). All fish were maintained for one month under natural photoperiod and no mortalities were observed during the acclimation period. The fishes were fed dry food pellets (Nutripeixe, Purina) ad libitum but feeding was suspended for at least 48 h before starting the experimental period. All in

vivo procedures followed INPA's animal care guidelines and were approved by INPA's animal care committee

Na^+ uptake kinetics

In the first experimental series, the kinetic relationship between unidirectional Na^+ uptake rates and Na^+ concentrations in water was measured in angelfish and discus at neutral and low pH. Thus six fish of both species were transferred to individual aerated chambers (300 mL for angelfish and 1000 mL for discus) connected to a 150 L re-circulating system (flow = 0.15 L min^{-1} per chamber), and allowed to recover overnight in the same water as in the holding tanks (i.e. INPA's well water). To start the experiments, the reservoir was drained, refilled with INPA's well water and the pH was adjusted with 1% HNO_3. After 30 min of exposure to either pH 6.0 or pH 3.5, the flow was stopped, and the radioisotope ^{22}Na (as NaCl, PerkinElmer Life and Analytical Science, Boston,MA, USA) was added to each experimental chamber (0.27 and 0.45 μCi L^{-1} to angelfish and discus, respectively) in order to measure Na^+ influx over a 3-h period. Following a 15 min mixing period, two water samples (10 mL) were taken, and again at the end of the 3-h period. The same procedure was repeated with different animals in the other five higher external Na^+ concentrations for angelfish (range of 81 to 764 μmol L^{-1}), and over four Na^+ concentrations for discus (81 to 624 μmol L^{-1}) (N = 6 at each external Na^+ concentration). The external Na^+ concentration in the reservoir was adjusted to each desired level using a 1 M NaCl solution. At the highest external Na^+ concentration, the amount of ^{22}Na at each experiment was increased to 0.45 and 0.90 μCi L^{-1} for angelfish and discus, respectively, to increase precision and avoid large differences in the radioisotopic specific activity (SA) between the experimental flux periods.

Mean specific activity of the radioisotope (cpm μmol^{-1}) in water samples was determined as the ratio between concentration of ^{22}Na radioactivity (cpm mL^{-1}), and the concentration of total Na^+ in the water (nmol mL−1) during a flux period. Influx rates (J_{in}; nmol g^{-1} h^{-1}) were based on the amount of ^{22}Na isotope incorporated by the fish during the experimental periods at each pH level, and calculated as:

$$J_{in} = (cpm_i - cpm_f)*V(SA*T*W)^{-1} \quad [1]$$

where cpm_i = radioisotope cpm mL−1 at the beginning of flux period, cpm_f = radioisotope cpm mL−1 at the end of flux period, V = volume of water in the experimental chamber (mL), SA = mean specific activity of the isotope, T = flux period (h) and W = the wet mass of fish

(g). Non-linear regression (Sigma Plot 11.0) was used to derive the kinetic parameters for Na^+ uptake - J_{max} (maximum Na^+ uptake rate) and Km (the water Na^+ concentration that yields an uptake rate of 50% of J_{max}) in gills of both angelfish and discus at neutral and low pH, using the Michaelis–Menten equation:

$$J^{Na}{}_{in} = [J_{max}*(Na^+)][K_m+(Na^+)]^{-1} \quad [2]$$

Na^+ unidirectional fluxes

In the second experimental series, changes of unidirectional and net Na^+ flux rates (J_{in}, J_{out} and J_{net}) and net Cl^- flux rates were evaluated during acute exposure to pH 3.5 at the acclimation Na+ concentration. The same experimental set-up as for Na^+ kinetic analysis was used, but the flux measurements were performed only in the external Na^+ concentration of INPA's well water (31 μmol L^{-1}). Thus, after the overnight recovery in the experimental chambers, the pH was adjusted with addition of 1% HNO_3 to the re-circulating system. After 30 min of exposure to either pH 6.0 or pH 3.5, the flow was stopped, and the radioisotope ^{22}Na was added to each experimental chamber (0.27 and 0.45 μCi L^{-1} to angelfish and discus, respectively). Two water samples (10 mL) were taken at the beginning of the flux period and after 3 h and 6 h of exposure to pH 6.0 and 3.5. The pH in each experimental chamber was monitored throughout the exposure period, and corrected when necessary with 0.1% HNO_3. Radioactivities and total Na^+ and Cl^- concentrations were measured in water samples, and the mean specific activity of the radioisotope and Na_+ J_{in} rates over the 0–3 hand3–6 h periods were calculated as described in the previous section. Na^+ and Cl^- net fluxes rates (J_{net}) were assessed by measuring the gain or loss of Na^+ and Cl^- from the fish to the water, and were calculated as:

$$J_{net} = (ion_1 - ion_2)*(V*T*W)^{-1} \quad [3]$$

where ion_1 and ion_2 were, respectively, the initial and final Na^+ or Cl^- concentrations (nmol mL^{-1}) in the experimental solution during the flux period. Efflux rates of Na^+ (J_{out}) were estimated by the difference between Na^+ net flux and influx rates:

$$J_{out} = J_{net} - J_{in} \quad [4]$$

All calculations followed the equations described by Wood (1992).

Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activity

The third series was designed to assess the effects of low pH exposure on Na^+/K^+ ATPase and H+-ATPase activities in gills of angelfish. Thus, 24 fish were transferred to individual aerated chambers (300 mL) connected to a 150-L re-circulating system, and allowed to recover overnight in INPA's well water. After 24 h, separate groups of six fish were exposed to pH 3.5 over 1, 2 and 3 h, while an additional group of six fish were sampled in INPA's well water with pH 6.0. All fish were killed with an overdose of buffered anesthetic (1 g L^{-1} MS-222 and 2 g L^{-1} $NaHCO_3$, Sigma Aldrich), and gills (whole gill baskets) were excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C prior to the analyses of Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activities using the basic procedure described by Kültz and Somero (1995). The assay is based on the oxidation of reduced NADH by an enzymatic reaction coupled to the hydrolysis of ATP. Briefly, frozen gill baskets were homogenized in ice-cold SEID buffer (150 mM sucrose, 50 mM imidazole, 10 mM EDTA, 0.5% Na-deoxycholate, pH 7.5) at 1:10 wet sample mass to buffer volume. Crude homogenates were then centrifuged (4 °C, 2000 g) for 10 min and the supernatant was collected to run the enzymatic assay. The supernatant (5 µL) was added to 12 wells of a 96 well microplate and incubated with reaction solution (30 mM imidazole, 45 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.4 mM KCN, 1.0 mM ATP, 0.2 mM NADH, 0.1 mM fructose 1,6 diphosphate, 2 mM phosphoenolpyruvate, 3 IU mL^{-1} pyruvate kinase and 2 IU mL^{-1} lactate dehydrogenase). Four out of twelve wells then received the reaction solution with 2 mM ouabain, while crude homogenate in another four wells received the reaction solution plus 2 mM N-ethylmaleimide. The rate of NADH oxidation was monitored every 10 s over 10 min at 340 nm, at room temperature. The slope difference in the rate of NADH oxidation versus time between reactions with solutions that were inhibitor-free versus inhibitor-enriched (ouabain and N-ethylmaleimide) was used to determine Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activities, respectively. Both enzyme activities have been reported as µmol h^{-1} mg $protein^{-1}$. Protein concentrations in crude homogenates of gills were determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

Analytical techniques

Radioactivity in water samples was analyzed in 5-mL aliquots mixed with 10 mL Ultima Gold scintillation counting cocktail (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA), and determined using a liquid scintillation counting (LS6500; Beckman and Coulter, Fullerton, CA, USA). Tests showed that quench was constant, so no correction

was necessary. Ionic concentrations (Na^+, K^+, Ca^{2+} and Mg^{2+}) of INPA's well water and Na^+ concentrations in the experimental solutions were determined using atomic absorption spectrophotometry, flame mode (AAnalyst 800, PerkinElmer, Singapore). Cl^- concentrations were determined by the colorimetric assay of Zall et al. (1956).

Statistical analysis

All data are reported as means ± 1 SEM (N = 6). The kinetic parameters for Na^+ uptake (J_{max} and K_m) in both fish species at pH 6.0 and pH 3.5 were determined using non-linear regressions, and the calculated mean ± SEM of each parameter and the number of fish at each experimental condition (N) were used for posterior comparative analysis between both pH levels tested using a paired Student's t-test. Statistically significant differences of unidirectional Na+ fluxes (J_{in}, J_{out} and J_{net}) and of Cl^- net fluxes were determined by a two-way ANOVA (fish species and pH levels were used as factors), followed by a posteriori Holm-Sidak test. A one-way ANOVA, followed by the a posteriori Dunnett's test, was used to determine the significance of differences in Na^+/K^+-ATPase and H^+-ATPase activities in gills of angelfish at pH 6.0 and over various times of exposure to pH 3.5. In all analyses, statistical significance was accepted at $P<0.05$.

RESULTS

Na^+ uptake kinetics

In both angelfish and discus, unidirectional Na^+ uptake showed saturation kinetics with increasing Na^+ concentration in water, at both neutral and low pH (Fig. 1). This kinetic characterization of branchial Na^+ uptake revealed that both angelfish and discus had relatively low and virtually identical Na^+ uptake capacities (J_{max}) at pH 6.0 (approximately 535 nmol g^{-1} h^{-1}, respectively) (Table 1). Furthermore, during short-term (3 h) exposure to pH 3.5, the estimated Na^+ J_{max} was almost 80% inhibited in both angelfish and discus. Regarding the affinity for Na^+ uptake, both species exhibited relatively high K_m values, well above the Na^+ concentration (31.0 µmol L^{-1}) in the INPA's well water to which they were acclimated. Discus showed a 3.3-fold higher K_m (i.e. much lower affinity for Na^+ uptake) than the angelfish at both pH 6.0 and 3.5 (Table 1). At low pH, both angelfish and discus showed a reduction of branchial affinity for Na^+ uptake (almost 2-fold increase in K_m), though this change was statistically significant only in angelfish. Thus, Na^+ uptake in the gills of angelfish was competitively (increased K_m) and non-competitively (decreased J_{max}) inhibited (Fig. 1A). While the same trends were seen in discus, only the non competitive inhibition

(decreased J_{max}) was significant (Fig. 1B).

Unidirectional and net Na^+ fluxes, and net Cl^- flux rates

These measurements revealed that overall angelfish were significantly less tolerant to low pH effects than discus at the acclimation water Na^+ (31.0 ± 1.2 μmol L^{-1}) and Cl^- (49.5 ± 0.7 μmol L^{-1}) concentrations (Figs. 2, 3, and 4). Although angelfish exhibited Na^+ J_{in} rates (on average 61.6 nmol g^{-1} h^{-1}) approximately 3-fold higher than discus at pH 6.0, Na^+ J_{in} in angelfish was on average 70% inhibited (on average 18.7 nmol g^{-1} h^{-1}) after acute exposure to pH 3.5 (Fig. 2), similar to what would be predicted (89% inhibition) by the Michaelis–Menten relationship [2] using the kinetic constants reported in Table 1. Surprisingly, no inhibition in Na^+ J_{in} rates was observed in discus after 6 h in pH 3.5 (Fig. 3; on average 19.0 nmol g^{-1} h^{-1}), whereas the Michaelis–Menten constants of Table 1 would have predicted an 88% inhibition. In addition, Na^+ J_{in} was significantly higher in angelfish over 6 h in pH 6.0 than in discus, while at pH 3.5 Na^+ J_{in} presented similar low rates for both fish species. In neutral pH, Na^+ J_{out} rates were almost 1.5 times higher in angelfish than in discus, but were not statistically different. Moreover, the effects of low pH exposure on Na^+ efflux rates were less apparent in discus. The exposure for 3 and 6 h to pH 3.5 significantly stimulated Na^+ J_{out} in angelfish over 2.3 and 2.7 fold, respectively, relative to rates at the same time at pH 6.0 (Fig. 2B). However in discus, Na^+ J_{out} was not changed at 0–3 h, and increased by 1.8 fold only at 3–6 h of low pH exposure (Fig. 3B). Note that the Na^+ J_{out} rates in angelfish were 3.4 and 2.2 fold higher than those in discus after exposure for 3 and 6 h to pH 3.5, respectively. Consequently, Na^+ J_{net} was significantly elevated in angelfish at pH 3.5,with increased Na^+ net losses of 4.0 and 6.2-fold at 0–3 h and 3–6 h, respectively (Fig. 2B). In contrast, as seen for Na^+ J_{out}, only at 3–6 h of exposure to low pH was there a significant 1.9-fold increase of Na^+ J_{net} in discus. The net losses of Na^+ in angelfish were also higher: 4.1 and 2.1 fold than those in discus after exposure for 3 and 6 h to pH 3.5, respectively. Net Cl^- flux rates exhibited a qualitatively similar trend, increasing by up to 3.7- and 2.1-fold in angelfish after 3 and 6 h of exposure to low pH, respectively, while the increases were about 1.5-fold in discus, and smaller on an absolute basis (Fig. 4). In addition, Cl^- J_{net} rates in angelfish were higher: 2.5 fold than those in discus after exposure for 3 h to pH 3.5.

Branchial Na^+,K^+-ATPase and H^+-ATPase activities

Despite the marked acute inhibitory effects of low pH exposure on branchial unidirectional and net Na^+ flux rates in angelfish, short term (3 h) exposure to pH 3.5 had no

significant effects on Na^+/K^+-ATPase activity (Fig. 4A). In contrast, H^+-ATPase activity in gills of angelfish was significantly inhibited by 67% and 53% after 2 h and 3 h of exposure to pH 3.5, respectively, with a non-significant decline at 1 h (Fig. 4B).

DISCUSSION

Overview

Our study has five major findings. Firstly, in accord with our original hypothesis, both angelfish and discus exhibited relatively high K_m systems (i.e. low affinities) for Na^+ uptake, with high sensitivity to inhibition by low pH, yet low intrinsic branchial permeability limiting diffusive ion losses, the same strategy as seen previously in other cichlids, and very different from the strategy of characids (Gonzalez and Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002, 2006). Thus, both angelfish and discus defend their Na^+ balance under acidic ion-poor conditions mostly through a strong control of the Na^+ efflux component. Secondly, for the first time we have shown that the Na^+ influx inhibition at low pH in cichlids is due to both competitive (increased K_m) and non-competitive inhibitions (decreased J_{max}). Thirdly, the observed acute reduction in H^+-ATPase activity, but not in Na^+/K^+-ATPase activity, in the gills of angelfish suggests a possible mechanism for this non-competitive inhibition at low pH. Fourthly, at circumneutral pH, the kinetic parameters for angelfish collected directly from Rio Negro "blackwaters" were remarkably similar to those previously reported in angelfish obtained from the North American aquarium trade (Gonzalez andWilson, 2001; Gonzalez et al., 2002). Finally, there were marked differences between these two cichlids. In angelfish, the inhibitory effects of low pH exposure on Na^+ uptake were more pronounced, in addition to greater stimulatory effects on branchial Na^+ and Cl^- permeability. In contrast, discus showed lesser impairment of Na^+ transport, at low pH presenting low Na^+ uptake rates that were very similar to those observed at neutral pH, in addition to better control of branchial Na^+ and Cl^- permeability

Na+ uptake kinetics

Gonzalez et al. (2002, 2006) have summarized kinetic parameters (K_m, J_{max}) of Na^+ uptake for a range of Amazonian teleosts under circumneutral conditions. The present results for angelfish and discus (Table 1) show K_m values in the range of other cichlids (e.g. *Apistogramma*, *Geophagus*, *Satanoperca*), and considerably higher than most other "blackwater" teleosts, particularly the characids. The angelfish K_m however appears to be at the lower end of the cichlid range, whereas the discus value is very typical. On the other hand,

J_{max} values for both species were in the range of both characids and other cichlids. The lower K_m in angelfish allows it to maintain higher Na^+ uptake rates than those of discus in natural ion-poor conditions, at least at circumneutral pH, but it also exhibits higher efflux rates (Figs. 2, 3). Thus, even within the cichlids, there is a range of variation between a more "characid-like" and a more "cichlid-like" strategy. Very similar K_m (74 μmol L^{-1}) and high efflux rates were also reported in the cyprinid zebrafish acclimated to soft water, a condition that greatly enhances the capacity and affinity for Na^+ uptake in this species (Boisen et al., 2003).

Notably the K_m and J_{max} values for angelfish were both very close to those reported by Gonzalez and Wilson (2001) and Gonzalez et al. (2002) for the same species cultured in North America. The present responses of unidirectional and net Na^+ fluxes to low pH were also very similar. Thus, an unknown period of time and/or generations under unnatural conditions seems to have had little impact on the branchial Na^+ transport physiology of *P. scalare*.

Unique to the present study is the finding that the inhibition of unidirectional Na^+ influx by low pH is due to both competitive and non-competitive inhibitions in the angelfish (Table 1). Model Michaelis–Menten calculations using the K_m and J_{max} values from Table 1 demonstrate that at the very low Na^+ concentration of the acclimation water (31 μmol L^{-1}), it is the non-competitive inhibition (decreased J_{max}) which has by far the larger impact in reducing unidirectional Na+ influx rate, as seen in Fig. 2. In discus, a similar large decrease in J_{max} (Table 1) should have comparably reduced unidirectional Na_+ influx in the acclimation water, but it did not (Fig. 3). The reason for this discrepancy is unclear, but one explanation comes to mind. The observed K_m (Table 1) was 9–17-fold higher than the Na^+ concentration in the acclimation water. Possibly, there may be a second, very high affinity (i.e. very low K_m) Na^+ transport system in discus that operates at very low water Na^+ concentrations and which is acid-resistant. This would have been missed by our kinetic analysis which started only at the acclimation Na^+ concentration. As all the other five points in the kinetic analysis were above this value, the error would be greatest in the low range. Such a system was reported by Frain (1987) in the salt-depleted minnow *Phoxinus phoxinus*. In addition, Gonzalez (1996) hypothesized that a high affinity exchanger for Na^+ in the apical membrane of ionocytes would counter for the competitive inhibitory effects of increased H^+ concentration at low pH.

Inhibitory effects of low pH exposure on Na+ uptake of freshwater fish are well documented (McDonald and Wood, 1981; Wright and Wood, 1985; Wood, 1992; Randall and Lin, 1993), and are usually explained on the basis of a competitive inhibition of Na^+ transport by increased H^+ concentration (Wood, 1989), and non-competitive inhibition through the reduction/reversal of the H^+ gradient across the apical membranes of ionocytes, consequently decreasing H^+ secretion, and promoting impairments of the Na^+ uptake mechanisms (Randall and Lin, 1993; Lin and Randall, 1995). This effect was clearly illustrated by Parks et al. (2008), that showed that under low external Na^+ concentration and acidic conditions, Na^+ uptake through an apical Na^+/H^+ exchanger driven by a basolateral Na^+/K^+-ATPase would function in the forward direction. The authors argued that another primary active transport is required for Na^+ uptake at low external Na^+ and pH, which probably occurs through a Na^+ channel electrically coupled H^+-ATPase. Thus, the present results reveal another potential mechanism for the non-competitive inhibition – a rapid reduction in H^+-ATPase activity (Fig. 5B), but not in Na^+/K^+-ATPase activity (Fig. 5A), in the gills of angelfish. Notably, Randall et al. (1996) speculated that inhibition of H^+-ATPase at low pH would promote a reversal in the apical membrane potential, making the inside of the cells more positive, thereby reducing Na^+ uptake through electrically coupled apical Na^+ channels. Perhaps related to this, a previous study on another Amazonian fish, the acid-tolerant tambaqui (*C. macropomum*) revealed a persistent reversal of the whole gill transepithelial potential (TEP) – i.e. electrical gradient from blood to water – at pHs below 4.0 and low external Ca^{2+} concentration (20 μmol L^{-1}); this was associated with increased net Na^+ losses as the blood side became more positive (Wood et al., 1998).

Branchial H+-ATPase activity

To our knowledge, the rapid reduction of branchial H+-ATPase activity (measured in vitro) upon acute exposure to low pH seen in angelfish (Fig. 5B) has not been reported previously in any other teleost fish. However, inhibition of H^+-ATPase activity has also been seen in another Amazonian cichlid fish *Mesonauta insignis* acutely exposed (1 h) to pH 4.0 under naturally acidic ion-poor conditions (R. M. Duarte and A.L.Val, unpublished data). Previous studies on salmonids have shown that this enzyme is sensitive to modulation by other environmental factors such as Na^+, Ca^{2+}, salinity, ammonia, and PCO_2 levels (Lin and Randall, 1993; Nawata et al., 2007; Wood and Nawata, 2011). The time course of the response to low pH (2–3 h; Fig. 5B) could reflect either a genomic effect or post-translational modifications as the internal milieu of the gill ionocytes is presumably altered at low pH.

Unfortunately, we were not able to estimate such changes in internal ionocyte pH, as well as the integrity of gill epithelium during low pH exposure. However, considering the natural history of this fish species at episodic acid conditions and the unchanged Na^+/K^+-ATPase activity (Fig. 5A), the reduction seen in H^+-ATPase activity unlikely involves gill damage or loss of ionocytes. According to Randall and Lin (1993), the negative potential in the inner apical membrane of ionocytes should build up when Na^+ uptake is inhibited, which eventually would stop the operation of H^+-ATPase on fish gills. Presumably it serves as a cost-saving strategy to reduce energy expenditure under conditions (very low external pH) where the H^+-pump can no longer function effectively.

Permeability

Responses of increased Na^+ efflux to acute low pH exposure were greater in angelfish than in discus, and occurred more rapidly. In contrast to the 2.5-fold increase of Na^+ J_{out} throughout the exposure to pH 3.5 in angelfish (Fig. 2), discus showed no stimulation in Na^+ J_{out} over the first 3 h, and almost 3-fold lower Na^+ efflux rates than angelfish at low pH (Fig. 3). Indeed the significantly greater Na^+ efflux at 6 h in discus was in fact very similar to that observed at 3 h in pH 3.5, and probably reflects the reduced Na^+ J_{out} measured at 6 h in pH 6.0 rather than an increase in branchial permeability in this species. The magnitude of Na^+ J_{out} in angelfish at low pH was very close to values previously reported in the North American cultured angelfish (Gonzalez and Wilson, 2001), and lower than that in two other Amazonian cichlids *Apistogramma* and *Geophagus* at low pH in natural Rio Negro water (Gonzalez et al., 2002). In addition, Na^+ J_{out} seen in both angelfish and discus was on average threefold and eightfold lower than that in acidic non-tolerant fish species as trout and common shiner at pH 4.0, respectively (Freda and McDonald, 1988). Therefore, it is likely that differences in the tolerance to low pH observed for Amazon fish and acidic non-tolerant fish species, as well as among the cichlid fish of the Amazon, are dependent on the ability to limit the increase in branchial permeability at low pH.

Although freshwater fish display a very tight gill epithelium to minimize passive ion losses (Evans et al., 2005; Hwang, 2009), at low pH, the increased external H^+ concentration is thought to compete with Ca^{2+} ions for binding to paracellular tight junctions, thereby rendering the branchial epithelium more permeable and resulting in stimulation of diffusive ion losses (McWilliams, 1982; McDonald et al., 1983b; Gonzalez et al., 2006). Thus, it is likely that discus have a tighter epithelium, which is more resistant to low pH effects on Na^+

efflux in ion-poor water than do angelfish. Interestingly, the net Cl^- flux results (Fig. 4) suggest that the permeability difference applies to anions as well as cations. In most teleosts, increases in water Ca^{2+} concentration generally protect against increased Na^+ effluxes at low pH (reviewed by Gonzalez et al., 2006), but Gonzalez et al. (1998) reported that 10-fold elevations of water Ca^{2+} had no protective action in three Rio Negro characids. In contrast, elevated Ca^{2+} levels reduced Na^+ efflux in both Amazon blackskirt and neon tetras at neutral pH, but the magnitude of this effect was lower in fish at pH 3.5 (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez and Preest, 1999). Thus, the picture that emerges is that native fish from Rio Negro posses gills with extremely low intrinsic permeability, which in turn would be strongly regulated by a high branchial affinity for Ca^{2+}, or alternatively displaying a Ca^{2+}-independent mechanism to control ion efflux at low pH. Future studies should address whether the apparent difference between angelfish and discus reflects the differences in Ca^{2+} dependency of permeability and/or in the binding affinity of the gills for Ca^{2+}.

Future perspectives

In future studies, it would also be of interest to examine longer-term effects of low pH exposure in these fish. Do H^+-ATPase activity and Na^+ influx recover? Does gill permeability decrease? Notably, zebrafish acclimated to acidic conditions for five days upregulated Na^+ uptake through an increased Na^+ J_{max} and K_m, and Na^+ balance was achieved by increased influx rather than reduced efflux (Kumai et al., 2011). The increased Na^+ uptake appeared to reflect an increased reliance on NHE (Kumai and Perry, 2011). Indeed such a mechanism appears to be particularly prominent not only for Na^+ uptake in the zebrafish (Kumai and Perry, 2011; Shih et al., 2012), but also for the Osorezan dace (Hirata et al., 2003) and larval medaka (Lin et al., 2012) when chronically exposed to low water pH in fresh water of relatively low Na^+ concentration. Strong thermodynamics arguments against operating an NHE at low water Na^+ at an external pH 3–4 units below that of the gill ionocyte have been raised (Randall et al., 1996; Parks et al., 2008). Nevertheless, evidence is accumulating that such a system can be driven by increased ammonia efflux through an Rh-protein/Na^+ uptake metabolon (summarized by Wright and Wood, 2012). Clearly future studies should investigate the role of ammonia excretion and Rh proteins in longer-term adaptation to low pH in these "blackwater" species.

Acknowledgments

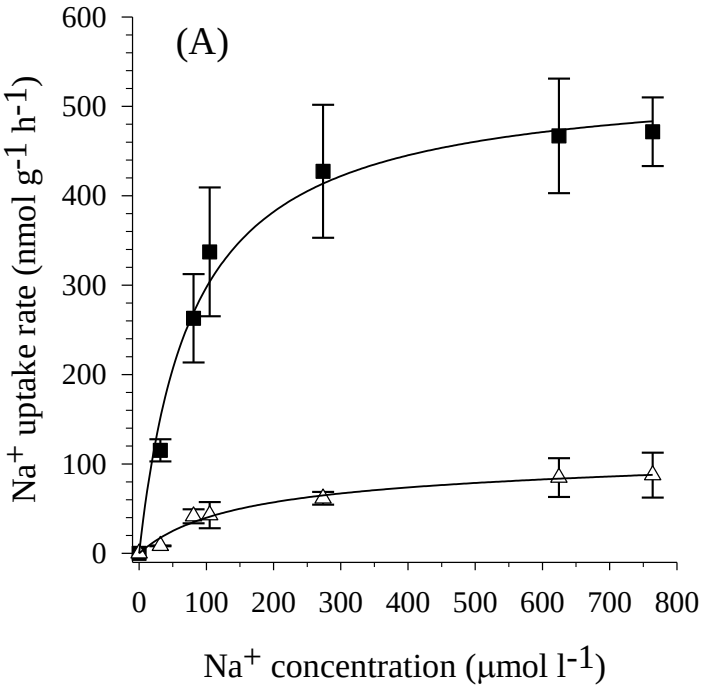
This study was funded by FAPEAM and CNPq through the INCTADAPTA grant to

ALV, and by an NSERC Discovery grant to CMW. ALV is a recipient of a research fellowship from CNPq. RMD was supported by the CAPES PhD fellowship. MSF is supported by the CNPq PhD fellowship. CMW is supported by the Canada Research Chair Program and a recipient of a fellowship to the Science without Borders program (CNPq-Brazil).

Table 1. Kinetic parameters for Na^+ uptake (J_{max} and K_m, mean±Sem) in Angelfish and Discus at neutral and low pH. * represents significant differences in Na^+ kinetic parameters between animals in neutral and low pH.

		Na^+ Kinetics assay			
Species	**Treatment**	**pH**	**$J_{máx}$ (nmol g^{-1} h^{-1})**	**K_m (μmol l^{-1})**	**R^2**
Angelfish	Neutral pH	5.9±0.20	533.6±23.6	79.3±12.9	0.98
	Low pH	3.5±0.04	106.1±7.8*	166.4±35.9*	0.98
Discus	Neutral pH	6.0±0.14	537.9±131.2	267.6±141.9	0.93
	Low pH	3.5±0.02	112.3±22.2*	516.5±181.3	0.98

Figure 1. Relationship between unidirectional Na^+ uptake rates (nmol g^{-1} h^{-1}) and Na^+ concentration in water for angelfish (A) and discus (B). Na^+ uptake rates in fish were measured at neutral pH (■) and at low pH (Δ). Means ± 1 SEM (N=6)



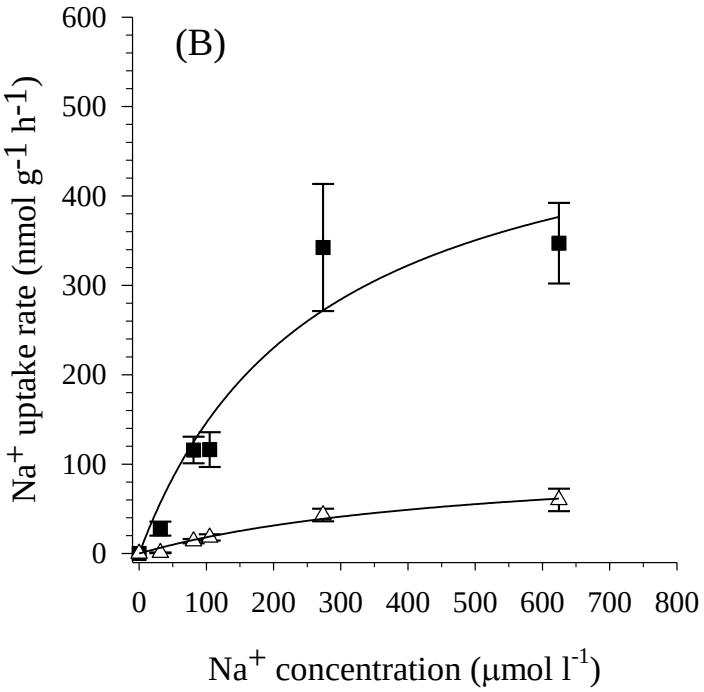


Figure 2. Unidirectional and net Na^+ flux rates of angelfish over 0-3 h and 3-6 h of exposure to neutral pH (A) and low pH (B). (*) Symbol represents significant differences in sodium influx (J_{in}) and net flux (J_{net}) between animals submitted to neutral and low pH at the related interval of exposure. (**) Symbol represents significant differences in sodium out flux (J_{out}) between animals submitted to neutral and low pH at the related interval of exposure. Means ± 1 SEM (N=6)

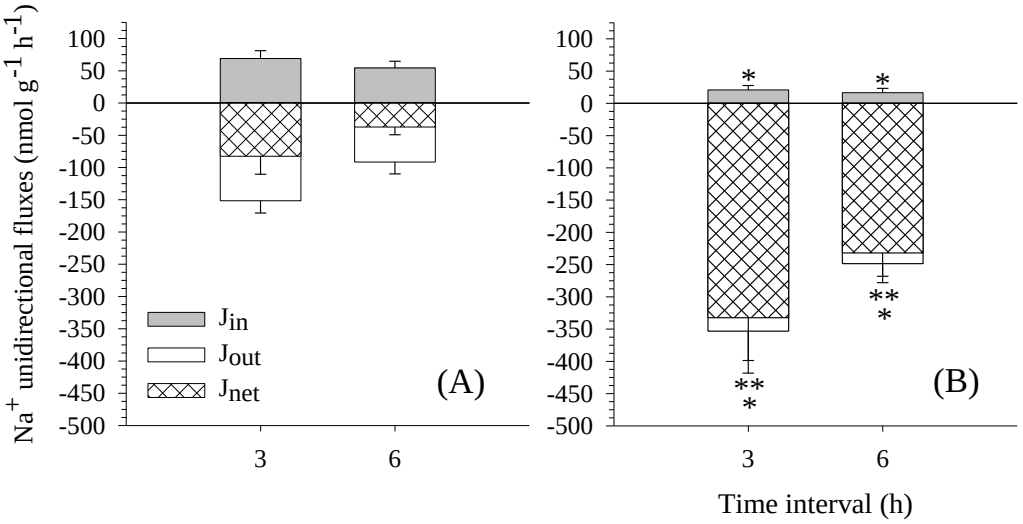


Figure 3. Unidirectional and net Na^+ flux rates of discus over 0-3 h and 3-6 h of exposure to neutral pH (A) and low pH (B). (*) Symbol represents significant differences in sodium influx (J_{in}) and net flux (J_{net}) between animals submitted to neutral and low pH at the related interval of exposure. (**) Symbol represents significant differences in sodium out flux (J_{out}) between animals submitted to neutral and low pH at the related interval of exposure. Means ± 1 SEM (N=6)

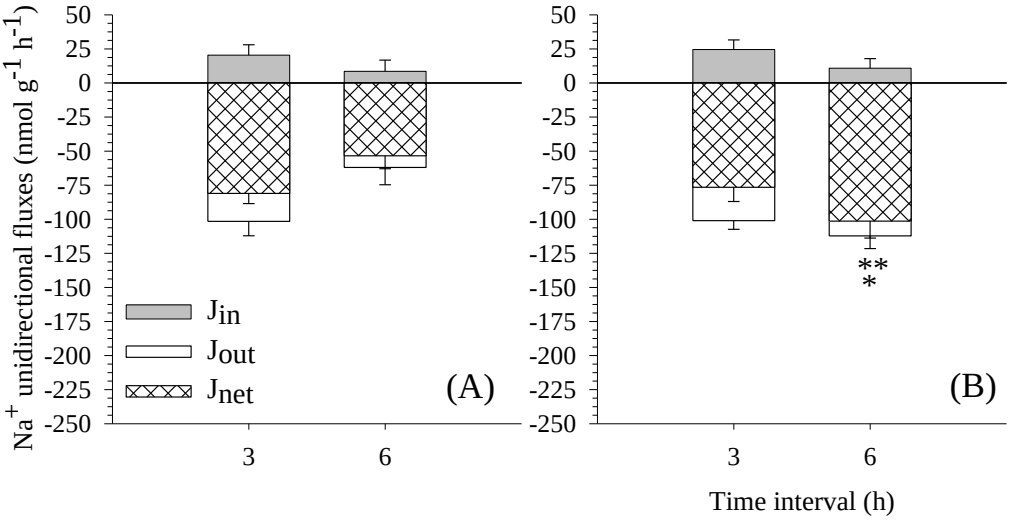


Figure 4. Net Cl- fluxes of angelfish over 0-3 h and 3-6 h of exposure to neutral pH (A) and low pH (B), and of discus over 0-3 h and 3-6 h of exposure to neutral pH (C) and low pH (D). (*) Symbol represents significant differences in net flux (J_{net}) between animals submitted to neutral and low pH at the related interval of exposure. Means ± 1 SEM (N=6)

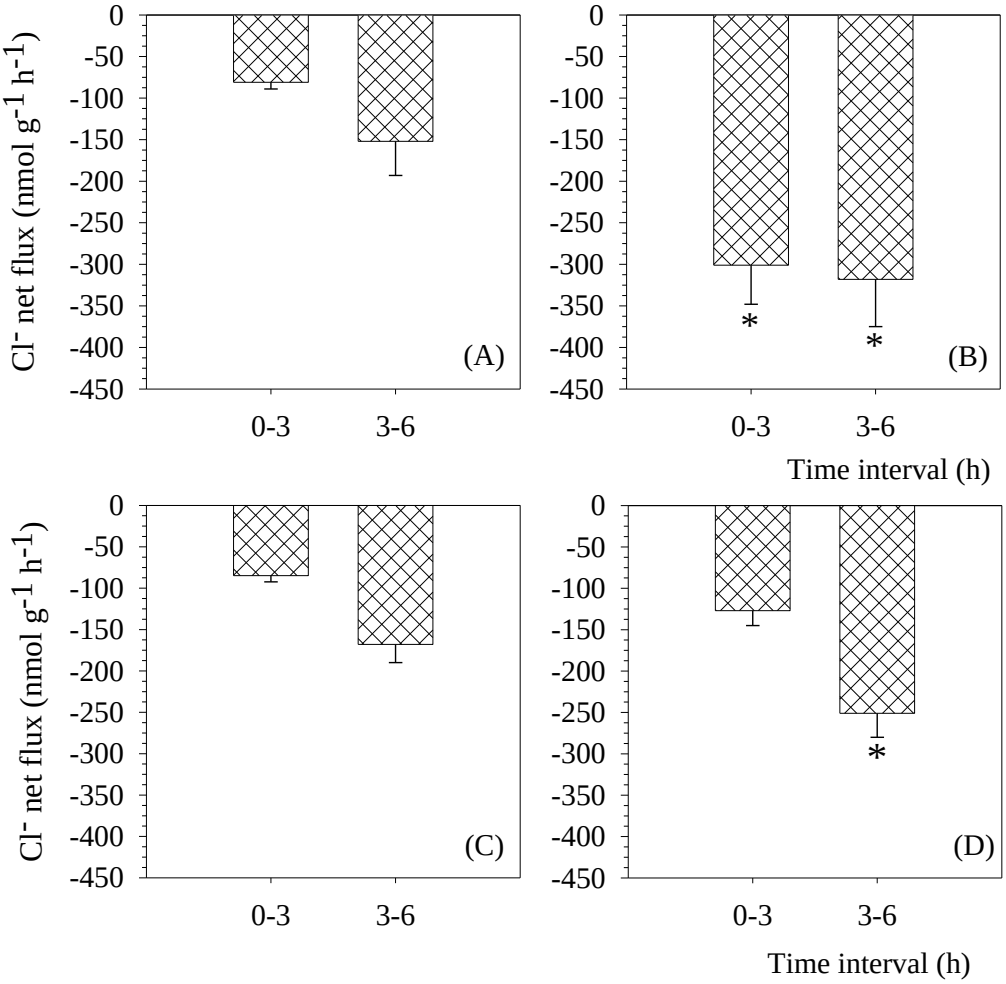
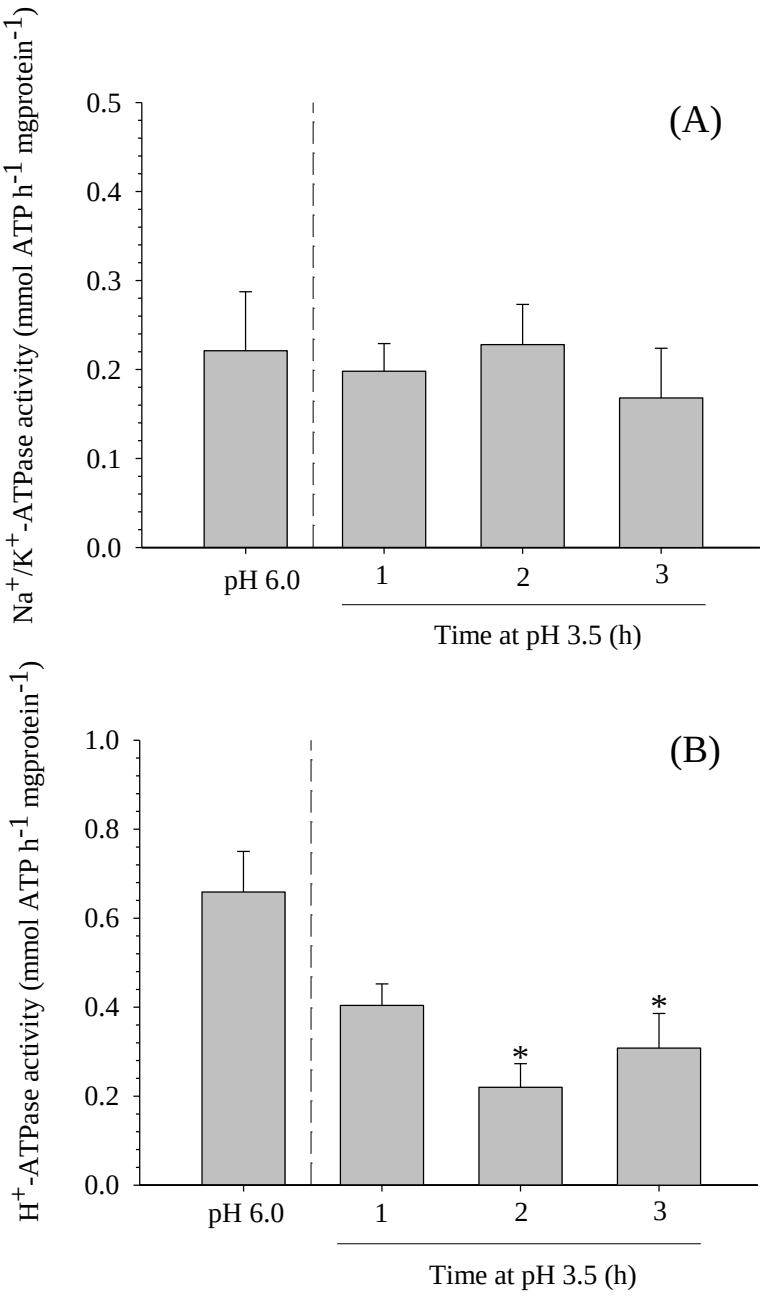


Figure 5. Branchial Na^+/K^+-ATPase (A) and H^+-ATPase (B) activities in angelfish acclimated to pH 6.0 and exposed for 3 h to low pH (3.5). (*) Symbol represents significant differences in ATPase activity from the pH 6.0 group. Means ± 1 SEM (N=6)



Manuscrito a ser submetido ao *Journal of Comparative Physiology B*

Na^+ regulation in gills of the Amazonian fish *Hyphessobrycon copelandi*: *in vitro* and *in vivo* responses to low pH and high temperature conditions.

INTRODUCTION

The current models for Na^+ uptake in gills of freshwater teleost fish evidence the presence of an apical Na^+ transport system coupled to acid secretion, once Na^+ is thought to be electroneutral exchanged by either NH_4^+ and/or H^+ (Evans 2011; Hwang et al., 2011). Two different pathways are mostly recognized to transport Na^+ across the gills: (1) *via* an amiloride-sensitive electroneutral exchanger (NHE) carrying out NH_4^+ instead H^+ ions, and (2) by the extrusion of H^+ through an bafilomycin-sensitive H^+-ATPase (VATPase) electrically linked to epithelial Na^+ channels (ENaC) (Kirschner, 2004; Hwang & Lee, 2007; Evans 2011; Hwang et al., 2011). In both model for Na^+ uptake, NKA in basolateral membrane of gill ionocytes is responsible to generate the electrochemical gradient for Na^+ movement across the apical membrane (Marshall, 2002; Kirschner, 2004; Evans, 2011). Recently, there have been several studies revealing that Na^+ uptake in gills of freshwater fish could be facilitated via an NHE antiporter coupled to ammonia excretion through Rhcg proteins (ammonia channels) (Wright & Wood, 2009; Kumai & Perry, 2011). Therefore, there are strong evidences for multiple pathways for Na^+ uptake in gills of freshwater fish, markedly modulated by the external environmental conditions, as acidity and low ionic strength (Yan et al., 2007; Shih et al., 2011; Kumai & Perry, 2011; Lin et al., 2012).

Flux measurements and kinetics analysis using radioisotopes revealed that Amazonian Characidae *Paracheirodon innesi*, *P. axelrodi*, *Hemigrammus* sp and *Gymnocorymbus ternetzi* have an specialized acidic-insensitive Na^+ transport mechanisms, presenting high affinity (low K_m) and capacity for Na^+ uptake (J_{max}) with strong resistance to effects of low pH (Gonzalez et al., 1997; Gonzalez & Preest, 1999; Gonzalez & Wilson, 2001). Furthermore, Na^+ influx in gills of neon tetra (*P. innesi*) was insensitive to four different blockers of NHE (amiloride related compounds), Na^+ channel (phenamil) and VATPase (vanadate), suggesting that different Na^+ transport mechanisms could be displayed by this acid-tolerant fish species (Preest et al., 2005). However, the specific pathways and

transporters involved in Na^+ transport mechanisms in gills of Amazonian characid fish remains unclear.

The Amazonian characid *Hyphessobrycon copelandi* is native from the Amazon basin with more than 100 registered occurrences throughout several water bodies from Brazil, Bolivia, Peru, Ecuador, Colombia and Suriname (GBIF, 2012). In most of these areas from Amazon basin, the water properties had been recognized as acidic ion-poor waters (Furch, 1984, Furch & Junk, 1997). In this natural water bodies temperature usually range from 25 to 32 °C (Barletta et al. 2010), but anthropogenic activities as deforestation (Bojen & Barriga, 2002) and global warm (IPCC, 2007) could promote increases in water temperature that will enhance the challenge of fish to Na^+ regulate, in order to maintain their internal ionic and acid-base status. The thermodynamic requirement for Na^+ transport in gills of freshwater fish at acidic ion-poor conditions supports Na^+ uptake through a ENaC electrically coupled to VATPase, not by the NHE exchanger (Parks et al., 2008). However, recent studies had demonstrated that in gills and skin of zebrafish NHE exerts an important role in branchial Na^+ transport mechanism and in acid-base regulation, particularly in fish reared at acidic and/or ion-poor conditions (Yan et al., 2007; Shih et al., 2011; Kumai & Perry, 2011). Given the uncertainties regarding Na^+ transport mechanism in gills of Amazonian fish, the first objective of the present study was to investigate functional properties of branchial NKA and VATPase of *H. copelandi* during *in vitro* exposure to low pH and high temperature. We also examined the effects of short-term exposure to low pH and high temperature on Na^+ regulation mechanisms in gills of *H. copelandi*. Finally, we test whether branchial NKA and VATPase are involved in acclimation of *H. copelandi* to acidic and high temperature conditions.

MATERIAL & METHODS

Experimental animals

Amazonian *H. copelandi* with an average of body mass of 0.71±0.07 g were purchased from Prestige Aquário (Manaus/AM, Brazil), and held in local well water at the laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution (LEEM, INPA). Water composition was approximately $[Na^+]$ = 31 μmol l^{-1}, $[Cl^-]$ = 30 μmol l^{-1}, $[K^+]$ = 10 μmol l^{-1}, $[Ca^{2+}]$ = 9 μmol l^{-1}, $[Mg^{2+}]$= 4 μmol l^{-1}, pH 6.0, temperature = 27 ^{0}C. All fish were maintained for one month under natural photoperiod and no fish mortality was observed during the acclimation period. Fish were fed dry food pellets (Nutripeixe, Purina) *ad libitum* up to at least 48 h before

starting the experimental period. All *in vivo* procedures followed INPA's animal care guidelines and were approved by INPA's animal care committee.

Experiment 1: In vitro effects of temperature and low pH on gill NKA and VATPase activities

Effects of temperature and pH on NKA and VATPase activities were evaluated during *in vitro* assay of gills of *H. copelandi* acclimated in INPA's well water. Fish (N=8) were killed with an overdose of buffered MS-222 (1 g l^{-1} MS-222 and 2 g l^{-1} $NaHCO_3$, Sigma Aldrich), and gills were excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80^{o}C prior the analyses of NKA and VATPase. Activity of ATPases in whole gills baskets were measured using the basic procedure described by Kültz & Somero (1995). The assay is based on the oxidation of reduced NADH by the enzyme reaction coupled to the hydrolysis of ATP. Briefly, frozen gill were homogenized in ice-cold SEID buffer (150 mM sucrose, 50 mM imidazol, 10 mM EDTA, 0.5% Na-desoxycholate, pH 7.5) at 1:10 wet sample mass to buffer volume. Crude homogenates were then centrifuged (4^{o}C, 2000 g) for 10 min and the supernatant was collected for the enzymatic assay. The supernatant (5 µl) was added to 12 wells of 96 well microplate and incubated in salt solution (30 mM imidazol, 45 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ $6H_2O^{-1}$, 0.4 mM KCN) on microplate reader (Spectramax Plus 384; Molecular Devices) for 5 min at 27 and 33^{o}C. After the incubation period, reaction solution (1.0 mM ATP, 0.2 mM NADH, 0.1 mM fructose 1,6 diphosphate, 2 mM PEP, 3 IU ml^{-1} PK and 2 IU ml^{-1} LDH) was added to the wells to start the assay. Four of twelve wells received reaction solution with 2 mM ouabain, while crude homogenate in other four wells received reaction solution with 2 mM N-ethylmaleimide. The pH of salt solution was adjusted to 8.5, 5.0 and 3.5 with 0.05 mM KCL. The rate of NADH oxidation was monitored every 10 s over 10 min at 340 nm in each experimental temperature and pH conditions. The difference in slope of NADH oxidation versus time reaction between reaction solutions inhibitors-free and inhibitors enriched (ouabain and N-ethylmaleimide) were used to determine NKA and VATPase activity, respectively. Both enzyme activities were presented as µmol h^{-1} mg $protein^{-1}$. Protein concentration in gills crude homogenates was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

Experiment 2: Effects of temperature and low pH on Na^+ regulation

Unidirectional flux of Na^+ (J_{in}, J_{out} and J_{net}), total ammonia net fluxes (J_{net}) and activities of NKA and VATPase were assessed in gills of *H.copelandi* during short-term (1 h)

exposure to pH 5.5 and 3.5, at both 27 and 33^{o}C, in INPA's well water. Fish (N=8 for each pH and temperature) were directly transferred to individual aerated chambers (50 ml) with the desired experimental solution, and allowed to recover for 1 h prior the assay. The experimental chambers for high temperature exposure were maintained in water-bath to better control the temperature. The pH of INPA's well water was adjusted to 5.5 and 3.5 with 0.05 mM HCl, while the water temperature was adjusted and maintained with thermostat-controlled heater. To start the experiments radioisotope ^{22}Na (PerkinElmer Life and Analytical Science) was added to each experimental chamber (0.27 μCi l^{-1}) to perform a 1 h flux period. No significant variation in water pH and temperature during the 1 h flux period was observed. Two water samples (10 ml) were taken at beginning of flux period and after 1 h to each experimental condition to determine ^{22}Na counting and total Na^+ and total ammonia concentrations. After the flux period, the procedures for gill sampling and assay of ATPases activity were done as described in section *Experiment 1*.

Experiment 3: Acclimation effects to high temperature and low pH on NKA and VATPase activities

Activities of NKA and VATPase were determined in gills of *H. copelandi* (N=8) acclimated for 15 days in INPA's well water adjusted to pH 5.5 or 3.5, at 27 or 33^{o}C. Thus, the animals were transferred to four 40 L experimental glass aquarium. To begin the acclimation to high temperature, INPA's well water temperature (27^{o}C) was increased 1^{o}C over 1 h period, and the animals were allowed to settle for 1 h to recovery. The procedure was sequentially repeated until water temperature reach 33^{o}C. Temperature and pH were monitored 3 times a day, and adjusted when necessary. After 15 days at each experimental condition, gills were sampled and ATPases activity assay were as described in section *Experiment 1*. No fish mortality was observed during the acclimation period.

Analytical techniques and calculations

Radioactivity in water samples was analyzed in 5 ml of aliquots mixed with 10 ml of Ultima Gold scintillation counting cocktail (PerkinElmer Life & Analytical Sciences), and determined using a liquid scintillation counting (LS6500; Beckman & Coulter, Fullerton, CA, U.S.A). Mean specific activity of the isotope (cpm μmol^{-1}) in water samples was determined as a relationship between of total Na^+ concentration and ^{22}Na radioactivity. Influx rates (J_{in};

nmol g^{-1} h^{-1}) were based on the amount of ^{22}Na isotope incorporated by the fish during the experimental periods at each pH level, and calculated as:

$$J_{in}=(cpm_i-cpm_f)V(SaTW)^{-1},$$

where cpm_i= isotope counting (cpm ml^{-1}) in the begging of flux period, cpm_f= isotope counting (cpm ml^{-1}) at the end of flux period, V=volume of water in experimental chamber (ml), Sa= mean specific activity of the isotope, T=flux period (h) and W= the wet mass of fish (g).

Net fluxes rates of Na^+ (J_{net}) were assessed by measuring the gain or loss of Na^+ from the fish to the water, and were calculated as:

$$J_{net}=(ion_1-ion_2)V\ (TW)^{-1},$$

where ion_1 and ion_2= were respectively the initial and final Na^+ concentration (μmol) in the experimental solution during the flux period, V=volume of water in experimental chamber (ml), T=flux period (h) and W= the wet mass of fish (g).

Efflux rates of Na^+ (J_{out}) were estimated by the difference between Na^+ net fluxes and influx rates ($J_{out}=J_{net}-J_{in}$). All calculations followed the equations described by Wood (1992). Ions concentration (Na^+, K^+, Ca^{2+} and Mg^{2+}) of INPA's well water and Na^+ content in the experimental solution were determined using flame atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst 800, PerkinElmer Singapore), while Cl^- and ammonia concentrations were determined spectrophotometrically (Spectramax Plus 384; Molecular Devices) by the mercuric thiocyanate method (Zall et al., 1956), and by sodium salicylate method (Verdouw et al., 1977), respectively.

Statistical analyses

All data are reported as means ± 1 SEM. A two-way ANOVA, followed by the *a posteriori* Dunnet test, was used to determine significant difference in NKA and VATPase activities in gills of *H. copelandi* in the *in vitro* assay, and after the short- and long-term exposure to different temperatures and pHs, as well as in Na^+ unidirectional fluxes and ammonia net fluxes. In all analysis the statistical significance was calculated as $P<0.05$.

RESULTS

In vitro effects of temperature and low pH on gill NKA and VATPase activities

There was no interaction between the effects of pH and temperature on *in vitro* NKA and VATPase activities in gills of *H. copelandi* (P=0.946 and P=0.217, respectively). At 27^{o}C, NKA activity was inhibited by 50% at pH 3.5, relative to pH 8.5 (P=0.015), whereas at 33^{o}C the *in vitro* exposure to pH 5.5 and 3.5 significantly reduced NKA activity in 55% (P=0.025) and 61% (P=0.014), respectively (Fig. 1A). No significant effects of temperature at different pH levels on NKA activity were seen in gills of *H. copelandi* (Fig. 1A). In contrast, increased temperature of incubation resulted in an inhibition of VATPase activity by 17% at pH 8.5 (P=0.008) and by 58% at pH 5.5 (P=0.019); however, incubation to pH 3.5 strongly inhibited VATPase by 90% even at 27^{o}C, and no significant differences were observed between both experimental temperatures on VATPase activity at the most acidic condition (Fig. 1B). The incubation to low pH markedly inhibited VATPase activity in gill of *H. copelandi*, at both experimental temperature. At 27^{o}C, VATPase activity was inhibited by 76% (P<0.001) and 87% (P<0.001) after incubation to pH 5.5 and 3.5, respectively, whilst at 33^{o}C VATPase was inhibited on average by 90% after incubation to both pH 5.5 and 3.5 (P<0.001) (Fig. 1B).

Short-term effects of temperature and low pH on Na^+ regulation

There is a strong effect of short-term exposure to 33^{o}C at acidic condition (pH 3.5) on gill ionoregulatory responses of *H. copelandi*. Unidirectional Na^+ fluxes measurements revealed that at high temperature Na^+ influx rates (J_{in}) were 60% stimulated (P=0.043) in gills of *H. copelandi* during short-term exposure to pH 3.5 (Fig. 2A). Interestingly, no significant differences of Na^+ influx rates were observed in fish exposed to pH 3.5, in comparison to pH 5.5, at 27^{o}C. In addition, no differences in Na^+ J_{in} were observed in gills of *H. copelandi* between the two experimental temperatures at pH 5.5. Efflux (J_{out}) and net flux rates (J_{net}) of Na^+ were also significantly stimulated by increased temperature up to 97% (P=0.002) and 92% (P=0.007), respectively, after short-term exposure to pH 3.5. In contrast to Na^+ J_{in} responses at 33^{o}C, short-term exposure to pH 3.5 also stimulated Na^+ J_{out} and J_{net} over 185% and 254% (P<0.001), respectively, in comparison with Na^+ J_{out} and J_{net} seen in fish at pH 5.5 (Figs. 2B and 2C). No stimulation of low pH exposure on Na^+ J_{out} and J_{net} were seen in *H. copelandi* at 27^{o}C. Interestingly, ammonia J_{net} was also stimulated by 92% (P=0.038) at 33^{o}C after short-term exposure to pH 3.5 (Fig. 3). In addition, at 33^{o}C, *H. copelandi* exposed to pH

3.5 showed a significant stimulation of ammonia J_{net} by 127% (P=0.017), in relation to fish at pH 5.5 (Fig. 3). As seen as in Na^+ efflux and net flux rates, exposure to low pH at 27°C had no effect on ammonia J_{net} in *H. copelandi*.

There was a markedly negative effect of short-term exposure to low pH on NKA activity in gills of *H. copelandi* at both temperature levels, with more than 32% (P=0.033) and 65% (P<0.001) inhibition of NKA activity, at 27 and 33°C, respectively (Fig. 4A). In addition, exposure to higher temperature significantly decreases NKA activity by 50% (P=0.028) at acidic condition (Fig. 4A). In contrast, the effects of temperature on VATPase activity in gills of *H. copelandi* were pH dependent. Short-term exposure to pH 5.5 increases VATPase activity by 93% (P<0.001) at 33°C. On the other hand, at acidic conditions, VATPase activity was inhibited by 63% (P<0.001) in gills of *H. copelandi* at 33°C (Fig. 4B). Moreover, at 33°C a significant decrease in VATPase activity by 73% (P<0.001) were seen in gills of *H. copelandi* exposed to pH 3.5, in relation to pH 5.5 (Fig. 4B). No differences in branchial VATPase activity were observed in fish after short-term exposure to pH 5.5 and 3.5 at 27°C.

Effects of acclimation to high temperature and low pH on NKA and VATPase activities

There is no significant interaction between pH and temperature effects on ATPases activities in gills of *H. copelandi* acclimated to low pH and high temperature. Acclimation to low pH caused a reduction of NKA activity at both analyzed temperatures, but the inhibition was higher at 33°C (43%; P=0.026) compared to 27°C (32%; P=0.012) (Fig. 5A). In addition, acclimation to higher temperature resulted in an inhibition of NKA activity by 30% (P=0.019) and 41% (P=0.039) at pH 5.5 and 3.5, respectively (Fig. 5A). In contrast, *H. copelandi* acclimated to pH 3.5 showed a significant increase of branchial VATPase activity of 137% and 46% at 27 and 33°C, respectively (Fig. 5B). Increased acclimation temperature had no effects on VATPase activity in gills of *H. copelandi* after long term exposure to both pH 5.5 and 3.5 (Fig. 5B).

DISCUSSION

The present study provided strong evidence for the presence of NKA and VATPase in the gills of the Amazonian *H. copelandi*. We also investigated the modulating effects of short- and long-term exposure to low pH and high temperature on branchial Na^+ regulation in fish. The results showed that the mechanisms for Na^+ transport in gills of *H. copelandi* seem to be markedly regulated by exposure to acidic warmed waters. In addition, it is likely that short- and long-term exposures to environmental challenges induce different Na^+ uptake pathways to maintain internal Na^+ homeostasis.

Effects of temperature and low pH on gill NKA and VATPase activities in vitro

The activity of ATPases of gills of *H. copelandi* in normal assay conditions (*i.e.* pH 8.5 and 27^{o}C) are quite similar to those reported to others freshwater teleost fish as trout (Lin & Randall, 1993) and goldfish (Houston & Mearow, 1982), but were almost 10-fold lower than that reported to brown trout following freshwater transfer (Tipsmark et al., 2002). We observed that *in vitro* NKA activity was more resistant to the inhibitory effects at low pH and high temperature incubation than VATPase. In a study of gill NKA properties of the freshwater acclimated *Anguilla japonica*, Ho & Chan (1980) showed that this enzyme presented the highest activity at pH 7.0. These authors also showed that *in vitro* exposure to pH 5.0 resulted in an inhibition of almost 80% of NKA activity. Busacker & Chavin (1981) also reported that NKA activity in gills of goldfish was completely inhibited during *in vitro* exposure to pH 5.5. In contrast, the temperature effects on *in vitro* NKA seem to be species-specific and regulated by acclimation temperature. In smallmouth bass (*Micropterus dolomieui*) acclimated to 13^{o}C the incubation of gill homogenates to 37^{o}C resulted in a significant increase of NKA activity in comparison to the enzyme activity at the acclimation temperature (Pfeiler, 1976). On the other hand, increase of incubation temperature to 41^{o}C had no effect on *in vitro* NKA activity of gill of goldfish acclimated to 15^{o}C, 25^{o}C and 35^{o}C (Houston & Mearow, 1982).

In vitro activity of VATPase in *H. copelandi* gills was markedly reduced by low pH exposure, which was marked at 33^{o}C. In skin and gills of zebrafish VATPase is distributed in H^+-ATPase rich cells (HR cells), a specific ionocyte that had been reported to be responsible for acid-secretion and Na^+ uptake in fish (Lin et al., 2006; Hwang & Lee, 2007; Hwang, 2009). Hirata et al. (2003) reported relatively low levels of transcription and VATPase protein

in gills of Osorezan dace (*Tribolodon hakonensis*) after acclimation to pH 3.5, suggesting that VATPase activity could be regulated on pH-dependent basis during the phosphorylation. Thus, it is possible that during *in vitro* low pH exposure the increased H^+ concentration in assay reaction could negatively control H^+ secretion by VATPase through the direct action of the increased H^+ levels on VATPase protein function. In addition, it is probable that the increased negative effect of low pH on *in vitro* VATPase at 33°C was promoted by temperature-related changes in this enzyme conformation impairing its function.

Effects of temperature and low pH short-term exposures on Na^+ regulation

Previous work reported no disturbances in Na^+ uptake during short-term exposure to low pH for some Amazonian characid fish (Gonzalez et al., 2006), and up regulation of Na^+ influx rates in *Nannostomus unifasciatus* (Duarte & Val, unpublished data), avoiding significant imbalances in their Na^+ homeostasis. Gonzalez & Preest (1999) reported that the neon tetra (*Paracheirodon innesi*) was able to survive indefinitely at pH 3.5, and had no inhibition in Na^+ uptake even during 6 h exposure to pH as low as 3.25. In addition, Gonzalez & Wilson (2001) showed that the congener fish species cardinal tetra (*P. axlerodi*) also presented mechanisms of Na^+ uptake insensitive to low pH exposure, with no disturbance in Na^+ J_{in} during serial short-term exposure to low pH. A similar strategy to maintain Na^+ homeostasis, based on increased Na^+ uptake rates, was also reported to zebrafish acclimated to ion-poor water (Boisen et al., 2003). Thus, the present data indicates the presence of a Na^+ transport mechanism in the gills of *H. copelandi* insensitive to short-term exposure to low pH, once this fish was able to maintain moderately high and similar Na^+ uptake rates at both pH 5.5 and 3.5 (around 500 and 400 nmol g^{-1} h^{-1}, respectively).

Interestingly, the moderately high Na^+ uptake rates seen in *H. copelandi* in low pH at 27°C were accompanied by no changes in both VATPase activity and ammonia excretion, while NKA activity was slightly reduced compared with fish at pH 5.5. Since the earliest report by August Krogh's (1939), Na^+ uptake in gills of freshwater fish is thought to occurs linked to ammonia excretion, through an antiporter Na^+/NH_4^+ or H^+ (NHE), supporting the idea of a coupling of Na^+ uptake and acid base regulation (Kirschnner, 2004; Hwang, 2009; Evans, 2011). However, according Parks et al. (2008), at acidic and low external Na^+, the thermodynamic requirement for Na^+ transport in gills of freshwater fish favors Na^+ uptake driven by the extrusion of H^+ through a bafilomycin-sensitive VATPase electrically linked to apical Na^+ channels (ENaC), once increased H^+ gradient would reverse NHE function

promoting Na^+ loss and H^+ loading into ionocytes. Gonzalez & Preest (1999) found that exposure to 0.1 mmol l^{-1} amiloride had a slightly negative effect on Na^+ uptake in gills of *P. innesi*, suggesting that Na^+ uptake mechanism insensitive low pH seen in neon tetra could involve both the VATPase coupled to Na^+ channels or through NHE. In a recent review, Evans (2011) pointed that the specific pathway for Na^+ uptake in gills of freshwater fish may be species specific and modulated by environmental stressors. Perhaps the specific mechanisms involved in the maintenance of high Na^+ uptake rates at acidic conditions in Amazon characid fish remain poorly understood, but it is likely from the present study that VATPase plays an important role in Na^+ transport mechanisms in gill of *H. copelandi* in acidic water at 27^{o}C.

Surprisingly, the effects of short-term exposure to high temperature on Na^+ transport mechanisms in gills of *H. copelandi* were seen only at acidic condition. Specifically, increased Na^+ J_{in} rates were accomplished by inhibition on both NKA and VATPase activities, whereas ammonia excretion was also significantly stimulated in fish exposed to high temperature at acidic water. In addition, branchial ATPases and ammonia excretion in fish acutely exposed to low pH at 33^{o}C were also significantly different from those estimated at pH 5.5. Despite the thermodynamic constraints limiting the function (Parks et al., 2008), there is an extensive molecular evidence of NHE on apical surface of fish gills, which supports the involvement of NHE exchanger on Na^+ uptake mechanism in gills of freshwater fish (Yan et al., 2007; Shih et al., 2011; Kumai & Perry, 2011; Lin et al., 2012). More recently, a new model for ammonia excretion linkage to Na^+ uptake and acid excretion had been proposed to non-tropical freshwater fish (Wright & Wood, 2009). In this model, ammonia excretion *via* an Rhcg protein in apical membrane of ionocytes facilitates Na^+ uptake through NHE exchanger, once Rhcg1 promotes the dissociation of H^+ and NH_3 from NH_4^+, and the accumulated H^+ gradient drives the Na^+/H^+ exchange via NHE (Wright & Wood, 2009). In addition, Kumai & Perry (2011) showed that the mechanisms for Na^+ uptake in gills of zebrafish was strongly modulated by low pH exposure, suggesting that an NHE3b coupled to Rhcg1 is a dominant pathway for Na^+ uptake in fish reared at acidic conditions. Furthermore, acclimation to low Na^+ content resulted in up regulation of nhe3b and rhcg1 expression in gills of adult zebrafish, while a concomitantly down regulation of atp6v1a, supporting the involvement of NHE and Rhcg in Na^+ uptake mechanism in gills of zebrafish (Shih et al., 2012).

Taken together, our data suggest that under short term acidic exposure at high temperature the major role of VATPase seems to be acid secretion and ammonia excretion; whereas it is likely that Na^+ uptake in gills of *H. copelandi* was mainly mediated by NHE. In contrast, increased VATPase activity occurring simultaneously with slightly, reduced ammonia excretion supports the involvement of VATPase in the maintenance of Na^+ uptake in gills of *H. copelandi* during short-term exposure to high temperature at pH 5.5.

Although impairments in branchial Na^+ passive movements in freshwater fish at low pH and high temperature had been previously reported (Gonzalez & McDonald, 1994; Kieffer & Tufts, 1996; Baldisserotto & Val, 2002), our data indicate that *H. copelandi* was able to control Na^+ diffusive efflux, with no stimulation of overall Na^+ losses, during short-term exposure to acidic waters at 27^{o}C, and to 33^{o}C at pH 5.5. Previous examination had demonstrated that some Amazonian characid fish, as *Colossoma macropomum* (Wood et al., 1998), *Paracheirodon innesi* (Gonzalez & Preest, 1999), *Hemigrammus* sp and *Carnegiella strigatta* (Gonzalez et al., 2002), could avoid the stimulation of Na^+ diffusive losses in acidic waters by controlling the branchial intrinsic permeability (Gonzalez et al., 2006). However, the analysis of Na^+ passive transport in gills of *H. copelandi* revealed that short-term exposure to high temperature at acidic condition markedly stimulated Na^+ diffusive movements, which results in a strong overall Na^+ loss. In addition, Na^+ J_{out} and J_{net} were also stimulated in fish acutely exposed to low pH at 33^{o}C, in relation to those found at pH 5.5. The control of paracelullar movements across freshwater fish gills is closely related to the properties of tight junctions proteins (Chasiotis et al., 2012), which seems to be influenced by environmental factors, as water chemistry condition (Chasiotis et al., 2009; Kwong et al., 2012).

There are several studies showing that in acidic waters the increased external H^+ concentration seems to compete with Ca^{2+} ions to binding to paracellular tight junctions, which renders brachial epithelium more permeable and stimulate ionic diffusive losses (McDonald et al., 1983; McDonald et al., 1989). In addition, temperature had a negative effect on the control of Na^+ efflux in gills of rainbow trout, suggesting that increased temperature could affect the fluidity of cell membrane, as well as promoting disruptions in tight junctions proteins structure that affect the ability to control the ion losses in fish (Gonzalez & McDonald, 1994). Thus, it is likely that increases in water temperature could enhance the negative effect of low pH (high external H^+ concentration) on the "tightness" of gill epithelium, particularly on the components of tight junctions complex, contributing

positively to the increased Na^+ losses seen in *H. copelandi* in acidic conditions at 33°C. Indeed, future studies focusing on the responses in expression and localization of tight junctions proteins in Amazon fish gills are needed to better understand the lower control on the branchial Na^+ diffusive movements displayed by *H. copelandi* during short-term exposure to high temperature in acidic waters.

Effects of acclimation to high temperature and low pH on NKA and VATPase activities

Long-term environmental challenge seems to modulate the entire functional capacity of gill ionocytes in freshwater fish, particularly through alterations of expression and activities of transporters to maintain their internal ionic homeostasis (Hwang et al., 2011). The inhibitory effects of long-term exposure to low pH or high temperature on ATPases activity in gills of freshwater fish have been extensively analyzed (McDonald & Wood, 1981; Saunders et al., 1983; Freda & McDonald, 1988). In *H. copelandi*, the response of branchial NKA and VATPase to the acclimation regime was substantially modulated by water pH, whereas the effects of high temperature acclimation were seen only on NKA activity. Acclimation to pH 3.5 significantly inhibited NKA activity in gills of *H. copelandi*, as well as acclimation to high temperature at both analyzed pH. In addition, the magnitude of the inhibitory effects of high temperature on NKA was marked in fish acclimated to acidic conditions.

It has been previously demonstrated that environmental temperature could affects cellular lipid composition, which in turn promote changes in membrane fluidity, which are expected to influence the activity of some membrane-bound enzyme (Hazel & Prosser, 1974), as the branchial NKA. Metz et al. (2003) showed that the specific NKA activity in gills of common carp acclimated to 29°C were significantly reduced compared to those acclimated to 15°C. The authors suggested that the temperature-dependent inhibition of NKA activity in gills of common carp results from both the thermo-instability of NKA proteins in branchial membrane of fish, and/or by the different activity of NKA isozymes presented in fish gills (Metz et al., 2003). Liao et al. (2009) identified four different isoforms of NKA α1 sub-unit differentially expressed in ionocytes of gills/skin of zebrafish that are strongly regulated by the ionic composition of external environment. However, no information about the presence and properties of different NKA isoforms in gills of Amazonian fish, and their regulation by environmental factors, are available to test this hypothesis.

Although NKA activity had been firmly established as the main component for Na^+ transport in ionocytes of freshwater organisms (Kirschner, 2004, Evans et al., 2005; Evans, 2011), recent studies had demonstrated that Na^+ extrusion could be mediated by others transporters, as the co-transporter Na^+/HCO_3^- (NBC) (Hwang & Lee, 2007; Evans, 2011). Parks et al. (2007) showed that in isolated MR cells from rainbow trout gills Na^+ efflux in PNA^- cells was mediated by NBC. Increased levels of NBC1 transcripts were also seen in rainbow trout during respiratory acidosis (Perry et al., 2003). Furthermore, in the acidic tolerant *Osorezan dace*, the abundance of both NKA and NBC mRNAs were strongly up regulated after acclimation for seven days to pH 3.5 (Hirata et al., 2003). There are no data available on the existence of NBC in Amazonian fish gill ionocytes. However, the response of NKA to acidic and high temperature conditions, during both short- and long-term exposure, suggests that this enzyme could not play a central role in Na^+ uptake as expected. Immunohistochemical and molecular studies are needed to verify the presence and localization of NBC in the gills of Amazonian fish, and their functional linkage with apical Na^+ uptake, particularly in fish under acidic conditions.

On the other hand, the response of VATPase in the gills of *H. copelandi* was opposite between short- and long-term exposure to low pH. Although VATPase activity had been strongly inhibited during short-term exposure to pH 3.5, acclimation to acidic condition markedly up regulated VATPase in gills of *H. copelandi*. There are recent evidences of VATPase involvement in Na^+ uptake and acid secretion in the gills of freshwater fish (Hwang, 2009). In rainbow trout gills only PNA^- MR cells showed a bafilomycin sensitive Na^+ uptake that was demonstrated to occur via an apical phenamil-sensitive Na^+ channel (Parks et al., 2007). Lin et al. (2006), analyzing molecular and electrophysiological data, identified a group of ionocyte rich in H^+-ATPase (HR cells) responsible for H^+ outward in skin of zebrafish larvae. Moreover, impairments in acid secretion and ion balance were seen in mutants of zebrafish embryos after knockdown of *atp6v1a* gene (Horng et al., 2007). In addition, adult zebrafish acclimated to acidic conditions shows up regulation of *atp6v0c*, whereas *znhe3b* was down regulated (Yan et al., 2007). Taking all these findings together, it is likely that also in the gills of the Amazonian *H. copelandi* VATPase exerts a important role in the maintenance of Na^+ uptake, as well as in acid secretion, particularly during prolonged exposure to acidic environments.

In summary, flux measurements and enzymatic analysis of Na^+ regulation responses in the gills of *H. copelandi in vitro*, and after short- and long-term exposure to low pH and increased temperature resulted in new questions rather than answering old ones. *In vitro* analysis revealed that both NKA and VATPase responded negatively to low pH, while VATPase was also affected by high temperature incubation. However, NKA in the gills of *H. copelandi* seems to be more resistant to *in vitro* low pH exposure than other freshwater teleost fish. Furthermore, there are strong evidences that Na^+ regulation mechanisms in gills of *H. copelandi* were strongly and differentially modulated by short- and long-term exposure to low pH and high temperature. It is likely that both NKA and VATPase are involved in Na^+ transport mechanisms during short-term exposure to pH 5.5 at both analyzed temperatures. However, the role of NKA in Na^+ uptake seems to be reduced after either short- or long-term exposure to acidic conditions, at both analyzed temperatures. In contrast, our data suggest that VATPase exerts a fundamental role in branchial Na^+ transport in fish under short- and long-term exposure to low pH, particularly at 27^{o}C. Moreover, it is likely that an additional Na^+ transport mechanism is present in the gills of *H. copelandi* at high temperature condition, particularly during short-term exposure to pH 3.5 and in fish acclimated to pH 5.5, which would be driven by other Na^+ transporters like NHE and NBC. Further examinations of the molecular mechanisms regarding Na^+ uptake in gills of *H. copelandi* would shed light on the mechanism involved with the maintenance and stimulation of branchial Na^+ transport, particularly under environmental challenges, as low pH and increased water temperature.

Acknowledgements

Funded by FAPEAM and CNPq through INCT-ADAPTA grant to ALV. ALV is a recipient of a research fellowship from CNPq. RMD is supported by CAPES PhD fellowship.

Figure 1. Effects of pH and temperature of incubation on *in vitro* Na^+,K^+-ATPase (A) and H^+-ATPase (B) activity in gills of *H. copelandi* (Values are mean±SEM, N=8). Different lower and uppercase letters represent significant differences ($P<0.05$) in both enzymes activities between pH levels, at 27 and 33°C, respectively. (*) Symbol represents significant difference ($P<0.05$) of *in vitro* ATPase activity at 27 and 33°C at each pH level.

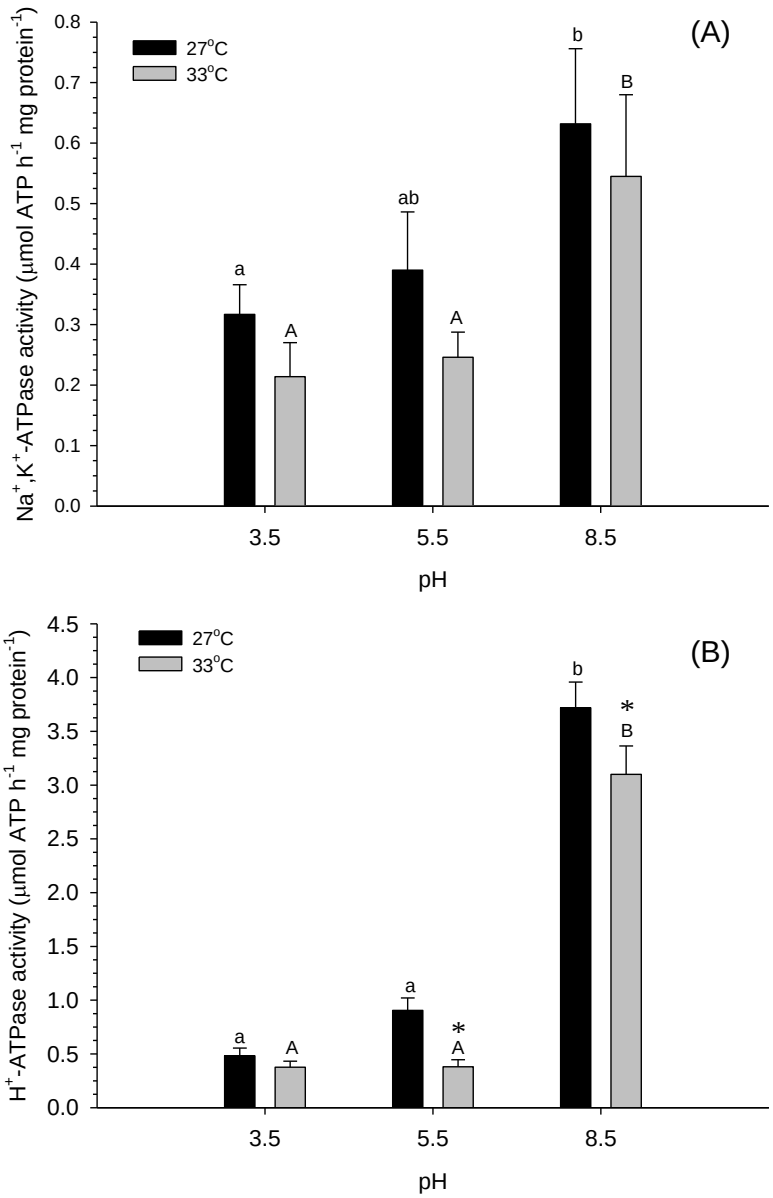


Figure 2. Effects of short-term exposure to pH 5.5 and 3.5 at 27 and 33°C, on Na^+ influx (A), efflux (B) and net flux (C) rates in *H. copelandi* (Values are mean±SEM, N=8). Different lower and uppercase letters represent significant differences ($P<0.05$) in Na^+ fluxes between pH levels, at 27 and 33°C, respectively. * represents significant differences ($P<0.05$) of Na^+ fluxes between 27 and 33°C at each pH level.

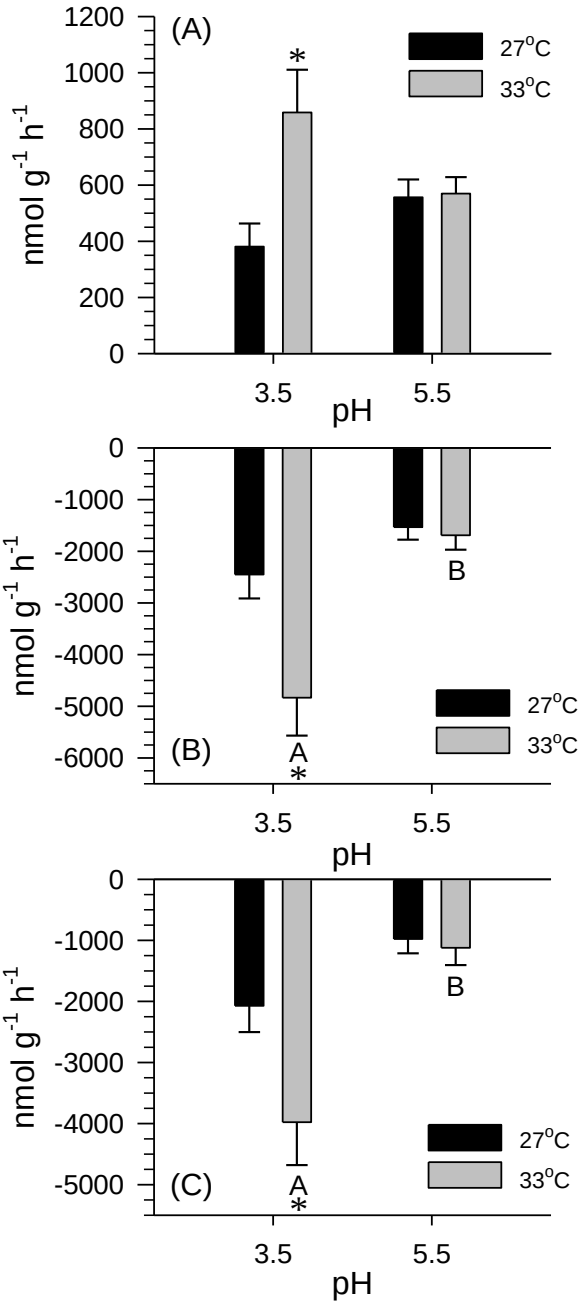


Figure 3. The effects of short-term exposure to pH 5.5 and 3.5, at 27 and 33^{o}C, on total ammonia net flux in *H. copelandi* (Values are mean±SEM, nmol g^{-1} h^{-1}, N=8). Different lower and uppercase letters represent significant differences (P<0.05) in ammonia net flux between pH levels, at 27 and 33^{o}C, respectively. (*) Symbol represents significant differences (P<0.05) in ammonia net flux between 27 and 33^{o}C at each pH level.

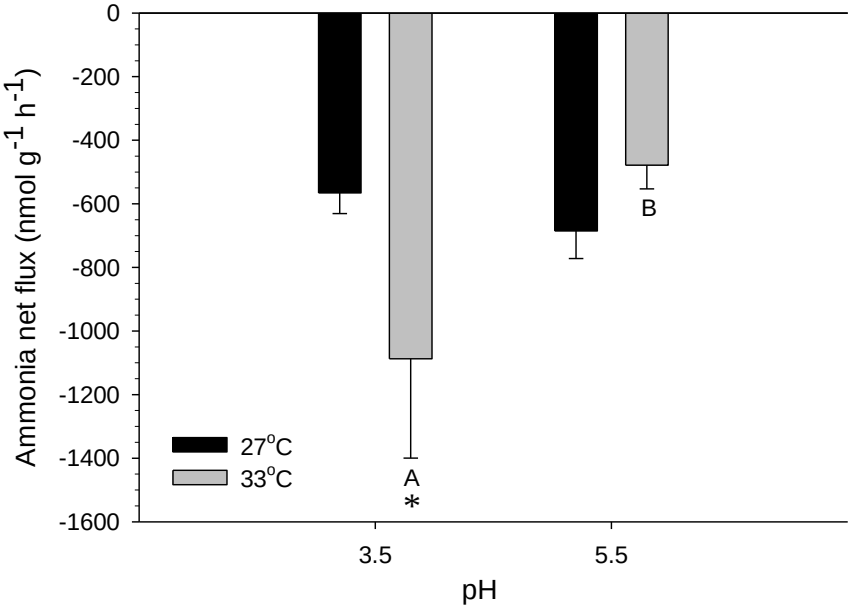


Figure 4. The effects of short-term exposure to pH 5.5 and 3.5, at 27 and 33°C, on Na^+,K^+-ATPase (A) and H^+-ATPase (B) activity in gills of *H. copelandi* (Values are mean±SEM, μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$, N=8). Different lower and uppercase letters represent significant differences (P<0.05) in ATPase activity between pH levels, at 27 and 33°C, respectively. (*) Symbol represents significant differences (P<0.05) in ATPase activity between 27 and 33°C at each pH level.

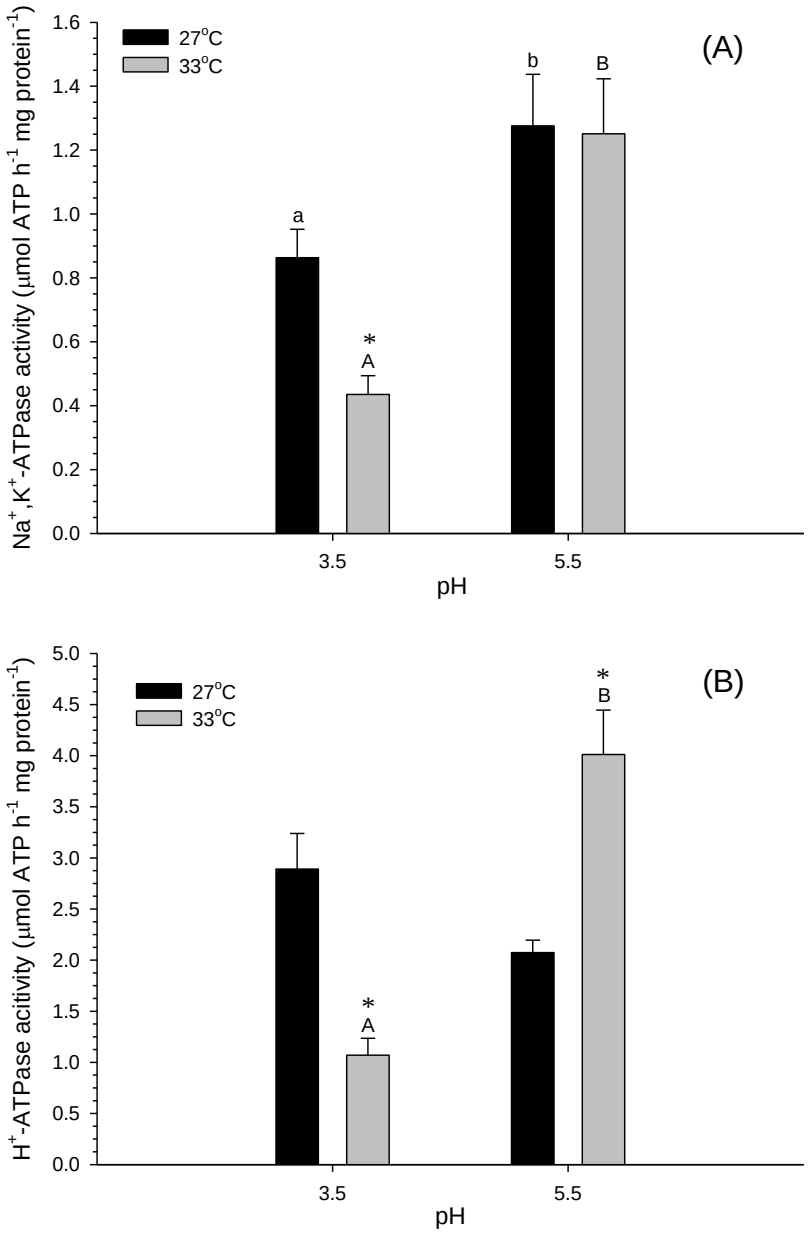
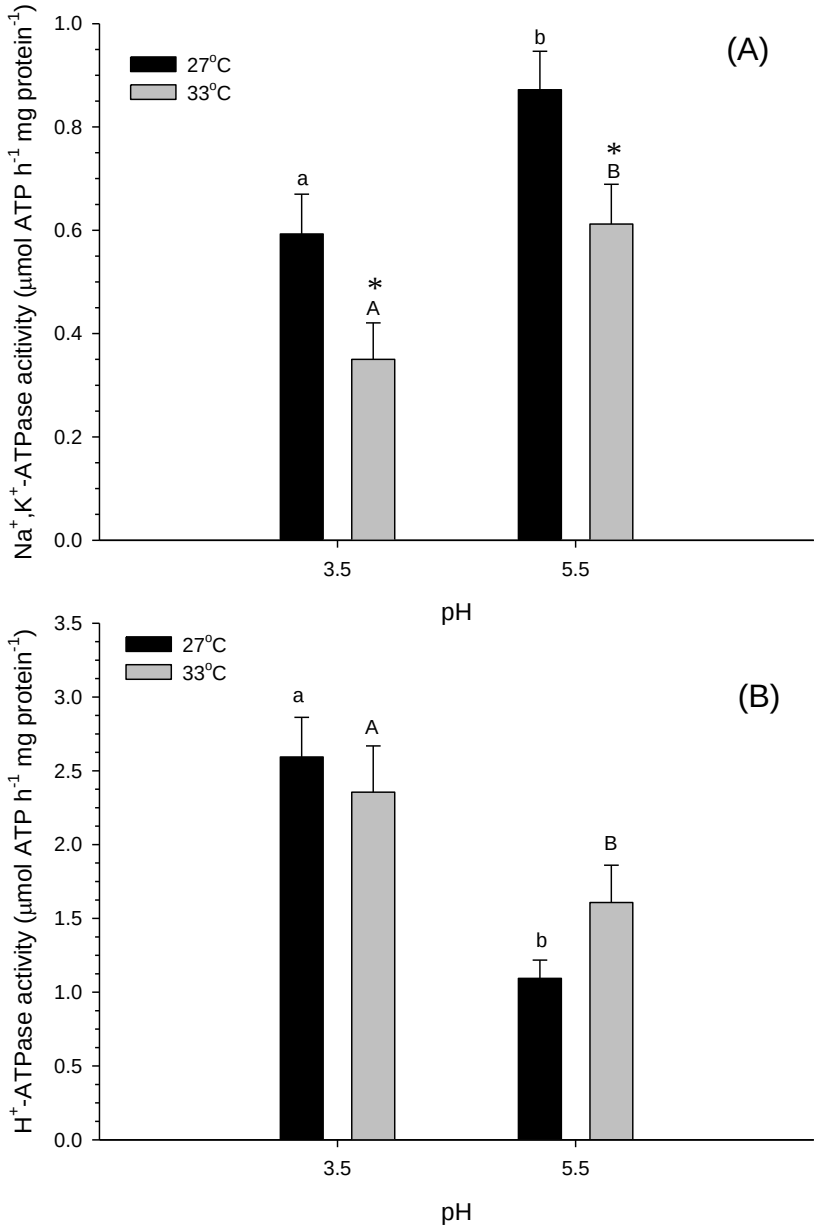


Figure 5. The effects of long-term exposure to pH 5.5 and 3.5, at 27 and 33°C, on Na^+,K^+-ATPase (A) and H^+-ATPase (B) activity in gills of *H. copelandi* (Values are mean±SEM, μmol ATP h^{-1} mg $protein^{-1}$, N=8). Different lower and uppercase letters represent significant differences (P<0.05) in ATPase activity between pH levels, at 27 and 33°C, respectively. (*) Symbol represents significant differences (P<0.05) in ATPase activity between 27 and 33°C at each pH level.



CAPÍTULO 2. PADRÕES IONOREGULATÓRIOS DE SETE ESPÉCIES DE PEIXES DE IGARAPÉS DE UMA MICROBACIA DE DRENAGEM DA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA

1. INTRODUÇÃO

As áreas de terra firme da Amazônia Central abrigam uma rede intrincada de nascentes e pequenos corpos d'água, localmente chamados de igarapés, que compõem boa parte da área de drenagem dos grandes rios da região, em especial da bacia do Rio Negro. Esses ambientes são densamente cobertos pelo dossel das árvores da floresta marginal, o que reduz a penetração de luz e limita a produtividade primária desses sistemas aquáticos (Junk & Furch, 1985). Além disso, os igarapés da bacia do Rio Negro drenam uma área geologicamente antiga, formada por solos altamente intemperizados do Terciário e Quaternário, o que reflete na composição físico-química singular desses ambientes aquáticos (Dias et al., 1980). As águas dos igarapés da bacia do Rio Negro são reconhecidas pela extrema acidez (pH entre 3,5 e 4,5), baixa disponibilidade iônica (condutividade entre 10 e 20 (μS cm-^{1}), altas concentrações de COD (entre 10 e 35 mgC l^{-1}) e oxigênio dissolvido (> 5,0 mg O_2 l^{-1}), e grande estabilidade térmica (entre 23 e 26 ^{o}C) (Walker, 1995; Lowe-McConnel, 1999), sendo estas propriedades físicas e químicas também influenciadas diretamente pelo regime hidrológico local (Melo et al., 2006; Ferreira et al., 2012).

Estes pequenos corpos d'água da Amazônia abrigam uma ampla diversidade de peixes, podendo ser encontradas de 20 a 50 espécies em um único igarapé (Sabino & Zuanon, 1998; Anjos 2007; Galuch, 2007). A ictiofauna nesses igarapés é composta principalmente por pequenos Characiformes, que representam até 70% da riqueza local de peixes, e também por Siluriformes, Gymnotiformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Synbranchiformes (Anjos, 2005, Mendonça et al., 2005; Espirito-Santo, 2007). A estrutura das comunidades de peixes nos igarapés da bacia do Rio Negro tem sido relacionada a características hidrológicas e morfométricas ao longo do gradiente (contínuo) fluvial (Anjos, 2005; Carvalho, 2008), à variação sazonal dessas características entre os períodos de chuva e estiagem (Espirito-Santo, 2007) e, também, a alterações nas características estruturais, aliada a modificações na qualidade da água dos igarapés decorrentes do processo de fragmentação da floresta marginal e/ou poluição desses ambientes (Anjos, 2007). Contudo, informações sobre os ajustes fisiológicos relacionados à adaptação dessa grande diversidade de espécies de peixes às

condições ambientais peculiares dos igarapés de terra firme, particularmente às condições extremas de hipotonicidade e acidez do meio, permanecem escassas.

Uma vasta literatura tem evidenciado que os peixes de água doce respondem a variações na composição do meio aquático, naturais ou induzidas por ação antrópica, em diversos níveis da organização biológica, como comportamento, mecanismos fisiológicos e bioquímicos, e expressão gênica (Hochachka & Somero, 2002; Marshall, 2002; Scott et al., 2004; Gonzalez et al., 2006; Hwang & Lee, 2007; Hwang, 2009). Entre as principais respostas relacionadas à adaptação de diferentes espécies de peixes a ambientes ácidos e hipotônicos, destacam-se os ajustes nos mecanismos de transporte branquial de Na^+, uma vez que estes atuam diretamente na manutenção do equilíbrio iônico e ácido-base dos peixes (Wilson et al., 1999; Boisen et al., 2003; Gonzalez et al., 2002; Scott et al., 2004; Matsuo & Val, 2007, Hwang et al., 2011). Contudo, trabalhos de fisiologia comparada, baseados nas premissas do princípio de August Krogh (1929), avaliando a variação de respostas no transporte branquial de Na^+ dos peixes em função das condições do ambiente, assim como a relação dessas respostas com o "fitness" das espécies a essas condições, têm sido conduzidos com o intuito de determinar os mecanismos básicos ligados ao funcionamento, localização e quantificação dos transportadores iônicos e suas isoformas (para detalhes ver Hwang & Lee, 2007; Hwang, 2009; Hwang et al., 2011).

Por outro lado, Gaston e colaboradores (2009) destacaram a importância fundamental de abordagens multidisciplinares que conectem aspectos de diferentes áreas da pesquisa biológica, como a ecologia e a fisiologia, para a avaliação da variação de caracteres biológicos durante o processo de adaptação às condições ambientais naturais. Dessa forma, novas formas de investigação baseadas no estabelecimento de padrões de resposta de caracteres fisiológicos em escala temporal e geográfica, além das implicações ecológicas dessas respostas, têm norteado os estudos em macrofisiologia (Chown et al., 2004; Gaston et al., 2009). Nesses estudos, o principal foco são os processos relativos (1) ao estabelecimento de padrões de respostas fisiológicas; (2) a determinação da forma desses padrões; e (3) ao entendimento dos mecanismos que dão origem a essas respostas (Wilson, 1988; Gaston et al., 2009). Assim, as respostas de mecanismos fisiológicos, em escala temporal e geográfica, estão diretamente relacionadas a variações intraespecíficas (que abrangem os ajustes nos caracteres fisiológicos em função dos gradientes ambientais), interespecíficas (com interesse no padrão de resposta entre as diferentes espécies submetidas às mesmas condições

ambientais), e nas assembleias (relacionados à estrutura das assembleias em função do tempo e/ou localização), refletindo as relações evolutivas dos caracteres fisiológicos entre diferentes populações e espécies às condições ambientais particulares (Gaston et al., 2009).

Assim, neste capítulo, foram determinadas as respostas na atividade das enzimas NKA e VATP nas brânquias de sete espécies de peixes comumente encontradas em igarapés de terra firme, evidenciando os padrões de resposta nos mecanismos de transporte de Na^+ em função das variações espaciais e temporais das características físicas e químicas da água dos igarapés.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2.1. Área de estudo

As coletas foram realizadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD; S02^{o}53', W59^{o}58'), pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e localizada na porção norte da cidade de Manaus. O clima na região da cidade de Manaus é classificado como Afi, com base no sistema de classificação de Köpen, que corresponde a clima tropical (A), com chuvas durante o ano todo (f; períodos de estiagem com precipitação acumulada maior que 50 mm) e com pequenas oscilações anuais na temperatura média (i) (Ribeiro, 1976). A área de drenagem da RFAD é formada basicamente por pequenos igarapés que compõem duas bacias hidrográficas principais, separadas no sentido norte-sul pela presença de um platô central (Fig. 1). Na porção oeste da RFAD são reconhecidas três micro bacias (Acará, Bolívia e Sabiá), formadas por igarapés que drenam para o Rio Negro, enquanto na porção leste da reserva os igarapés drenam para o Rio Puraquequara, um afluente do Rio Amazonas, sendo também reconhecidas três micro bacias (Tinga, Uberê e Ipiranga). Para a realização deste estudo, a amostragem da ictiofauna foi realizada em igarapés pertencentes apenas à micro bacia do Acará (Fig. 1).

2.2. Coleta de dados

As expedições de coleta na RFAD aconteceram durante os meses de fevereiro e setembro de 2011, representando os períodos de alta e baixa pluviosidade na área da RFAD[1],

[1] Para efeito comparativo, os períodos de alta e baixa pluviosidade foram categorizados como chuvas e estiagem, respectivamente.

respectivamente. Os valores médios de precipitação acumulada (mm) e temperatura (^{o}C) da área da EMBRAPA Amazônia Ocidental, a cerca de 2 km da RFAD, foram utilizados como referência para a área de estudo (Fig. 2), informações essas gentilmente cedidas pelo Dr. Isaac Cohen. Como pontos amostrais, foram selecionados 14 igarapés (Fig.1), sendo seis desses escolhidos com base em estudos prévios sobre a composição da sua ictiofauna (Mendonça et al., 2005; Espirito-Santo et al., 2007). Por dificuldades práticas encontradas durante as coletas no período de estiagem, e que poderiam influenciar na resposta final das enzimas, os exemplares de cada espécie coletados em dois dos igarapés (P09 e P12) não foram utilizados nas análises posteriores.

2.2.1. Variáveis ambientais dos igarapés

As medidas de pH, condutividade ($\mu S.cm^{-1}$), oxigênio dissolvido ($mg.l^{-1}$) e temperatura (^{o}C) foram realizadas em sete pontos ao longo do trecho de coleta (entre 50 e 100 m) em cada igarapé. O pH da água foi medido com um pHmetro portátil (YSI pH-100), enquanto a condutividade, O_2 e temperatura foram aferidas com uma sonda multiparamétrica (YSI 85-10FT). Para caracterização da composição iônica da água dos igarapés foram retiradas duas amostras (50 ml cada) por trecho, enquanto que para determinação da concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) foi retirada apenas uma amostra (300 ml). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente durante o transporte até a base da RFAD, sendo posteriormente acondicionadas em geladeira a -4 ^{o}C até o momento das análises. Todo o procedimento de coleta das variáveis ambientais foi realizado antes da captura da ictiofauna, com o intuito de evitar oscilações nas características físicas e químicas da água nos igarapés geradas pelos procedimentos de amostragem.

2.2.2. Coleta da Ictiofauna

Para a coleta da ictiofauna foram utilizados dois apetrechos, puçás ou rapichés e redes de arrasto com tamanho de malha reduzido, favorecendo a captura dos animais junto à vegetação marginal e substrato. As coletas não apresentaram esforço de captura padronizado, sendo capturado o maior número de indivíduos de cada espécie por igarapé. A partir de trabalhos prévios sobre a composição da ictiofauna nos igarapés da micro bacia do Acará na RFAD (Mendonça et al., 2005; Espirito-Santo et al., 2007), foram selecionadas sete espécies de peixes comumente encontradas nesses locais. As espécies avaliadas nesse estudo pertencem à família Characidade (*Bryconops giacopinii, B. inpai, Hemigrammus pretoensis* e

Hyphessobrycon aff. melazonatus), Crenuchidae (*Crenuchus spilurus*) e Lebiasinidae (*Pyrrhulina brevis*), da ordem Characiformes, e à família Cichlidae (*Aequidens pallidus*) da ordem Perciformes. Após a captura, os peixes foram anestesiados com MS-222 (Sigma Aldrich) tamponado com $NaHCO_3$, pesados e medidos, para posterior retirada das amostras de brânquias. Todas as amostras foram transferidas para tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo então transportadas para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA) onde permaneceram em freezer a -80^{o}C até o momento das análises. Exemplares de cada espécie, de cada ponto amostral, foram fixados em formol 10% e transportados para o laboratório para posterior identificação. A identificação dos peixes foi realizada com o auxílio de chaves específicas e com a ajuda de especialistas, sendo os animais coletados posteriormente depositados na coleção de peixes do INPA. As tabelas 1 e 2 apresentam o número de exemplares coletados, analisados e a média de peso de cada uma das sete espécies estudadas, nos períodos de chuvas e estiagem, respectivamente.

2.3. Análises

2.3.1. Variáveis ambientais dos igarapés

A determinação da concentração dos cátions Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+} e Mg^{2+} nas amostras de água dos igarapés foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção atômica (AAnalyst 800, Perkin-Elmer, Singapore), enquanto a concentração do ânion Cl^{-} foi determinada pelo método colorimétrico do tiocianato de mercúrio (Zall *et al.*, 1956), usando-se um espectrofotômetro (Spectra-Max Plus 384, Molecular Devices). A determinação da composição iônica da água foi realizada em duplicata para cada amostra coletada. A concentração de COD nas amostras de água foi determinada em um analisador de carbono total (Apollo 9000 combustion TOC analyzer, Teledine Tekmar), usando o método de combustão com detecção por infravermelho. Para tanto, as amostras foram previamente filtradas em membranas com 0,45 μm de diâmetro para retirada do material particulado antes de serem injetadas no aparelho. As medidas das concentrações de sais e COD foram realizadas em triplicata para cada amostra. Todas as curvas de calibração para a determinação da concentração de sais e COD foram montadas com no mínimo quatro pontos, sendo descartadas as curvas com coeficiente de correlação menor que 0.99. A concentração final dos sais e COD foi expressa em $\mu M\ l^{-1}$ e mg C l^{-1}, respectivamente.

2.3.2. Ensaios enzimáticos

A atividade das enzimas Na^+,K^+-ATPase e H^+-ATPase nas brânquias dos animais coletados foi determinada por meio do protocolo descrito por Kültz & Somero (1995). O ensaio é baseado na oxidação do NADH pela reação enzimática acoplada à hidrólise do ATP. Assim, as amostras congeladas foram homogeneizadas em tampão SEID (150 mM Sacarose, 50 mM Imidazol, 10 mM EDTA, 0,5% ácido deoxicólico, pH 7.5) na proporção 1:10 (peso do tecido: volume do tampão). Os homogenatos foram então centrifugados (4^{o}C, 2000 g) por 10 min e o sobrenadante foi coletado para realização do ensaio. Alíquotas do sobrenadante (5 μl) foram adicionadas a 12 poços de uma placa de 96 poços, e incubadas com a solução de reação (30 mM Imidazol, 45 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 0,4 mM KCN, 1,0 mM ATP, 0,2 mM NADH, 0,1 mM frutose 1,6 difosfato, 2 mM PEP, 3 IU ml^{-1} PK e 2 IU ml^{-1} LDH). Para a determinação das atividades da Na^+,K^+-ATPase e H^+-ATPase as amostras de homogenato foram incubadas com solução de reação na presença de 2 mM de Ouabaína e 2 mM de N-ethylmaleimide (NEM), respectivamente. A taxa de oxidação do NADH foi monitorada em temperatura ambiente a 340 nm, a cada 10 s durante 10 min, em espectrofotômetro (Spectra Max Plus 384, Molecular Devices). As diferenças na inclinação do decaimento do NADH pelo tempo de reação entre as amostras incubadas sem (total) e com inibidores foi utilizada para calcular a atividade da Na^+,K^+-ATPase e H^+-ATPase. As atividades finais das ATPases nas brânquias dos peixes estão expressas como μmol h^{-1} mg $protein^{-1}$. A concentração de proteínas nos homogenatos foi determinada espectrofotometricamente usando o método colorimétrico com Comassie blue G-250 (Bradford, 1976).

2.4. Análise estatística

As variáveis ambientais dos igarapés da micro bacia do Acará e o peso corpóreo dos peixes coletados em cada um dos períodos são representadas como média±SEM. Para avaliar o efeito das oscilações naturais nas variáveis físicas e químicas da água dos igarapés em função dos períodos de chuvas e estiagem, foi utilizado um teste-t (Student's t-test), comparando as médias de cada variável entre os dois períodos, em cada um dos 14 igarapés amostrados. Além disso, os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água dos igarapés foram submetidos a uma análise de correlação de Pearson para verificar a presença de colinearidade entre os dados ambientais na área de estudo, em cada um dos períodos

analisados. Uma análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para identificar as variáveis ambientais mais importantes na formação de gradientes nas características físicas e químicas da água, em função do gradiente espacial dos 14 igarapés amostrados ao longo da micro bacia do Acará. Assim, foi possível avaliar como as propriedades físicas e químicas da água variam dentro da área de estudo, nos períodos de chuvas e estiagem.

O peso corpóreo dos exemplares de cada espécie coletados nos períodos de chuvas e estiagem foram comparados por meio de um teste-t, para verificar se houve interferência do procedimento de coleta dos animais entre os dois períodos, uma vez que, devido a oscilações naturais no volume e fluxo de corrente da água dos igarapés, os locais de coleta foram mais restritos durante o período de estiagem (particularmente no canal principal dos corpos d'água), o que pode ter favorecido a captura de animais maiores nesse período. A relação alométrica para a NKA e VATPase nas brânquias das espécies de peixes estudadas foi determinada com o intuito de avaliar se a atividade da ATPase varia conforme o peso corpóreo dos animais. Para tanto, a atividade da ATPase (Y) foi log transformada e analisada em função do peso (X) dos animais, seguindo a equação: $Y = a*X^b$. A relação alométrica para a ATPase branquial dos peixes foi determinada separadamente para os dois períodos analisados (chuvas e estiagem) e também para todos os exemplares coletados nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Além disso, para verificar se as atividades da NKA e da VATP apresentam diferenças entre os dois períodos do ciclo hidrológico foi utilizado um teste-t (Student's test) comparando a atividade da ATPase nas brânquias de todos os exemplares coletados de cada uma das espécies avaliadas, entre os períodos de chuvas e estiagem.

Para avaliar a influência das características físicas e químicas da água dos igarapés sobre a atividade da NKA e VATP nas brânquias das espécies de peixes estudadas foi utilizada uma análise de redundância (RDA). A RDA é um método de ordenação ("constrained ordination") utilizado para extrair somente o componente de variação das variáveis respostas (no caso, a atividade da ATPase) que pode ser explicado pelo gradiente dos dados ambientais (Oksanen, 2010; Legendre et al., 2011). A análise se baseia em regressões lineares das variáveis respostas, individualmente, com todos os dados ambientais como variáveis explanatórias. A partir do peso (influência) de cada uma das regressões, são determinados escores, como em uma PCA, que correspondem aos gradientes das variáveis

ambientais, assim como a posição da variável resposta no espaço em função do gradiente ambiental.

Primeiramente, foi rodado o modelo da RDA utilizando todas as variáveis ambientais dos igarapés onde os peixes foram coletados, para cada um dos períodos do ciclo hidrológico. Para essa análise foi utilizada a atividade da ATPase nas brânquias de todos os exemplares de cada uma das sete espécies amostradas. Por meio de um teste de permutação foi avaliada a significância do modelo, sendo, posteriormente, selecionadas as variáveis ambientais mais importantes ($P<0,05$). Um modelo parcial da RDA com apenas as variáveis ambientais mais significativas foi então utilizado para verificar a resposta da ATPase aos gradientes ambientais com maior capacidade explanatória. Um teste de permutação foi realizado *a posteriori* para confirmar a significância das variáveis ambientais no modelo final, assim como a capacidade preditiva dos eixos da RDA. Nas espécies onde foi verificada uma relação alométrica significativa para a ATPase o peso foi considerado uma variável condicionante nas análises.

Para realização dos testes-t e para as análises de correlação de Pearson foi utilizado o programa estatístico Sigma Stat (versão 3.5). As análises de componentes principais (PCA) foram feitas no programa PAST (Hammer et al., 2001), enquanto para a análise de redundância (RDA) foi utilizado o programa estatístico R (R Core Team, 2012).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização físico química dos igarapés

Os valores médios mensais de temperatura (^{o}C) e a precipitação acumulada na área da RFDA durante o ano de 2011 estão representados na Figura 2. As médias de temperatura e precipitação acumulada referentes a Fevereiro foram de 25,6 ^{o}C e 600 mm, respectivamente, enquanto em Setembro a temperatura média foi 27,3 ^{o}C e precipitação acumulada em torno de 125 mm. As águas dos igarapés da micro bacia do Acará são bem oxigenadas (entre 4,6 e 7,2 mg l^{-1}), termicamente estáveis (entre 23,9 e 25,4 ^{o}C) e de baixa condutividade elétrica (entre 9,4 e 34,6 μS cm^{-1}). Além disso, esses corpos d'água apresentaram uma forte acidez (pH variando entre 4,00 e 4,48), reduzida concentração de cátions dissolvidos (concentrações de Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+} e Mg^{2+} abaixo de 15,5, 2,2, 1,7, e 3,3 μM, respectivamente) e altas concentrações de COD (entre 10,2 e 33,3 mgC l^{-1}) (Tabela 3).

A composição da água dos igarapés da micro bacia do Acará foi fortemente influenciada pelo período do ciclo hidrológico. Na maioria dos pontos amostrais, o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido na água dos igarapés foram significativamente maiores no período de estiagem, enquanto os níveis de condutividade e COD foram estatisticamente mais elevados no período de chuvas (Tabela 3). A composição iônica da água dos igarapés também foi influenciada pelo regime local de chuvas; no entanto, diferenças em características morfológicas e estruturais entre os igarapés amostrados, como largura, vazão, tipo predominante de substrato, entre outras, parecem também influenciar diretamente a composição física e química da água nos igarapés. Entre as variáveis ambientais mensuradas, os níveis de oxigênio, condutividade, COD e a concentração de sais dissolvidos (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-) apresentaram as maiores variações entre os 14 igarapés amostrados, em cada um dos períodos analisados (Tabela 3).

No período de chuvas as propriedades físicas e químicas da água dos igarapés demonstraram alto grau de correlação (Pearson), sendo que apenas a temperatura, o oxigênio dissolvido e a concentração de K^+ não apresentaram correlação com nenhuma das demais variáveis avaliadas (Tabela 4). Nesse período o pH foi positivamente correlacionado ao COD e negativamente à condutividade e às concentrações de Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} e Cl^-. A condutividade e o COD apresentaram forte correlação positiva, sendo ambas as variáveis também positivamente correlacionadas às concentrações de Cl^-, Mg^{2+} e Na^+. Além disso, a correlação entre os íons Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} e Cl^- foi também positiva nesse período (Tabela 4). Por outro lado, no período de estiagem o grau de correlação entre as variáveis ambientais foi reduzido (Tabela 5). Nesse período, a condutividade e o COD mantiveram uma forte correlação positiva, que foi também positivamente correlacionada à concentração de Ca^{2+}. Além disso, a concentração de Cl^- foi correlacionada positivamente às concentrações de Na^+, K^+ e ao COD (Tabela 5).

A ordenação (PCA) das características físicas e químicas da água demonstrou que diferentes parâmetros foram responsáveis pela formação de gradientes nas condições ambientais observadas entre os 14 igarapés da micro bacia do Acará, nos períodos de chuvas e estiagem. Os dois primeiros eixos da PCA representaram 73,85% e 64,55% da variância acumulada nos períodos de chuvas e estiagem, respectivamente (Tabelas 6 e 7). No período de chuvas o primeiro eixo da PCA foi fortemente influenciado pela concentração de Cl^-, COD, condutividade, pH, Mg^{2+} e Na^+, correspondendo a 56,92% da variância explicada,

enquanto o segundo eixo da PCA representou 16,95% da variância explicada e foi formado principalmente pelas concentrações de K^+ e Ca^{2+} (Tabela 6). Adicionalmente, a PCA demonstrou que os pontos com maiores valores de pH (P07, P08, P10, P11 e P12) apresentaram as menores condutividades, Cl^-, COD, Mg^{2+} e Na^+, enquanto os igarapés mais ácidos (P05, P09, P13 e P14) apresentaram maiores concentrações das variáveis acima citadas (PCA scores > 1,6) (Fig. 3). Além disso, as concentrações de K^+ e O_2 foram maiores nos pontos (P01 e P03) com menores temperaturas e níveis de Ca^{2+}, sendo o inverso encontrado nos pontos P10 e P13 (PCA scores > 1,2) (Fig. 3).

Já no período de estiagem o primeiro eixo da PCA foi formado pela condutividade, COD, Cl^-, Ca^{2+} e K^+, e correspondeu a 44,19% da variância explicada, enquanto o segundo eixo da PCA foi formado pela concentração de Na^+ e oxigênio dissolvido, com uma variância explicada de 20,37% (Tabela 7). Nesse período o terceiro e quarto eixos da PCA apresentaram um variância explicada de 12,66% e 12,17%, sendo constituídos pela temperatura e concentração de Mg^{2+}, respectivamente (Tabela 7). Além disso, a PCA evidenciou que os igarapés mais ácidos (P05 e P13) apresentaram novamente os maiores níveis de condutividade, COD, Cl^- e Mg^{2+}, além da concentração de Ca^{2+} (PCA scores > 1,6), sendo estas varáveis ambientais encontradas em menor valor nos pontos com maior pH (P03, P04 e P08) (Fig. 4). Já o segundo eixo da PCA evidencia que o ponto P11 apresentou os maiores níveis de Na^+ e oxigênio dissolvido (PCA scores > 1,2), enquanto situação inversa foi observada nos pontos P07, P10 e P14 (Fig. 4). As análises dos dados ambientais indicam fortemente que as condições físicas e químicas da água dos igarapés avaliados são moduladas tanto espacialmente (formando gradientes dentro da micro bacia do Acará), quanto sazonalmente.

3.2. Resposta das ATPases nas brânquias de peixes de igarapés: relação alométrica, variação sazonal e modulação por fatores ambientais

As atividades da NKA e VATP nas brânquias das espécies de peixes de igarapé foram marcadamente, e diferencialmente, reguladas pelas condições ambientais dos corpos d'água, tanto espacialmente dentro do gradiente ambiental da micro bacia quanto sazonalmente, assim como por fatores biológicos (peso) das espécies. Nossos dados sugerem fortemente que as respostas das ATPases branquiais frente a oscilações nas propriedades físicas e químicas da

água dos igarapés são espécie específicas e, em alguns casos, dependentes também do peso dos animais.

3.2.1. Aequidens pallidus

Não foi observada diferença significativa (P=0,654) entre o peso corpóreo dos exemplares de *A. pallidus* coletados entre os períodos de chuvas (média de 6,63±2,24 g) e estiagem (em média 5,31±0,96 g). A atividade da VATP nas brânquias de *A. pallidus* não foi correlacionada ao peso dos animais nos período de chuvas (r= 0,0003; P=0,931), de estiagem (r= 0,0003; P=0,931), e também quando avaliados os dois períodos de coleta em conjunto (r=0,008; P=0,512) (Fig. 5). No entanto, a atividade branquial da NKA apresentou correlação positiva com o peso dos exemplares de *A. pallidus* coletados nos período de estiagem (r=0,409; P=0,0002), e quando foram avaliados os dois períodos de coleta em conjunto (r=0,252; P<0,0001). Assim, os resultados indicam que a atividade da NKA nas brânquias de *A. pallidus* é aumentada com o incremento da massa corpórea dos animais, e que esta relação foi evidente no período de estiagem (b= 0,47).

A atividade da NKA nas brânquias de exemplares de *A. pallidus* não apresentou diferenças entre os dois períodos do ciclo hidrológico (P=0,483) (Fig. 6A), enquanto a atividade da VATP foi 99% maior (P=0,004) no período de estiagem (Fig. 6B). No período de chuvas o modelo inicial da RDA utilizando todas as variáveis ambientais para explicar a variação das ATPases não foi significativo (P=0,20). A proporção explicada da variação dos dados pelo primeiro eixo da RDA foi de 90%, sendo este eixo formado principalmente pela relação positiva entre a atividade da VATP (score= -1,25) e a temperatura (score= -0,43). Já o segundo eixo correspondeu a apenas 9% da variação dos dados sendo formado pela NKA (score= -0,41), e pela temperatura (score= 0,76), concentração de Na^+ (score= -0,45) e COD (score= -0,43) (Fig. 7A). O teste de permutação demonstrou que apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005); no entanto, as variáveis analisadas não foram significativas (P>0,05) para explicar a variação da atividade das ATPases nas brânquias de *A. pallidus* nesse período (Fig. 7A).

Por outro lado, no período de estiagem o modelo inicial da RDA foi significativo (P=0,005), sendo, então, selecionadas as variáveis pH, temperatura e concentrações de K^+ e Cl^- (P=0,01) para o modelo parcial. Novamente apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005), correspondendo a mais de 98% da proporção explicada. Esse eixo foi

fortemente formado pela VATP (score= 2,15), temperatura (score= 0,81) e K^+ (score= 0,56), representando também uma pequena variação da NKA (score= 0,20) e do pH (score= -0,30) (Fig. 7B).

Dessa forma, os resultados da RDA evidenciam que a temperatura da água dos igarapés é o principal fator modulador da atividade da VATP, e em menor extensão da NKA, nas brânquias de *A. pallidus*, particularmente no período de estiagem, sendo a atividade da VATP aumentada com o incremento da temperatura na água. Da mesma forma, a concentração de K^+ e o pH também foram responsáveis por parte da variação da VATP observada em *A. pallidus* nesse período. A concentração de K^+ modulou positivamente a atividade da VATP, enquanto o aumento do pH tende a reduzir a atividade dessa enzima. Os gradientes ambientais encontrados na micro bacia do Acará explicaram fracamente a variação da NKA em *A. pallidus*, sendo que apenas no período de estiagem uma pequena parte da variação dessa enzima (score= 0,20) foi relacionada aos gradientes de temperatura, K^+ e pH (Fig. 7).

3.2.2. Bryconops giacopinii

O peso corpóreo dos exemplares de *B. giacopinii* foi significativamente mais elevado (P<0,001) no período de estiagem (6,31±0,77 g em média), do que no período de chuvas (média de 2,91±0,39 g). Contudo, não foram observadas relações significativas entre o peso corpóreo dos peixes e as atividades das duas ATPases nos dois períodos analisados, sendo apenas a atividade da VATP fracamente correlacionada (r=0,08; P=0,0029) ao peso de *B. giacopinii* considerando os dois períodos do ciclo hidrológico em conjunto (Fig. 8). Assim, os dados não indicam uma relação alométrica significativa para as atividades da NKA e VATPase nas brânquias de *B. giacopinii*.

Nessa espécie, a atividade da NKA foi aproximadamente 30% menor nos indivíduos coletados no período de estiagem (P<0,001) (Fig. 9A), enquanto a atividade da VATP nas brânquias dos exemplares de *B. giacopinii* foi em média 101% (P<0,001) maior nesse mesmo período (Fig. 9B). O modelo inicial da RDA foi significativo para essa espécie (P=0,01) no período de chuvas, sendo então selecionadas as concentrações de Na^+, Mg^{2+} e COD para o modelo parcial. Os dois eixos da RDA formados a partir do modelo parcial explicaram 83% e 17% da variação total dos dados, respectivamente. O primeiro eixo da RDA foi formado principalmente pela relação negativa entre a VATP (score= -1,26) e a concentração de Na^+

(score= 0,82), enquanto a atividade da NKA (score= 0,58), o COD (score= 0,58) e, mais fracamente, a concentração de Na^+ (score= 0,34) foram os principais responsáveis pela formação do segundo da RDA (Fig. 10A). O teste de permutação *a posteriori* revelou que apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005) em explicar a variação observada na atividade das ATPase nas brânquias de *B. giacopinii* durante o período de chuvas. Assim, os resultados indicam que o aumento da concentração de Na^+ (P=0,015) e COD (P=0,038) tendem a reduzir a atividade da VATP nas brânquias dessa espécie (Fig. 10A).

A influência do gradiente ambiental na atividade das ATPases nas brânquias de *B. giacopinii* foi evidenciada no período de estiagem pelo modelo total da RDA (P=0,01), sendo então selecionadas como variáveis preditivas para o modelo parcial, o pH e as concentrações de K^+ e Mg^{2+}. O primeiro eixo da RDA corresponde a 95% da variação explicada, sendo formado principalmente pela VATP (score= 1,28) e pelo pH (score= -0,78). Já o segundo eixo da RDA explicou apenas 4,5% da variação observada sendo fortemente formado pelas concentrações de Mg^{2+} (score= 0,95) e K^+ (score= -0,64), e mais fracamente, pela NKA (score= -0,27) (Fig. 10B). Novamente apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005), sendo o modelo final da RDA formado pelo pH (P=0,04) e K^+ (P=0,05). Assim, no período de estiagem vemos que o aumento do pH e da concentração de K^+ modulam negativamente a atividade de VATP nas brânquias de *B. gicopinii*.

3.2.3. Bryconops inpai

Os exemplares de *B. inpai* amostrados no período de estiagem (5,36±1,34 g) apresentaram o peso corpóreo em média 1,7 vezes maior do que os animais coletados no período de chuvas (3,07±0,37). No entanto, o peso dos peixes não foi significativamente diferente entre os dois períodos do ciclo hidrológico (P=0,059). Assim como visto para a espécie congênere *B. giacopinii*, não houve relação alométrica significativa para as atividades da NKA e VATP nas brânquias dos exemplares de *B. inpai* nos dois períodos analisados, com exceção da fraca correlação (r=0,08; P=0,048) entre a atividade da VATP e o peso dos peixes, considerando os períodos de chuvas e estiagem em conjunto (Fig. 11).

As respostas das ATPases nas brânquias de *B. inpai* entre os dois períodos avaliados foi marcadamente similar às observadas para a espécie congênere *B. giacopinii*, onde a atividade da NKA foi reduzida em 25% (P=0,028) nos animais durante o período de estiagem (Fig. 12A), enquanto a atividade da VATP foi 83% (P<0,001) mais elevada nas brânquias dos

exemplares dessa espécie no mesmo período (Fig. 12B). O modelo da RDA com todas as variáveis ambientais foi significativo (P=0,015) em explicar a variação na atividade das ATPases nas brânquias de *B. inpai* no período de chuvas. O modelo parcial da RDA foi formado pelo pH e pelas concentrações de COD, K^+ e Cl^- (P<0,05). Os dois primeiros eixos da RDA corresponderam a 93% e 6,6% da variação total dos dados, respectivamente. A atividade da VATP (score= 1,33) foi relacionada negativamente ao K^+ (score= -0,77), ao Cl- (score= -0,72) e ao COD (score= -0,65), e positivamente ao pH (score= 0,56), na formação do primeiro eixo da RDA (Fig. 13A). Já o segundo eixo da RDA correspondeu às menores variações da NKA (score= -0,35), do COD (score= -0,39), do Cl- (score= -0,37) e do pH (score= 0,34). No entanto, o teste de permutação revelou que apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005). Assim, o modelo final da RDA sugere que a atividade da VATP nas brânquias de *B. inpai* no período de chuvas é estimulada com o aumento do pH (P=0,01), e redução dos níveis de K^+ (P=0,02) e COD (P=0,03) (Fig. 13A).

Por outro lado, o modelo total na RDA não foi significativo (P=0,91) em explicar a variação das atividades das ATPases nas brânquias nessa espécie no período de estiagem. A proporção explicada pelos dois primeiros eixos da RDA foi de 75% e 24%, respectivamente (Fig. 13B). Contudo, ambos os eixos da RDA não foram significativos (P= 0,44 e 0,74, respectivamente) em explicar a pequena variação da atividade das ATPases observada nas brânquias de *B. inpai* nesse período, representando mais fortemente o gradiente das variáveis ambientais, como o COD, pH e Na^+ (Fig. 13B). Nós entendemos que o baixo número de exemplares de *B. inpai* coletados no período de estiagem influenciou fortemente no resultado das análises, Dessa forma, os resultados indicam que a atividade branquial da VATP é regulada por diferente fatores ambientais, como as concentrações de K^+, Cl^-, COD e pH no período de chuvas. Por outro lado, no período de estiagem não foram observadas evidências significativas da influência do gradiente das propriedades físicas e químicas da água sobre a atividade das ATPases nas brânquias dessa espécie.

3.2.4. Crenuchus spilurus

Não foi observada diferença significativa (P=0,083) entre o peso corpóreo dos exemplares de *C. spilurus* entre os períodos de chuvas (em média 0,78±0,04 g) e estiagem (média de 0,93±0,07 g). As relações alométricas para a atividade da NKA e da VATP nas brânquias de *C. spilurus* não foram significativas (P>0,05), em nenhum dos períodos de coleta analisados (Fig. 14). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nas

atividades da NKA (P=0,075) e da VATP (P=0,553) nas brânquias de exemplares de *C. spilurus* entre o período de chuvas e estiagem (Fig. 15).

A variação na atividade das ATPases nas brânquias de *C. spilurus* no período de chuvas foi significativamente (P=0,005) explicada pelo gradiente das variáveis ambientais, particularmente pelo pH, COD, condutividade e concentrações de Na^+ e Cl- (P<0,04). O primeiro eixo da RDA, a partir do modelo parcial utilizando as variáveis acima citadas, correspondeu a 95% da variação dos dados, e foi formado pela relação positiva entre ambas as enzimas, VATP (score= -0,92) e NKA (score= -0,40), e a concentração de Na^+ (score= -0,91), a condutividade (score= -0,87), a concentração de Cl^- (score= -0,85) e a concentração de COD (score= -0,78), e negativamente ao pH (score= 0,72) (Fig. 16A). O segundo eixo da RDA explicou apenas 4,7% da variação observada, e foi formado fracamente pela NKA (score= 0,21) e pelo COD (score= -0,12). Os testes de permutação *a posteriori* revelaram que apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005) e que as variáveis ambientais mais significativas no modelo foram o pH (P=0,01), as concentrações de Na^+ (P=0,01) e COD (P=0,02) e a condutividade (P=0,02). Os resultados indicam que a atividade da VATP e da NKA nas brânquias de *C. spilurus* no período de chuvas é estimulada em função do aumento da concentração de Na^+, COD, condutividade e diminuição do pH (Fig. 16A).

O modelo total da RDA também foi significativo (P=0,005) em explicar a variação das atividades das ATPases nessa espécie no período de estiagem, sendo então selecionados o pH, COD e as concentrações de Na^+ e K^+ (P<0,03) para o modelo parcial. O primeiro eixo da RDA foi novamente formado fortemente pela VATP (score= 1,60) e pelas concentrações de K^+ (score= -0,84), COD (score= -0,83) e Na^+ (score= -0,78), e mais fracamente pela NKA (score= 0,40) e pH (score= 0,49), correspondendo a mais de 98% da variação explicada (Fig. 16B). Já o segundo eixo da RDA explicou apenas 1,3% da variação total dos dados principalmente pela NKA (score= 0,18) e pelo Na+ (score= -0,50). Novamente, apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005), sendo o modelo final da RDA formado também pelo pH (P=0,01), COD (P=0,01), Na^+ (P=0,01) e K^+ (P=0,03). Interessante notar que nesse período o efeito do pH, do COD e da concentração de Na^+ na água sobre a atividade da VATP e NKA foi inverso ao observado nas brânquias de *C. spilurus* no período de chuvas (Fig. 16B). Nossos dados sugerem que as atividades da VATP e da NKA nas brânquias de *C. spilurus* são profundamente, e inversamente, moduladas pelo gradiente ambiental nos dois períodos do ciclo hidrológico, particularmente em função do pH e das concentrações de COD

e Na^+. Além disso, os gradientes formados pelo pH, COD e Na^+ dentro da micro bacia do Acará são marcadamente mais efetivos em modular a resposta da VATP, do que da NKA, nas brânquias de *C. spilurus* (Fig. 16).

3.2.5. Hemigrammus pretoensis

O peso corpóreo dos exemplares de *H. pretoensis* coletados no período de chuvas (2,86±0,22 g) não foi significativamente diferente (P=0,183) do peso dos animais no período de estiagem (3,46±0,37 g). Não foi observada correlação significativa (P>0,05) entre o peso corpóreo e as atividades da NKA e VATP nas brânquias de *H. pretoensis*, nos períodos analisados (Fig. 17). Além disso, as atividades da NKA e VATPase nas brânquias de exemplares de *H. pretoensis* não foram significativamente diferentes (P=0,957 e P=0,501, respectivamente) entre os períodos de chuvas e estiagem (Fig. 18).

No período de chuvas o modelo total da RDA não foi significativo (P=0,43) em explicar a variação das atividades das ATPases nas brânquias de *H. pretoensis*, sendo formado apenas um eixo da RDA com baixa variação explicada (5,1%). Esse eixo representou uma pequena variação da VATP (score= -0,29) e da NKA (score= 0,23), em função do pH, mas que não foi significativa (P=0,44) (Fig. 19A). Já no período de estiagem a concentração de K^+ (P=0,01) e Mg^{2+} (P=0,04) foram selecionadas como variáveis explanatórias para a variação nas atividades das ATPases, a partir da verificação da significância do modelo total (P=0,034). Contudo, o modelo parcial da RDA com apenas essas duas variáveis não foi significativo (P=0,19) em explicar a variação nas ATPases nas brânquias de *H. pretoensis*. Além disso, os dois eixos da RDA não foram significativos no modelo (P>0,16), apesar da alta proporção explicada (67% e 33%, respectivamente) da variação total dos dados nesses eixos (Fig. 19B). Como observado para a espécie *B. inpai* no período de estiagem, é provável que o reduzido número de exemplares de *H. pretoensis* amostrados em ambos os períodos de coleta interferiu na capacidade preditiva do modelo em função do gradiente ambiental avaliado. Nossos dados não evidenciam modulação nas atividades da VATP e NKA nas brânquias de *H. pretoensis* pelos gradientes ambientais, nos períodos analisados.

3.2.6. Hyphessobrycon melazonatus

Não foram observadas diferenças significativas (P=0,058) entre o peso corpóreo dos exemplares de *H. melazonatus* amostrados entre os períodos analisados. Os exemplares de *H.*

melazonatus apresentaram correlação significativa entre a atividade da VATP e o peso dos animais (r=0,44; P<0,001) no período de estiagem, sendo também observadas relações alométricas fracas, porém significativas, para as atividades da NKA (r=0,03; P=0,041) e VATP (r=0,07; P=0,015) nas brânquias de *H. melazonatus*, quando analisados os períodos de chuvas e estiagem em conjunto (Fig. 20). Assim, os resultados evidenciam que a atividade da VATP nas brânquias dos exemplares de *H. melazonatus* aumentou (b=1,01) linearmente com o incremento de peso dos peixes coletados no período de estiagem.

A atividade da VATP foi 119% mais elevada (P<0,001) nas brânquias dos exemplares de *H. melazonatus* no período de estiagem (Fig. 21B), em comparação aos peixes amostrados no período de chuvas. Por outro lado, a atividade da NKA não apresentou diferença (P=0,526) entre os dois períodos analisados (Fig. 21A). A atividade das ATPases nas brânquias de *H. melazonatus* no período de chuvas foi significativamente (P=0,005) modulada pelos gradientes ambientais, sendo selecionados o pH e a concentração de COD (P=0,001), além das concentrações de Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} e Cl^- (P<0,03), para o modelo parcial. O primeiro eixo da RDA explicou 95% da variação dos dados e foi fortemente formado pela VATP (score= 1,40) e pelo pH (score= 0,65), Cl^- (score= -0,62), K^+ (score= 0,61), Mg^{2+} (score= -0,60), Na^+ (score= -0,59) e COD (score= - 0,58). O segundo eixo da RDA foi formado pela NKA (score= 0,33) e pelas concentrações de K^+ (score= 0,60), Mg^{2+} (score= 0,41) e Na^+ (score= 0,39) (Fig. 22A). Além disso, os dois eixos da RDA foram significativos (P<0,02) em explicar a variação das ATPases nas brânquias de *H. melazonatus* em função dos gradientes observados no período de chuvas. Das variáveis anteriormente selecionadas para o modelo parcial apenas a concentração de Mg^{2+} (P=0,06) foi retirada do modelo final. Nossos dados sugerem fortemente que a atividade branquial da VATP em *H. melazonatus* durante o período de chuvas aumenta com a redução dos níveis de Cl^-, Na^+ e COD, assim como com o aumento da concentração de K^+ e pH na água. Nesse período, o aumento das concentrações de K^+ e Na^+ tende a aumentar a atividade da NKA nas brânquias de *H. melazonatus* (Fig. 22A).

Os gradientes de COD, K^+, Cl^- e temperatura (P=0,02) foram significativos em explicar a variação das ATPases nas brânquias de *H. melazonatus* no período de estiagem a partir do modelo total da RDA (P=0,005). O primeiro eixo da RDA explicou 94% da variação total dos dados, e foi formado pela relação positiva entre a VATP (score= 1,13) e a temperatura (score= 0,71), e negativamente com a concentração de Cl^- (score= -0,62) e COD (score= -0,46). Já o segundo eixo da RDA foi formado principalmente pelas pequenas

variações da NKA (score= -0,27) e das concentrações de Cl^- (score= 0,39) e K^+ (score= 0,36) (Fig. 22B). Contudo, apenas o primeiro eixo da RDA foi significativo (P=0,005) em explicar a variação observada na atividade das ATPases nas brânquias de *H. melazonatus* no período de estiagem (Fig. 22B). Os resultados da RDA indicam que em ambos os períodos do ciclo hidrológico, as concentrações de Cl^-, COD e K^+ são os principais fatores moduladores da atividade branquial da VATP em *H. melazonatus*. Além disso, foi verificado que a atividade da VATP nas brânquias dessa espécie é também regulada pela concentração de Na^+ e pela temperatura nos períodos de chuvas e estiagem, respectivamente. A variação da NKA observada no período de chuvas foi também explicada, em menor extensão que a VATP, em função dos gradientes de K^+ e Na^+ (Fig. 22).

3.2.7. Pyrrhulina brevis

Não foi observada diferença (P=0,218) entre o peso corpóreo dos exemplares de *P. brevis* entre os períodos de chuvas (1,82±0,44 g) e estiagem (1,22±0,37 g). As atividades branquiais da NKA e VATP apresentaram correlação significativa (r=0,35 e r=0,23, respectivamente; P<0,038) com o peso corpóreo dos animais no período de estiagem, enquanto ambas as enzimas não apresentaram relação alométrica no período de chuvas em *P. brevis* (Fig. 23). Foi observada também a correlação entre a atividade da NKA (r=0,19; P=0,015) e o peso corpóreo de exemplares de *P. brevis* quando analisados os dois períodos do ciclo hidrológico em conjunto (Fig. 23). Dessa forma, a atividade de ambas as ATPases nas brânquias de *P. brevis* no período de estiagem é aumentada com o incremento do peso dos peixes, sendo que a NKA (b=0,62) apresenta uma relação alométrica mais forte que a VATP (b=0,44) nessa espécie.

A atividade da NKA nas brânquias de exemplares de *P. brevis* amostrados no período de estiagem foi 30% menor (P=0,030) em relação à atividade dessa enzima no período de chuvas (Fig. 24A). Por outro lado, não foi observada diferença significativa (P=0,696) na atividade da VATP nas brânquias de *P. brevis* entre os períodos de chuvas e estiagem (Fig. 24B). Os modelos totais da RDA nos períodos de chuvas e estiagem não foram significativos (P=0,10 e P=0,17, respectivamente) para explicar a variação das atividades das ATPases observadas nas brânquias de *P. brevis* (Fig. 25). A variação explicada pelos eixos da RDA foi similar entre os períodos de chuvas e estiagem, sendo o primeiro eixo correspondente a 95% e 94% da variação em cada um dos períodos, enquanto o segundo eixo foi responsável apenas por 5% e 6% da variação explicada, respectivamente. No período de chuvas apenas o primeiro

eixo da RDA foi significativo (P=0,01), sendo formado pela VATP (score= 1,10) e pelo K^+ (score= -0,81), Na^+ (score= 0,72), pH (score= -0,68) e COD (score= 0,58) (Fig. 25A). O primeiro eixo da RDA no período de estiagem também foi significativo (P=0,005), sendo formado pela VATP (score= -1,33) e fracamente por COD (score= -0,33) e Ca^{2+} (score= -0,32) (Fig. 25B). Assim, os resultados não evidenciaram uma modulação significativa na atividade das ATPases nas brânquias de *P. brevis*, em ambos os períodos analisados. Apesar da forte tendência observada de resposta da VATP às variáveis ambientais, os gradientes observados não foram significativos na formação dos modelos da RDA.

4. DISCUSSÃO

4.1. Variação sazonal das características físicas e químicas dos igarapés

As águas dos igarapés da micro bacia do Acará apresentaram sua composição bastante similar às encontradas em pequenos riachos de diferentes micro bacias que drenam para o Rio Negro, como as do Bolívia e Sabiá na RFAD (Nascimento & Silva, 2010; Ferreira et al., 2012), e do Rio Cuieiras (Anjos, 2007; Carvalho, 2008). Embora diversos autores tenham sugerido que os igarapés de terra firme da Amazônia Central apresentem uma grande estabilidade em suas características físicas e químicas (Schwassman, 1992; Lowe-McConnell, 1999; Bürhnheim & Cox-Fernandes, 2001), foi observado que a composição da água dos igarapés varia tanto espacialmente entre os igarapés que compõem a micro bacia do Acará, criando pequenos (porém significativos), gradientes ambientais, quanto sazonalmente em função do regime de chuvas local.

Os gradientes físico-químicos observados espacialmente na micro bacia do Acará, em cada um dos períodos avaliados, foram relacionados principalmente com a condutividade e as concentrações de COD e Cl^-, sendo que as concentrações de Na^+, K^+ e Ca^{2+} também exerceram importante papel na formação desses gradientes. Além disso, as variáveis ambientais que apresentaram maior variabilidade entre os pontos amostrais nos períodos de chuvas e estiagem foram, a condutividade; a composição iônica (particularmente, os níveis de Na^+, K^+ e Cl^-); e as concentrações de oxigênio e COD. As variações observadas na composição da água entre os igarapés analisados devem estar relacionadas a diferenças nas características estruturais, geomorfológicas e pedológicas da área de drenagem da micro bacia do Acará, localizada sobre uma planície sedimentar do Pleistoceno composta por areias e argilas da formação Alter do Chão (Terciária), e pelos sedimentos arenosos dos Latossolos

Amarelos (Oxissolos) resultantes da intemperização de materiais cauliníticos do Terciário (Dias et al., 1980).

Por outro lado, as diferenças observadas na composição da água dos igarapés entre os períodos de chuvas e estiagem parecem estar fortemente relacionadas às rápidas e intensas alterações nas características hidrológicas do igarapé (e.g. vazão e turbulência), em resposta ao aumento e redução da precipitação local na rede de drenagem. De fato, oscilações naturais nas características hidrológicas de igarapés de terra firme da Amazônia têm sido evidenciadas em resposta ao aumento da precipitação ao longo do ano (Junk et al., 1989, Walker, 1995).

Assim, durante o período de chuvas, devido à maior precipitação na rede drenagem, ocorre um aumento do volume e fluxo (vazão) da água nos igarapés, concomitantemente a um maior aporte de material lixiviado do solo da floresta adjacente (Junk & Wantzen; 2004; Delgado et al., 2006). Dessa forma, o aumento da precipitação local, aliado à menor temperatura do ar nesse período, seria a principal força geradora de alterações nas condições físicas e químicas da água, o que resultou em maiores níveis de condutividade e COD, assim como redução do pH, temperatura e O_2 nos igarapés durante o período de chuvas. Além disso, a forte influência do aumento da precipitação sobre as condições hidrológicas nos igarapés avaliados seria também a principal responsável pela grande correlação, tanto no número de variáveis quanto na magnitude da relação, observada entre as propriedades físicas e químicas no período de chuvas.

Em contraste, a importância das variáveis físico-químicas na formação do gradiente ambiental observado na micro bacia do Acará é reduzida no período de estiagem devido, particularmente, à redução da precipitação na área de drenagem do igarapé e ao aumento da temperatura do ar nesse período. Além disso, o número de variáveis correlacionadas, assim como a intensidade dessas correlações, também foi reduzido nesse período, indicando, novamente, o papel central do regime local de chuvas sobre a composição da água dos igarapés de terra firme da Amazônia.

4.2. Resposta das ATPases nas brânquias de peixes de igarapés: variação sazonal e modulação por fatores ambientais

De acordo com Hochkaka & Somero (1989), espécies adaptadas a uma condição ambiental particular apresentam modificações em suas propriedades funcionais, que as permitem modular e/ou ajustar seus mecanismos fisiológicos, em resposta a diferentes fatores abióticos do ambiente. Diversos autores têm evidenciado um vasto número de respostas adaptativas dos mecanismos de regulação nas brânquias de peixes teleósteos da Amazônia às condições de baixa concentração iônica (Gonzalez et al., 2002; Gonzalez et al., 2006), pH ácido (Wood et al., 1998; Wilson et al., 1999; Gonzalez & Wilson, 2001; Gonzalez et al., 2002), elevada temperatura (Baldisserotto & Val, 2002) e concentração de COD (Matsuo & Val, 2007), além de oscilações na concentração de oxigênio dissolvido (Wood et al., 2009). Segundo Hwang e colaboradores (2011), durante longos períodos de aclimatação às oscilações naturais na composição do ambiente aquático, as principais respostas nos mecanismos de regulação iônica envolvem a regulação da expressão de transportadores e do número de ionócitos existentes no epitélio branquial, como forma de manter a homeostase iônica interna dos animais.

No presente estudo, as respostas na atividade da NKA e da VATP nas brânquias das espécies de peixes de igarapés da micro bacia do Acará foram fortemente moduladas pelas propriedades físicas e químicas da água, tanto no período de chuvas quanto de estiagem, bem como pela variação sazonal das condições ambientais. No entanto, as respostas da atividade branquial das ATPases foram diferencialmente reguladas entre as espécies de peixes em função do período sazonal. No período de chuvas, as espécies congêneres *B. giacopinii* e *B. inpai* apresentaram maior atividade branquial da NKA, acompanhada de níveis significativamente menores da VATP. Já em *A. pallidus* e *H. melazonatus* foi observado que apenas a VATP foi reduzida significativamente no período de chuvas, enquanto somente a atividade branquial da NKA apresentou maiores níveis em *P. brevis* nesse período. Por outro lado, a atividade de ambas as ATPases analisadas nas brânquias de *C. spilurus* e *H. pretoensis* parece não ser diretamente influenciada pela variação sazonal das condições ambientais dos igarapés.

Diversos autores têm evidenciado, por meio de estudos fisiológicos (Avella & Bornancin, 1989; Lin & Randall, 1993; Boisen et al., 2003), farmacológicos (Fenwick et al.,

1999; Preest et al., 2005), imunohistoquímicos (Lin et al., 1994; Sullivan et al., 1995; Wilson et al., 2000; Katoh et al., 2003) e moleculares (Horng et al., 2007, Liao et al., 2009; Hwang et al., 2011), o importante papel da atividade da NKA e da VATP na manutenção do gradiente eletroquímico necessário para a tomada apical de Na^+ nos ionócitos de peixes teleósteos de água doce, que é acompanhada da extrusão de H^+, auxiliando na manutenção do equilíbrio ácido-base dos animais (Kirschnner, 2004; Evans, 2005). Embora o transporte branquial de Na^+ *via* VATP/ENaC em peixes de água doce seja termodinamicamente favorecido em condições ácidas e com reduzida disponibilidade iônica (Parks et al., 2008), múltiplas respostas nos mecanismos de regulação iônica e ácido-base têm sido evidenciadas em diferente espécies de peixes aclimatadas a essas condições ambientais (Yan et al., 2007; Horng et al., 2009; Hwang et al., 2011; Kumai & Perry, 2012).

Hirata e colaboradores (2003) demonstraram que o processo de aclimatação de *Tribolodon hackonensis* a águas ácidas (pH 3.5) envolve ajustes nos níveis de expressão e, por conseguinte, na concentração de proteínas, de diferentes transportadores iônicos branquiais. Segundo esses autores, em condições ácidas, a principal via de absorção branquial de Na^+ se dá por meio do cotransportador NHE, uma vez que foi observada reduzida expressão da subunidade β da VATP, acompanhada também de aumento da abundância da NKA e NHE nas brânquias dos peixes. Além disso, a aclimatação a reduzidos níveis de Na^+ promoveu a redução da expressão dos genes *zatp6v0c* e *atp6v1a*, responsáveis pela transcrição da VATP nos ionócitos presentes nas brânquias e saco embrionário de *Danio rerio* (Yan et al., 2007; Shih et al., 2011). Já Liao e colaboradores (2009) demonstraram que a expressão de isoformas da NKA nos ionócitos dessa espécie é modulada diferencialmente em animais aclimatados a diferentes concentrações iônicas do meio, auxiliando na manutenção do gradiente eletroquímico necessário para tomada de Na^+ mesmo em águas com baixa disponibilidade de sais dissolvidos. Dessa forma, a regulação da NKA e da VATP nessas espécies, em resposta a condições ambientais extremas (i.e. baixos valores de pH e concentração de sais dissolvidos), está relacionada à manutenção de gradientes de Na^+ e H^+ dentro dos ionócitos favoráveis ao transporte apical de Na^+ via o cotransportador NHE (Hwang et al., 2011).

Assim, nossos resultados sugerem que as condições ambientais encontradas no período chuvoso regulam a atividade das ATPases nas brânquias de *B. giacopinii* e *B. inpai*, e em menor extensão nas espécies *A. pallidus*, *H. melazonatus*, em resposta a (1) uma maior

necessidade do organismo em manter o gradiente eletroquímico dos ionócitos para a tomada apical de Na^+, provavelmente através do cotransportador NHE, nas condições ambientais encontradas nesse período; assim como (2) ao efeito direto da maior pressão do ambiente durante o período de chuvas sobre o funcionamento termodinâmico das ATPases, particularmente da VATP. Por outro lado, durante o período de estiagem, a influência das condições ambientais sobre os mecanismos de regulação iônica nas brânquias das espécies seria reduzido, uma vez que as propriedades físicas e químicas da água nesse período (e.g. maior temperatura, oxigênio dissolvido e pH, e menores níveis de COD e condutividade) são mais favoráveis ao funcionamento dessas enzimas, particularmente da VATP. Dessa forma, durante o período de estiagem, a atividade da VATP exerceria um papel central na manutenção da homeostase iônica e ácido-base dos animais. Já em *P. brevis*, os resultados sugerem apenas que o aumento da atividade da NKA nas brânquias dos animais no período chuvoso seria a principal força para a manutenção do gradiente intracelular de Na^+ nos ionócitos, desempenhando importante função na regulação de Na^+ dos animais.

No entanto, vale ressaltar que a resposta das ATPases nas brânquias de *A. pallidus*, *H. melazonatus* e *P. brevis* frente às oscilações sazonais nas características físicas e químicas da água dos igarapés pode estar diretamente relacionada à forte relação alométrica para as enzimas, particularmente no período de estiagem. Nesse período, a atividade da NKA, em *P. brevis* (b= 0,62) e *A. pallidus* (b=0,47), e da VATP, em *H. melazonatus* (b= 1,01) e *P. brevis* (b= 0,44), aumentou linearmente com o incremento de peso corpóreo dos animais. Estudos avaliando a influência de fatores ambientais sobre a estrutura das comunidades de peixes nos igarapés da RFAD têm demonstrado uma tendência de redução da abundância das espécies *H. melazonatus* e *P. brevis* nos igarapés durante o período de chuvas (Pazin, 2005; Espírito-Santo, 2007). Esses autores demostraram que os indivíduos adultos dessas espécies são encontrados em maior número em poças laterais ao longo do canal principal do igarapé durante o período de chuvas, sugerindo que os indivíduos adultos utilizam esses ambientes temporários para se reproduzir (Pazin, 2005; Espírito-Santo, 2007). Diversas evidências têm fortemente sugerido que fatores biológicos relacionados à reprodução, como os níveis hormonais, são responsáveis por modular a atividade branquial de ATPases em peixes de água doce (McCormick, 1995; McCormick, 2001). Dessa forma, as respostas observadas no comportamento das ATPases nas brânquias de *H. melazonatus* e *P. brevis* em relação às oscilações sazonais nas condições ambientais dos igarapés podem ser também influenciadas por características biológicas das espécies, como período e comportamento reprodutivo, que

interferem diretamente na atividade das brânquias dos animais. Por outro lado, os resultados obtidos para *C. spilurus* e *H. pretoensis* parecem ter sido influenciado pelo reduzido número de indivíduos analisados, particularmente de *H. pretoensis*, o que por sua vez inviabiliza tanto o estabelecimento de estimativas seguras das variáveis resposta, quanto comparações acerca das respostas dos animais entre os períodos sazonais.

As análises multivariadas revelaram que (1) indivíduos das espécies *A. pallidus*, *B. giacopinii, C. spilurus, H. preotoensis, H. melazonatus* e *P. brevis* com maior atividade da VATP tenderam a apresentar a atividade branquial da NKA também mais elevada, independente do período hidrológico. Em contraste, maiores níveis branquiais da VATP nos exemplares de *B. inpai* foram associados a uma reduzida atividade da NKA, particularmente no período de chuvas; (2) entre as enzimas analisadas, a variação na atividade da VATP observada nas brânquias de *A. pallidus*, *B. giacopinii*, *B. inpai*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* foi mais fortemente explicada pelos gradientes ambientais encontrados na micro bacia do Acará que a atividade da NKA, sendo que em *A. pallidus*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* uma pequena parte da variação da NKA também foi explicada pelas características físico-químicas da água dos igarapés; (3) a atividade das ATPases nas brânquias de *A. pallidus*, *B. giacopinii*, *B. inpai*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* foi diferencialmente modulada pelas características físico-químicas da água dos igarapés, particularmente no número de variáveis ambientais e na capacidade preditiva de cada uma delas; (4) as variáveis ambientais com maior capacidade explanatória para a variação da atividade das ATPases nas brânquias de *B. giacopinii*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* foram diferentes entre os períodos de chuvas e estiagem.

No período de chuvas foi observado que a variação da VATP nas brânquias de *B. giacopinii, B. inpai*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* foi particularmente relacionada ao forte gradiente formado pela relação negativa entre o pH e os níveis de condutividade, COD, Cl^-, Na^+ e Mg^{2+} da água dos igarapés. Em *B. inpai e H. melazonatus*, a atividade da VATP nas brânquias aumentou em função do aumento do pH da água, aliado à redução das concentrações de Cl^- e COD. Além disso, níveis menores de Na^+ na água promoveram aumento da atividade da VATP nas brânquias de *B. giacopinii* e *H. melazonatus*. Em contraste, maiores atividades da VATP, e em menor extensão da NKA, nas brânquias de *C. spilurus* foram relacionadas à redução do pH, e consequente aumento dos níveis de Na^+, condutividade, Cl^- e COD na água. A concentração de K^+ também exerceu importante papel na regulação da atividade da VATP nas brânquias de *B. inpai* e *H. melazonatus*. No entanto,

enquanto as maiores atividades da VATP nos exemplares de *H. melazonatus* foram associadas a maiores níveis de K^+ na água, o efeito inverso foi observado nas brânquias de *B. inpai*, ou seja, aumento da atividade da VATP com a redução da concentração de K^+ na água. Além disso, nos exemplares de *H. melazonatus* a atividade da NKA apresentou relação positiva com os níveis de K^+, Mg^{2+} e Na^+.

No período de estiagem, a variação na atividade das ATPases nas brânquias das espécies analisadas foi menos explicada pelas características da água dos igarapés, como visto pela redução no número e na capacidade explanatória das variáveis ambientais em relação ao obtido no período de chuvas. Durante a estiagem, assim como no período de chuvas, o gradiente formado pela relação negativa entre o pH e as concentrações de Cl^-, COD e condutividade foi importante para explicar a variação da VATP nos peixes. Em exemplares de *B. giacopinii* a atividade da VATP foi aumentada apenas em resposta ao aumento da acidez da água, enquanto em *H. melazonatus*, a maior atividade da VATP foi associada à redução das concentrações de Cl^- e COD. A redução das concentrações de COD, Na^+ e H^+ da água foi relacionada ao aumento da atividade da VATP nas brânquias de *C. spilurus*. Interessante notar que a resposta da VATP nas brânquias de *C. spilurus* frente às variações de Na^+, COD e pH foi inversa entre os períodos de chuva e estiagem. A temperatura foi o principal fator responsável por explicar a variação da VATP nas brânquias de *A. pallidus* e *H. melazonatus*, sendo observados maiores níveis de atividade em condições de maior temperatura da água. Já o aumento da concentração de K^+ foi relacionado à maior atividade da VATP em *A. pallidus*, apresentando efeito inverso sobre a atividade dessa enzima nas brânquias de *C. spilurus*.

De acordo com Hwang e colaboradores (2011), os principais ajustes fisiológicos relacionados à aclimatação a oscilações agudas (em curto período de tempo) nas condições do ambiente aquático envolvem a regulação da atividade, e/ou propriedade funcional, dos transportadores, assim como da expressão e quantidade de isoformas de diferente ATPases nas brânquias dos peixes teleósteos. Alterações de pH, concentração iônica e temperatura do meio são reconhecidas por modular fortemente as propriedades cinéticas funcionais da NKA em *C. auratus* (Busacker & Chavin, 1981; Houston & Mearow, 1982), *Rutilus rutilus* (Schwarzbaum et al., 1990) e *Anguilla japonica* (Ho & Chan, 1980). Além disso, em mamíferos, as propriedades cinéticas da NKA apresentam diferenças em relação à afinidade pelo Na^+, K^+ e ATP entre as diferentes isoformas da subunidade catalítica (α) dessa enzima (Blanco & Mercer, 1998), sugerindo que alterações na distribuição das isoformas nas

membranas acarretam modificações na capacidade de transporte do tecido. Nesse contexto, as respostas na atividade da NKA e VATP observadas nas brânquias de *A. pallidus*, *B. giacopinii*, *B. inpai*, *C. spilurus* e *H. melazonatus* frente aos gradientes ambientais encontrados nos períodos de chuvas e estiagem devem refletir o efeito direto das variáveis ambientais sobre as propriedades funcionais dessas enzimas e as modificações na capacidade de transporte do epitélio branquial dessas espécies, associadas à regulação da distribuição de isoformas da NKA e VATP em função das variações nas características físicas e químicas da água dos igarapés. Contudo, estudos adicionais que avaliem a ocorrência, níveis de expressão e distribuição de isoformas da NKA e VATP nas brânquias de peixes de igarapés da Amazônia, particularmente em resposta a variações na concentração de H^+, COD, Cl^-, Na^+, K^+ e temperatura, são necessários para validar essas hipóteses.

Os padrões de resposta na atividade da NKA e VATP observados nas brânquias das espécies estudadas nos dois períodos analisados e em função das características físicas e químicas da água em cada período sugerem a existência de grande plasticidade intra e interespecífica nas respostas adaptativas dos peixes de igarapés de terra-firme de microbacias da Amzônia Central a condições ambientais extremas, relacionados à manutenção da homeostase iônica e equilíbrio ácido-base. Assim, atividades antrópicas como o desflorestamento, mudança no uso da terra e liberação indiscriminada de efluentes domésticos e industriais, que são reconhecidas por alterar a composição da água e a dinâmica dos igarapés (Trancoso et al., 2005; Borges, 2006; Melo et al., 2006), devem afetar diretamente o funcionamento branquial da NKA e VATP nos peixes, promovendo desafios adicionais para a regulação de Na^+ e, consequentemente, manutenção do equilíbrio iônicos dos animais.

5. CONCLUSÕES

- Variações significativas na composição da água dos igarapés entre os períodos de chuva e estiagem contribuem com as diferenças espécie-específicas observadas na atividade das ATPases nas brânquias de *A. pallidus*, *B. giacopinii*, *B. inpai*, *H. melazonatus* e *P. brevis*.

- A atividade branquial da VATP nas espécies estudadas foi mais relacionada aos gradientes ambientais observados dentro da micro bacia do Acará, tanto em número de variáveis preditivas quanto na intensidade dos efeitos, do que a atividade da NKA.

- O gradiente formado pela variação de pH, COD, Cl^- e Na^+ (e mais fracamente pelo Ca^{2+} e Mg^{2+}) pode ser o principal modulador da atividade da VATP nas brânquias dos peixes no período de chuvas, sendo que no período de estiagem os gradientes de temperatura e K^+ também exercem um papel regulador importante da atividade dessa enzima.

Tabela 1. Número de amostras coletadas[1], analisadas, e a média de peso (média ± SEM) de cada espécie de peixe, em cada um dos 14 igarapés da micro bacia do Acará na Reserva Florestal Adolpho Ducke durante o período de chuvas (Fevereiro/2011).

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	Média de peso (g)
CHARACIFORMES															
Characidae															
Bryconops giacopinii	-/-	10/17	-/-	4/4	10/16	-/-	-/-	-/-	10/27	-/-	-/-	10/29	1/1	10/24	2,92±0,39
Bryconops inpai	-/-	10/23	-/-	3/3	4/4	2/2	5/5	5/5	10/12	-/-	4/5	-/-	-/-	-/-	3,07±0,37
Hemigrammus pretoensis	-/-	-/-	10/11	-/-	6/8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	2,86±0,22
Hyphessobrycon aff. melazonatus	-/-	10/13	-/-	7/7	6/7	8/8	10/13	10/27	3/3	10/12	-/-	10/21	6/15	10/41	0,74±0,03
Crenuchidae															
Crenuchus spilurus	-/-	5/5	-/-	6/6	-/3	9/9	10/20	5/5	-/1	10/23	-/-	10/16	8/15	1/1	0,78±0,04
Lebiasinidae															
Pyrrhulina brevis	2/2	-/-	1/2	1/1	-/-	-/-	1/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	6/6	-/-	1,82±0,43
PERCIFORMES															
Cichlidae															
Aequidens pallidus	2/2	-/-	6/6	6/6	2/2	3/3	2/2	1/1	-/-	2/2	1/1	2/3	1/1	1/1	6,63±2,24

[1]O restante das amostras coletadas é mantida em nitrogênio líquido para análises posteriores referentes ao projeto ADAPTA

Tabela 2. Número de amostras coletadas[1], analisadas e a média de peso (média ± SEM) de cada espécie de peixe, em cada um dos 14 igarapés da micro bacia do Acará na Reserva Florestal Adolpho Ducke durante o período de estiagem (Setembro/2011).

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12	P13	P14	Média de peso (g)
CHARACIFORMES															
Characidae															
Bryconops giacopinii	-/-	10/16	-/-	1/1	9/12	1/1	9/11	-/-	10/26	-/-	-/-	12/18	7/7	10/12	6,32±0,77
Bryconops inpai	1/1	-/-	-/-	2/2	5/5	-/-	-/-	-/-	12/14	-/-	1/1	-/-	-/1	-/-	5,36±1,34
Hemigrammus pretoensis	1/1	1/1	7/7	1/1	-/-	-/-	2/2	-/-	-/-	1/2	3/3	-/-	1/1	-/-	3,46±0,37
Hyphessobrycon aff. melazonatus	1/1	3/3	-/-	2/3	4/4	3/3	1/1	10/21	5/7	5/20	1/1	1/1	11/21	10/17	0,64±0,04
Crenuchidae															
Crenuchus spilurus	4/4	1/1	-/-	-/-	-/-	2/2	-/-	1/1	-/-	-/-	-/-	3/3	7/7	-/-	0,93±0,07
Lebiasinidae															
Pyrrhulina brevis	3/3	1/1	4/14	-/-	-/-	1/1	2/2	5/5	-/-	-/-	2/2	1/1	1/1	-/-	1,22±0,37
PERCIFORMES															
Cichlidae															
Aequidens pallidus	1/1	9/9	2/3	1/1	1/1	4/4	2/2	4/4	1/1	3/3	-/-	2/2	1/1	-/-	5,31±0.96

[1]O restante das amostras coletadas é mantido em nitrogênio líquido para análises posteriores referentes ao projeto ADAPTA

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas de 14 igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke durante os períodos de chuvas e estiagem (Fevereiro e Setembro de 2011, respectivamente). Valores em negrito indicam aumento significativo (p<0,05) no parâmetro analisado no período de estiagem em comparação com o período de chuvas, em um mesmo igarapé. Símbolo (*****) indica redução significativa (p<0,05) no parâmetro analisado no período de estiagem em comparação ao período chuvoso, em um mesmo igarapé.

Ponto	Período	Temp	O_2	pH	Cond	COD	Na	K	Ca	Mg	Cl
P01	Chuvosa	24,57±0,047	6,30±0,02	4,21±0,01	23,83±0,04	26,01±0,06	9,64±0,06	1,55±0,03	0,09±0,01	3,24±0,04	34,38±1,44
	Estiagem	**25,13±0,018**	**6,36±0,02**	**4,36±0,05**	11,30±0,03*****	14,28±0,41*****	7,59±0,23*****	1,06±0,06*****	**0,60±0,03**	0,85±0,02*****	13,36±1,04*****
P02	Chuvosa	24,20±0,001	6,20±0,02	4,19±0,01	25,97±0,07	23,59±0,40	9,36±0,15	1,03±0,07	0,47±0,02	1,56±0,08	32,13±1,73
	Estiagem	**24,36±0,020**	5,97±0,02*****	**4,34±0,05**	12,33±0,07*****	11,19±0,20*****	6,16±0,08*****	0,56±0,15*****	**0,63±0,03**	0,83±0,08*****	10,43±2,64*****
P03	Chuvosa	23,94±0,020	6,17±0,07	4,32±0,01	19,57±0,07	20,14±0,32	10,73±0,15	1,18±0,07	0,61±0,05	1,49±0,13	17,87±1,89
	Estiagem	**24,67±0,047**	**6,43±0,09**	**4,42±0,02**	12,74±0,11*****	10,51±0,16*****	7,76±0,13*****	0,37±0,11*****	0,62±0,03	0,77±0,08*****	8,10±1,77*****
P04	Chuvosa	24,44±0,020	5,98±0,02	4,29±0,05	16,19±0,18	20,42±030	8,89±0,31	1,33±0,06	0,45±0,05	1,32±0,05	25,38±5,33
	Estiagem	**24,85±0,022**	**6,39±0,01**	**4,46±0,04**	9,40±0,01*****	10,19±0,26*****	7,40±0,07*****	0,71±0,06*****	**0,68±0,06**	0,84±0,06*****	9,15±3,01*****
P05	Chuvosa	24,37±0,018	5,92±0,02	4,08±0,01	29,66±0,03	29,84±0,73	10,86±0,27	1,17±0,02	0,54±0,05	1,46±0,02	44,90±2,56
	Estiagem	**24,95±0,034**	**6,17±0,02**	**4,13±0,01**	25,13±0,02*****	22,45±0,18*****	7,65±0,57*****	0,74±0,01*****	**1,83±0,01**	1,31±0,05*****	32,69±1,94*****
P06	Chuvosa	24,70±0,001	5,49±0,04	4,28±0,01	19,77±0,18	20,51±0,18	8,15±0,06	1,15±0,01	0,41±0,04	1,43±0,21	24,63±0,87
	Estiagem	**24,91±0,014**	**6,01±0,05**	4,20±0,05	12,97±0,06*****	13,36±0,65*****	6,75±0,29*****	0,82±0,02*****	**0,69±0,02**	0,25±0,06*****	12,83±1,72*****
P07	Chuvosa	25,10±0,001	5,39±0,08	4,32±0,01	17,47±0,06	17,93±0,66	7,86±0,39	1,17±0,06	0,66±0,09	0,45±0,11	15,62±0,87
	Estiagem	**25,24±0,030**	5,26±0,05	4,15±0,03*****	11,97±0,05*****	14,73±0,12*****	6,98±0,10*****	0,74±0,09*****	0,84±0,03	0,64±0,09	4,95±0,87*****
P08	Chuvosa	25,13±0,018	5,63±0,04	4,41±0,01	14,91±0,07	14,98±0,37	9,46±0,63	1,81±0,19	0,63±0,04	1,11±0,05	14,87±1,44
	Estiagem	**25,43±0,018**	**5,85±0,02**	**4,46±0,04**	9,93±0,03*	13,72±0,21*****	8,03±0,38	0,65±0,02*****	0,32±0,04*****	0,74±0,11*****	8,10±1,86*****
P09	Chuvosa	24,60±0,001	6,46±0,02	4,00±001	34,59±0,04	33,29±0,14	10,21±0,13	1,39±0,10	0,66±0,03	3,03±0,20	62,91±2,56
	Estiagem	24,60±0,001	**6,52±0,03**	**4,41±0,03**	15,59±0,15*****	16,53±0,02*****	5,89±0,08*****	0,40±0,07*****	**1,06±0,09**	0,45±0,03*****	11,18±1,20*****
P10	Chuvosa	24,70±0,001	4,57±0,19	4,27±0,01	17,77±0,18	17,42±0,15	7,55±0,82	0,20±0,05	0,26±0,06	0,53±0,08	15,62±150
	Estiagem	24,13±0,018*****	4,90±0,10	**4,33±0,05**	14,69±0,07*****	14,98±0,69*****	7,38±0,78	0,33±0,02	0,28±0,04	0,30±0,01*****	15,46±1,21
P11	Chuvosa	25,14±0,143	6,54±0,06	4,28±0,01	17,99±0,03	18,24±0,24	6,98±0,11	0,27±0,02	0,42±0,07	0,77±0,04	17,12±1,73
	Estiagem	25,00±0,022	**7,17±0,01**	**4,41±0,02**	13,06±0,02*****	13,86±0,45*****	15,52±0,35*****	**1,23±0,01**	0,22±0,03*****	0,66±0,02*****	**23,88±4,81**
P12	Chuvosa	24,90±0,001	5,87±0,01	4,39±0,01	16,13±0,03	14,65±0,13	8,04±0,07	0,38±0,05	0,69±0,08	0,75±0,06	14,11±3,47
	Estiagem	**25,37±0,018**	**5,96±0,01**	**4,48±0,03**	11,54±0,03*****	13,47±0,02*****	5,37±0,07*****	**1,27±0,04**	**1,15±0,03**	0,20±0,04*****	6,25±2,70*****
P13	Chuvosa	24,93±0,018	5,50±0,06	4,01±0,02	32,04±0,10	31,51±0,20	13,38±0,60	0,65±0,09	1,68±0,02	3,33±0,17	60,66±4,98
	Estiagem	24,13±0,014*****	5,63±0,03	**4,26±0,03**	22,34±0,07*****	23,03±0,16*****	10,60±0,55*****	**2,22±0,02**	1,52±0,03*****	1,03±0,01*****	35,83±5,49*****
P14	Chuvosa	24,53±0,018	5,90±0,07	4,11±0,01	29,17±0,11	26,11±0,18	12,11±0,17	0,43±0,05	0,93±0,06	2,19±0,11	39,64±2,88
	Estiagem	**24,76±0,030**	**6,34±0,04**	4,00±0,07	14,70±0,02*****	15,01±0,22*****	6,07±0,05*****	**2,14±0,07**	**1,15±0,03**	0,31±0,13*****	14,56±1,47*****

Tabela 4. Correlações de Pearson entre as variáveis físicas e químicas de 14 igarapés da micro bacia do Acará na Reserva Florestal Adolpho Ducke durante o período de chuvas (Fev/2011). Valores em negrito e em itálico indicam correlações significativas entre duas variáveis com valores de p <0,05 e <0,001, respectivamente.

	Temperatura	Oxigênio	pH	Condutividade	COD	Na	K	Ca	Mg
O_2 (mg l^{-1})	-0,269								
pH	0,237	-0,202							
Cond (µS cm^{-1})	-0,296	0,287	*-0,969*						
COD (mgC l^{-1})	-0,329	0,320	*0,963*	*0,963*					
Na (µM)	-0,342	0,136	**-0,686**	**0,736**	**0,724**				
K (µM)	-0,183	0,283	0,0532	0,023	0,157	0,155			
Ca (µM)	0,180	-0,087	-0,461	0,461	0,401	**0,712**	-0180		
Mg (µM)	-0,227	0,368	**-0,746**	**0,773**	*0,826*	**0,730**	0,278	0,386	
Cl (µM)	0,131	0,004	*-0,820*	**0,776**	**0,713**	**0,636**	-0,296	**0,755**	**0,596**

Tabela 5. Correlações de Pearson entre as variáveis físicas e químicas de 14 igarapés da micro bacia do Acará na Reserva Florestal Adolpho Ducke durante o período de estiagem (Set/2011). Valores em negrito e em itálico indicam correlações significativas entre duas variáveis com valores de p <0,05 e <0,001, respectivamente.

	Temperatura	Oxigênio	pH	Condutividade	COD	Na	K	Ca	Mg
O_2 (mg l^{-1})	0,232								
pH	0,134	0,217							
Cond (μS cm^{-1})	-0,378	-0,974	-0,492						
COD (mgC l^{-1})	-0,174	-0,201	-0,454	*0,912*					
Na (μM)	-0,014	0,398	0,161	0,138	0,166				
K (μM)	0,011	0,118	-0,425	0,308	0,431	0,252			
Ca (μM)	-0,059	-0,025	-0,462	**0,777**	**0,735**	-0,254	0,443		
Mg (μM)	-0,053	0,132	-0,057	0,524	0,449	0,324	-0,023	0,379	
Cl (μM)	-0,432	-0,049	-0,312	0,532	**0,612**	**0,522**	**0,648**	0,236	-0,002

Tabela 6. Resultados da Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando as características relacionadas aos 14 igarapés da RFAD no período de chuvas (Fev/2011), seus scores e a variância explicada pelos quatro primeiros eixos da PCA. Valores em negrito indicam variáveis com escore > 0,6.

Variáveis	**PCA1**	**PCA2**	**PCA3**	**PCA4**
pH	**-0,939**	0,116	0,188	-0,137
COD	**0,971**	0,075	-0,070	0,081
[Na]	**0,844**	-0,141	0,125	-0,390
[K]	0,127	**0,667**	**0,645**	-0,247
[Ca]	0,537	**-0,663**	0,264	-0,166
[Mg]	**0,878**	0,143	0,205	0,046
[Cl]	**0,972**	-0,053	0,035	0,111
Condutividade	**0,961**	-0,038	-0,144	0,100
Temperatura	-0,320	-0,576	0,534	0,504
Oxigênio	0,323	**0,632**	0,033	0,486
% variância explicada	56,92	16,93	8,91	7,81
% variância acumulada	**56,92**	**73,85**	**82,76**	**90,57**

Tabela 7. Resultados da Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando as características relacionadas aos 14 igarapés da RFAD no período de estiagem (Set/2011), seus scores e a variância explicada pelos quatro primeiros eixos da PCA. Valores em negrito indicam variáveis com escore > 0,6.

Variáveis	**PCA1**	**PCA2**	**PCA3**	**PCA4**
pH	-0,5602	0,5575	-0,5296	0,1302
COD	**0,9443**	-0,03709	-0,07804	0,03832
[Na]	0,1866	**0,8214**	-0,1572	-0,3935
[K]	**0,6064**	0,1067	0,4302	-0,5109
[Ca]	**0,8817**	-0,1948	0,2029	0,2941
[Mg]	0,4985	0,4267	-0,205	**0,6722**
[Cl]	**0,9017**	0,3	-0,2064	-0,1537
Condutividade	**0,9553**	-0,05573	-0,1711	0,07386
Temperatura	-0,2354	0,3437	**0,6616**	0,4626
Oxigênio	-0,06148	**0,7796**	0,4202	-0,04077
% variância explicada	44,19	20,37	12,66	12,17
% variância acumulada	**44,19**	**64,56**	**77,22**	**89,39**

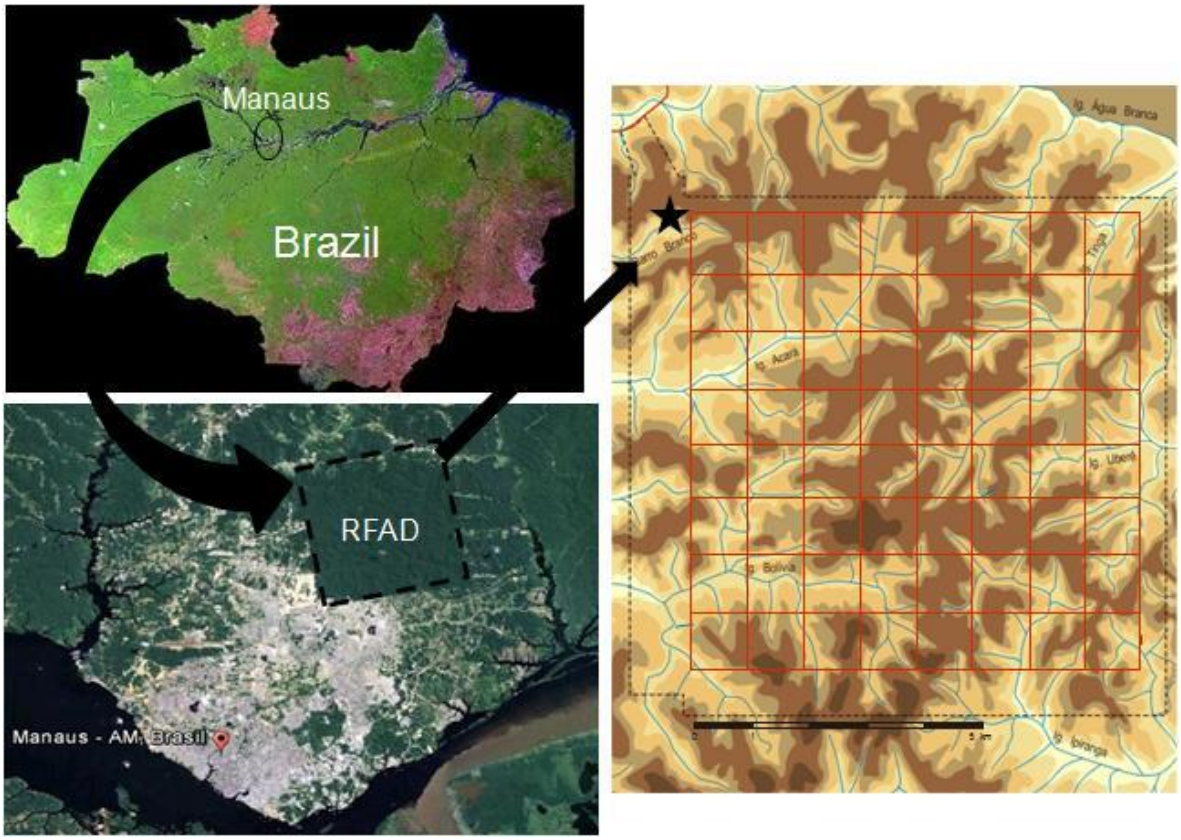


Figura 1. Localização geográfica da área de estudo na Reserva Florestal Adolpho Ducke, nas proximidades da cidade de Manaus/AM.

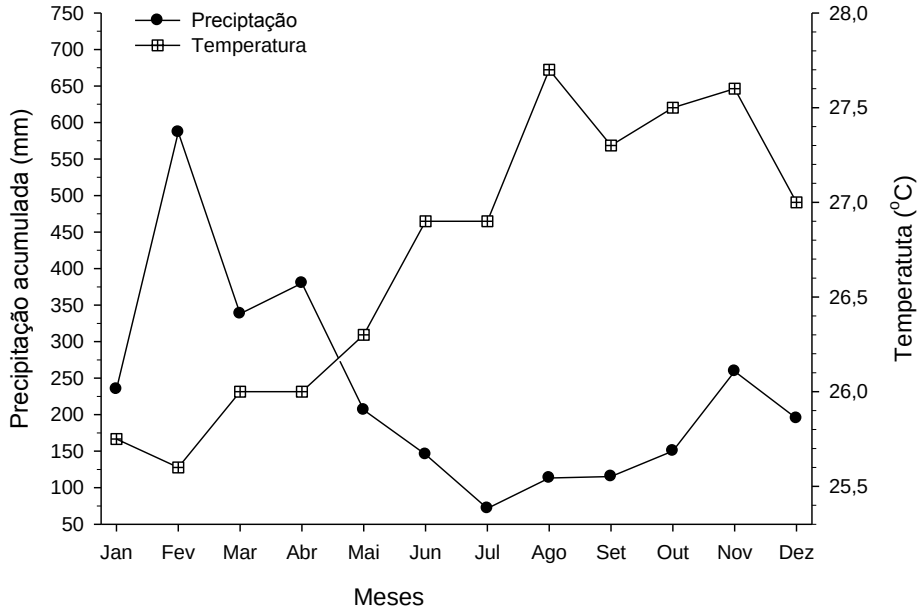


Figura 2. Valores médios de precipitação acumulada (mm) e temperatura (^{o}C) na região da RFAD durante o ano de 2011. As medidas são referentes à área da EMBRAPA-Manaus.

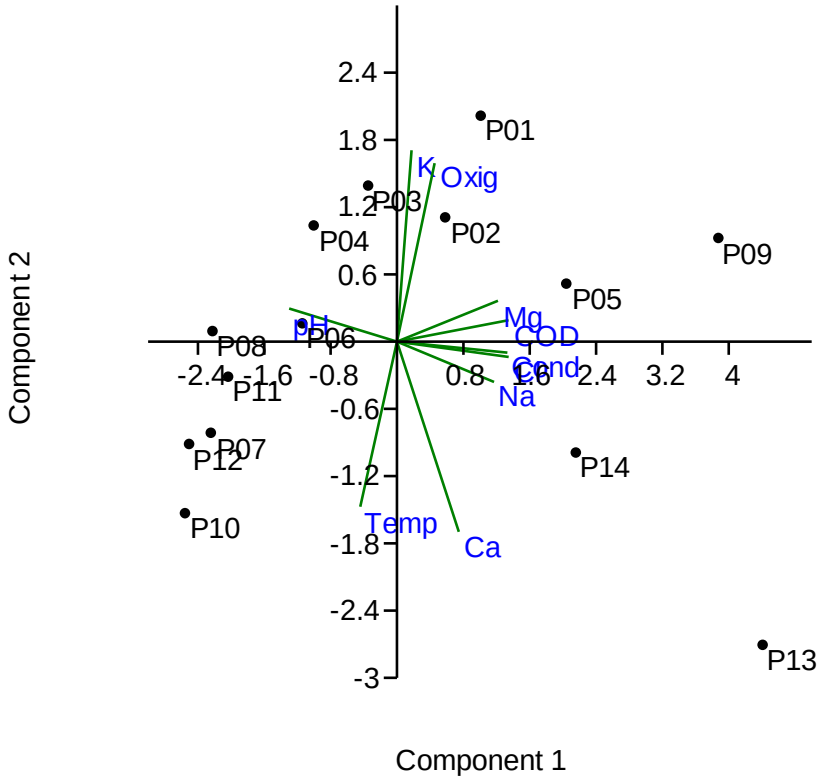


Figura 3. Representação gráfica dos dois primeiros eixos da PCA mostrando a relação entre as variáveis ambientais e a distribuição dos 14 igarapés da RFAD no período de chuvas (Fev/2011).

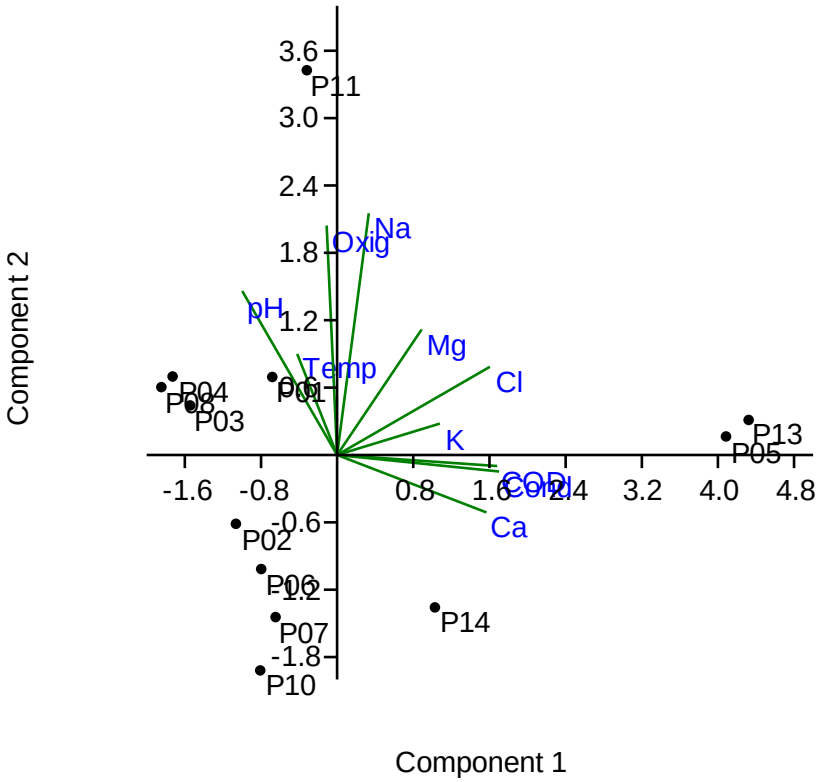


Figura 4. Representação gráfica dos dois primeiros eixos da PCA mostrando a relação entre as variáveis ambientais e a distribuição dos 14 igarapés da RFAD no período de estiagem (Set/2011).

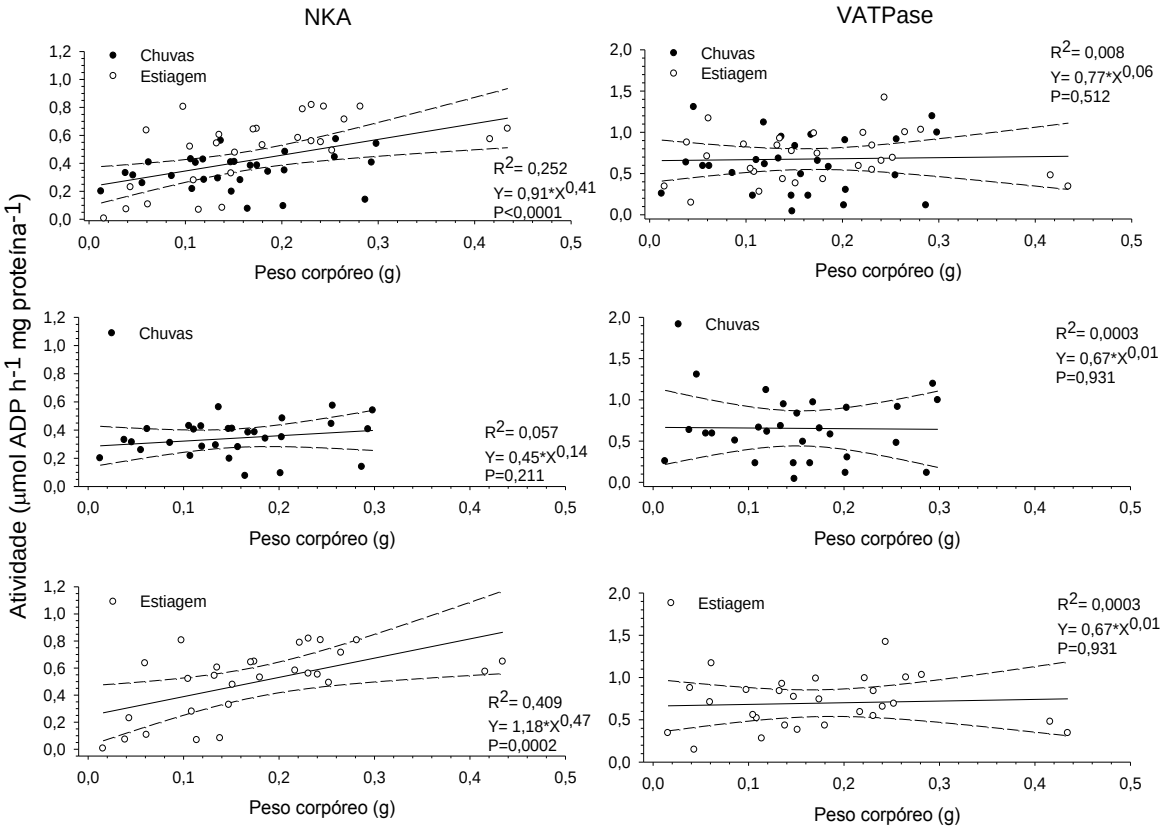


Figura 5. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (μmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Aequidens pallidus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

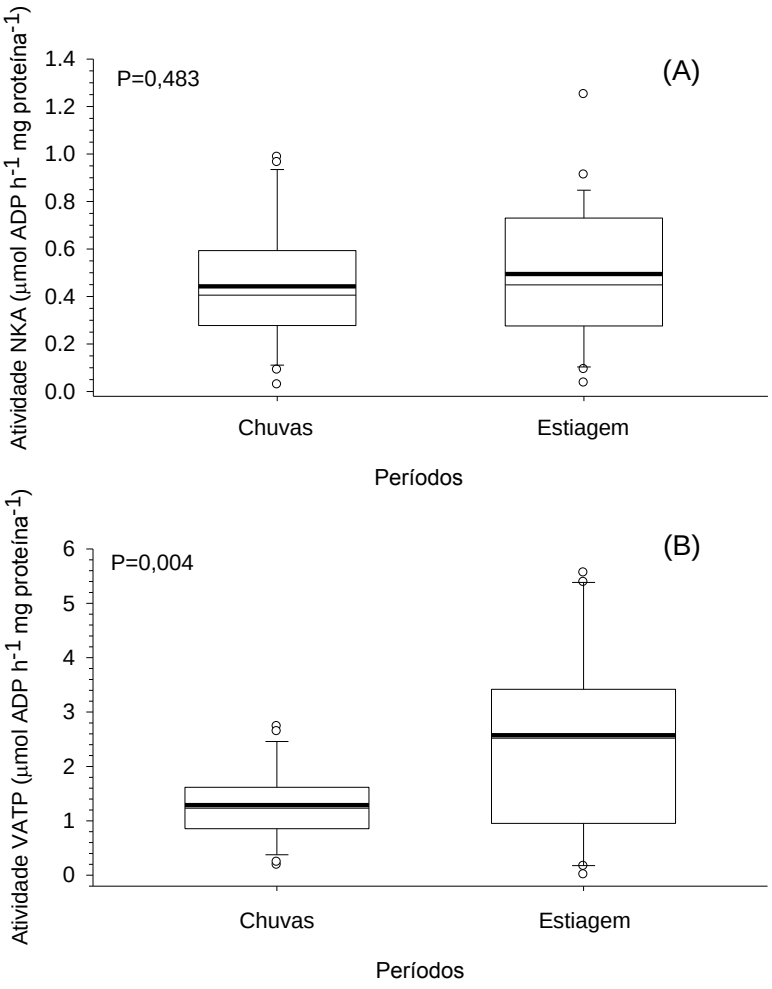


Figura 6. Boxplot da atividade da Na^+,K^+-ATPase (A) e H^+-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Aequidens pallidus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

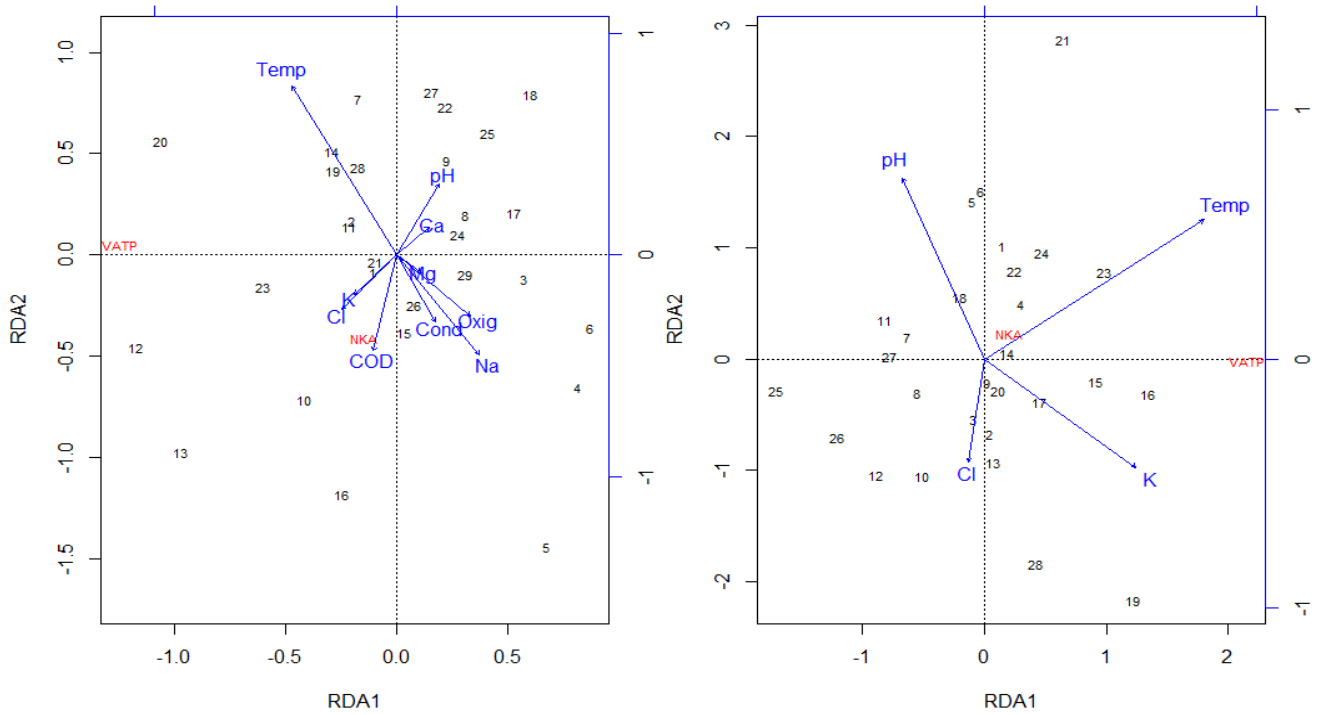


Figura 7. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Aequidens pallidus* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

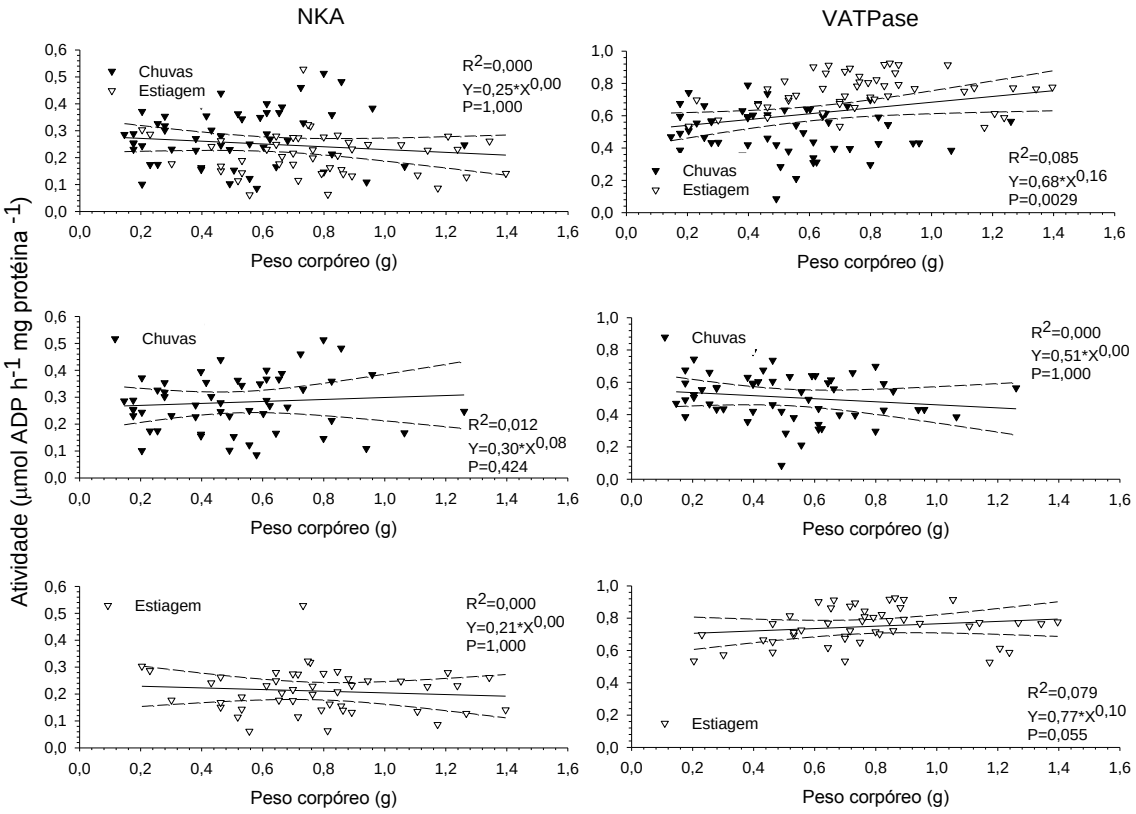


Figura 8. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Bryconops giacopinii* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

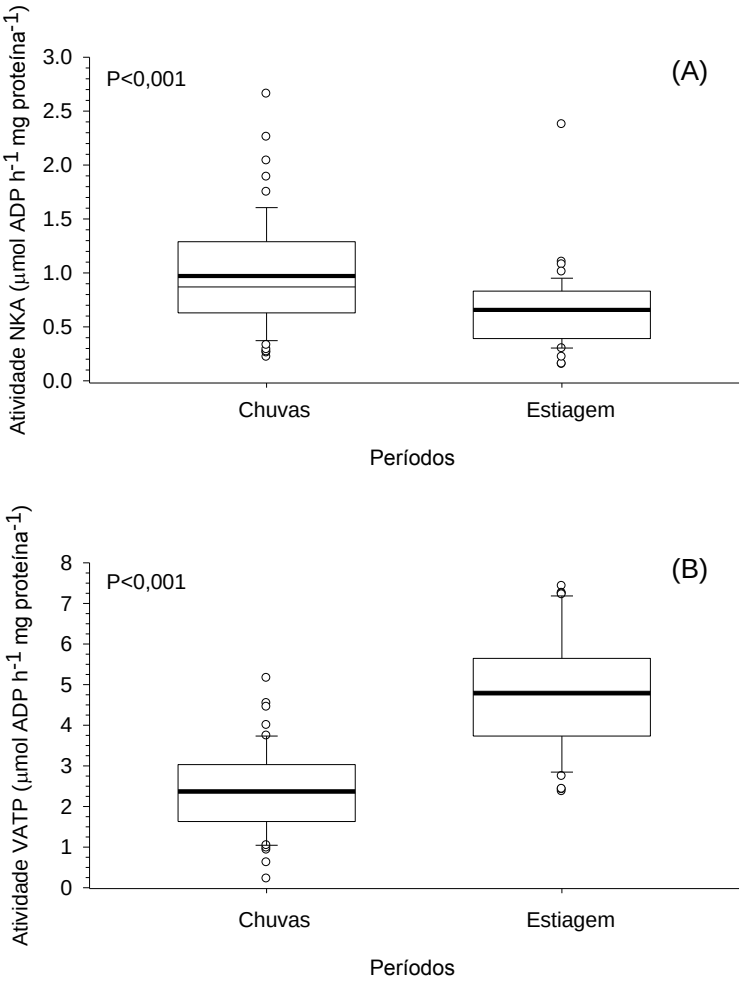


Figura 9. Boxplot da atividade da Na^{+},K^{+}-ATPase (A) e H^{+}-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Bryconops giacopinii* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

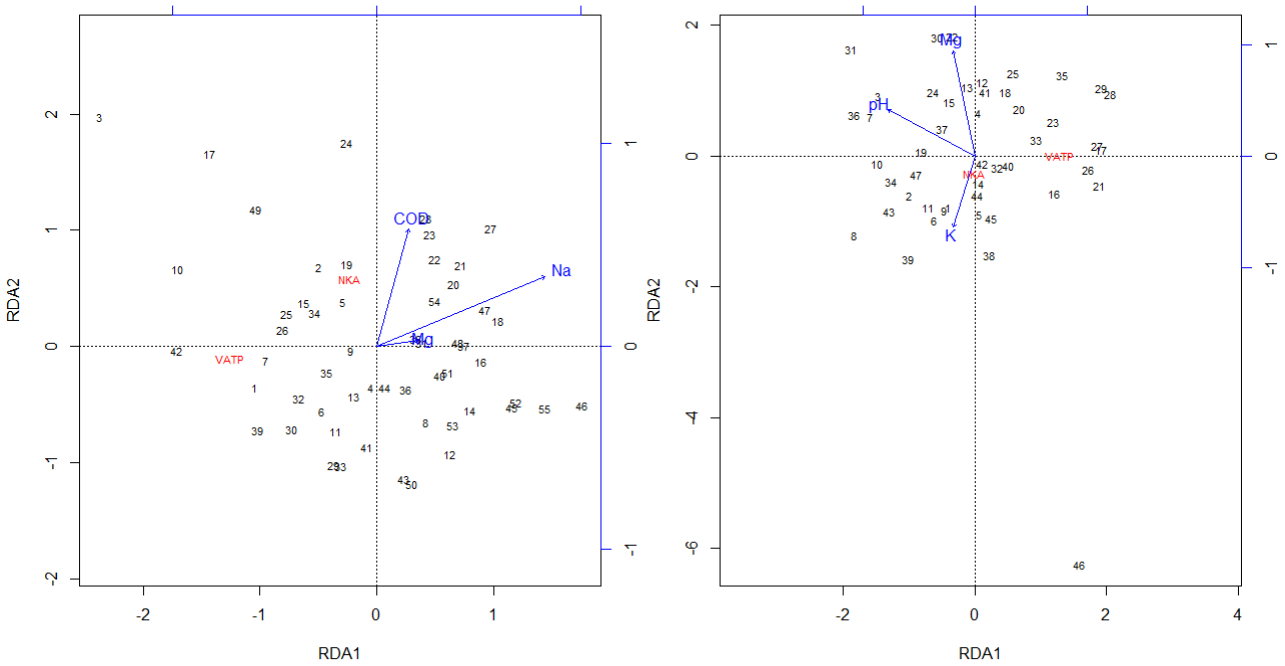


Figura 10. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Bryconops giacopinii* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

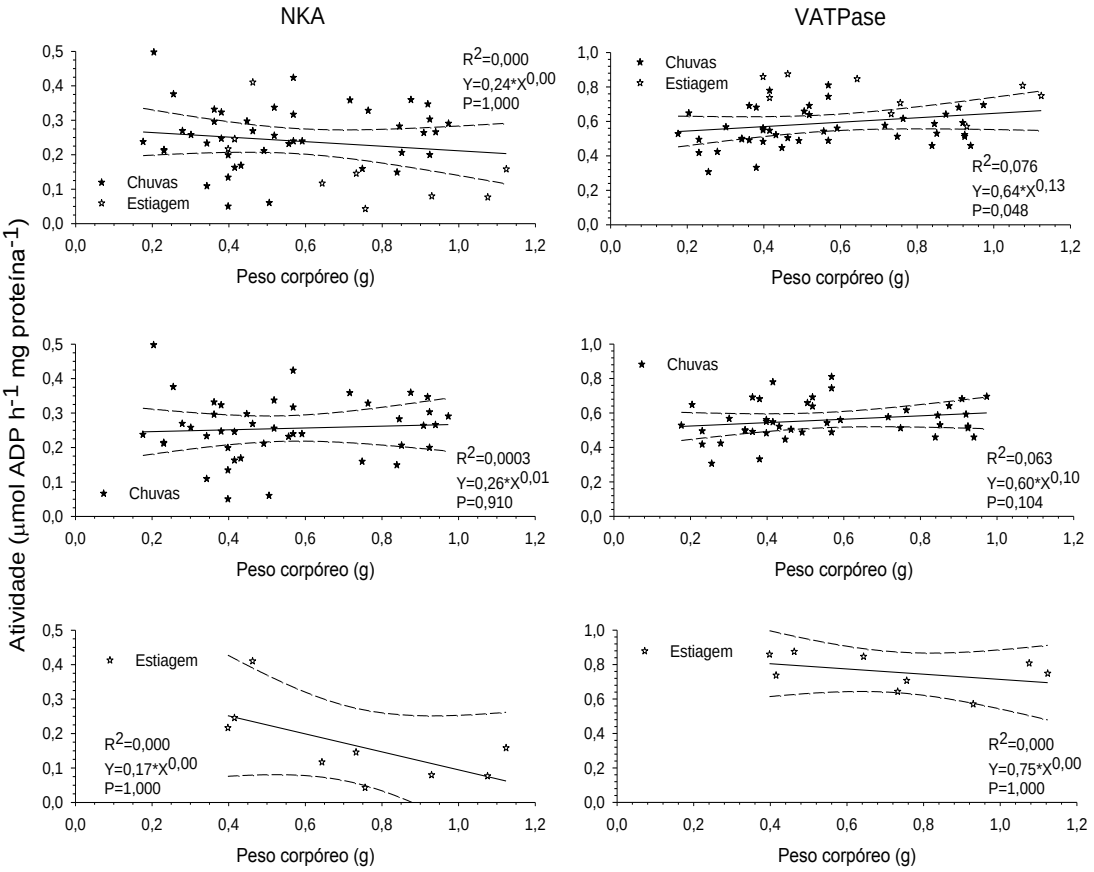


Figura 11. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Bryconops inpai* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

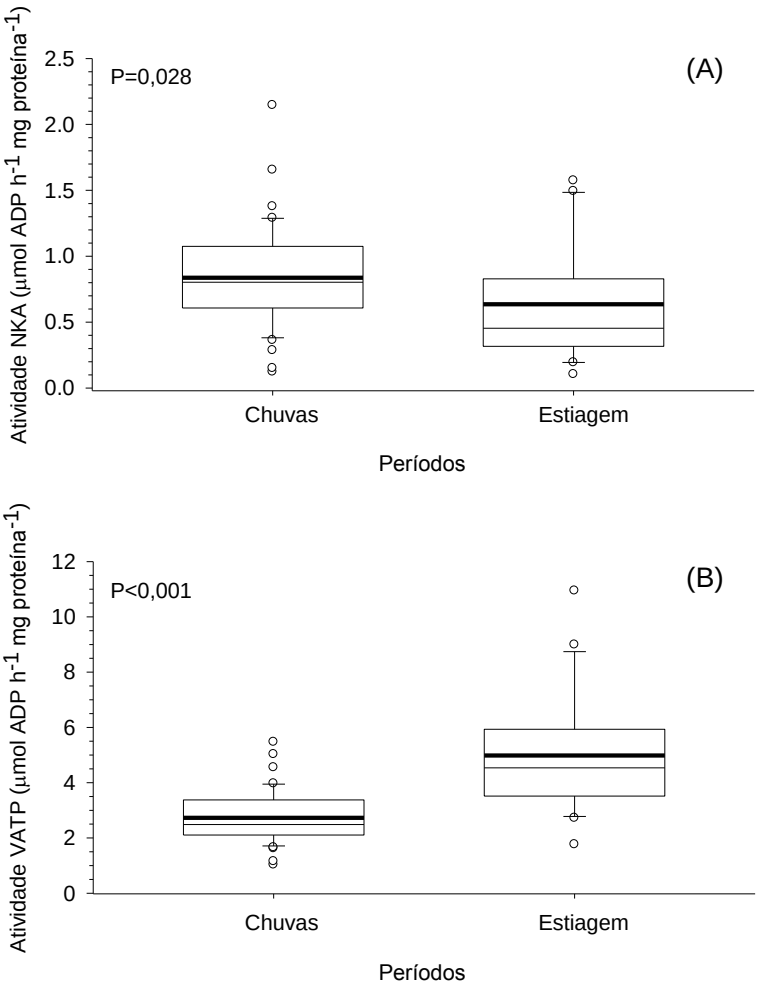


Figura 12. Boxplot da atividade da Na^{+},K^{+}-ATPase (A) e H^{+}-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Bryconops inpai* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

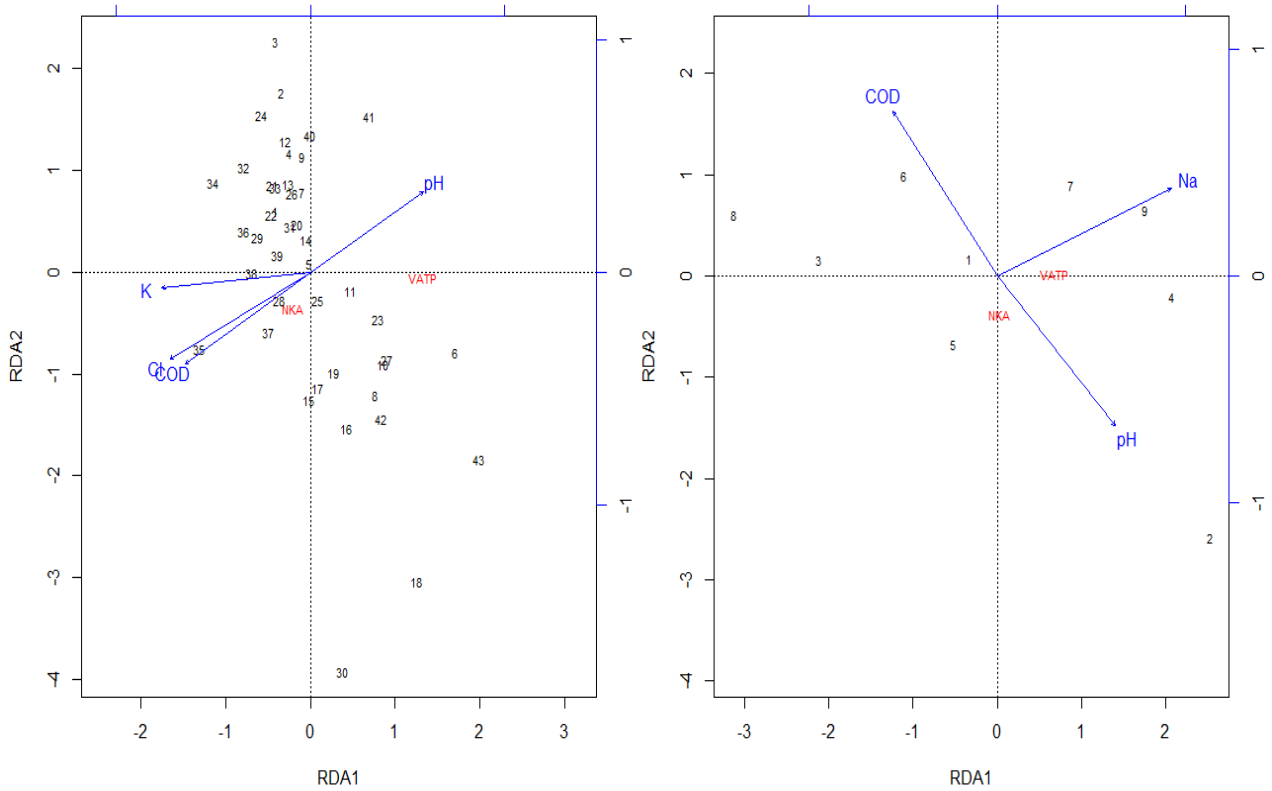


Figura 13. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Bryconops inpai* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

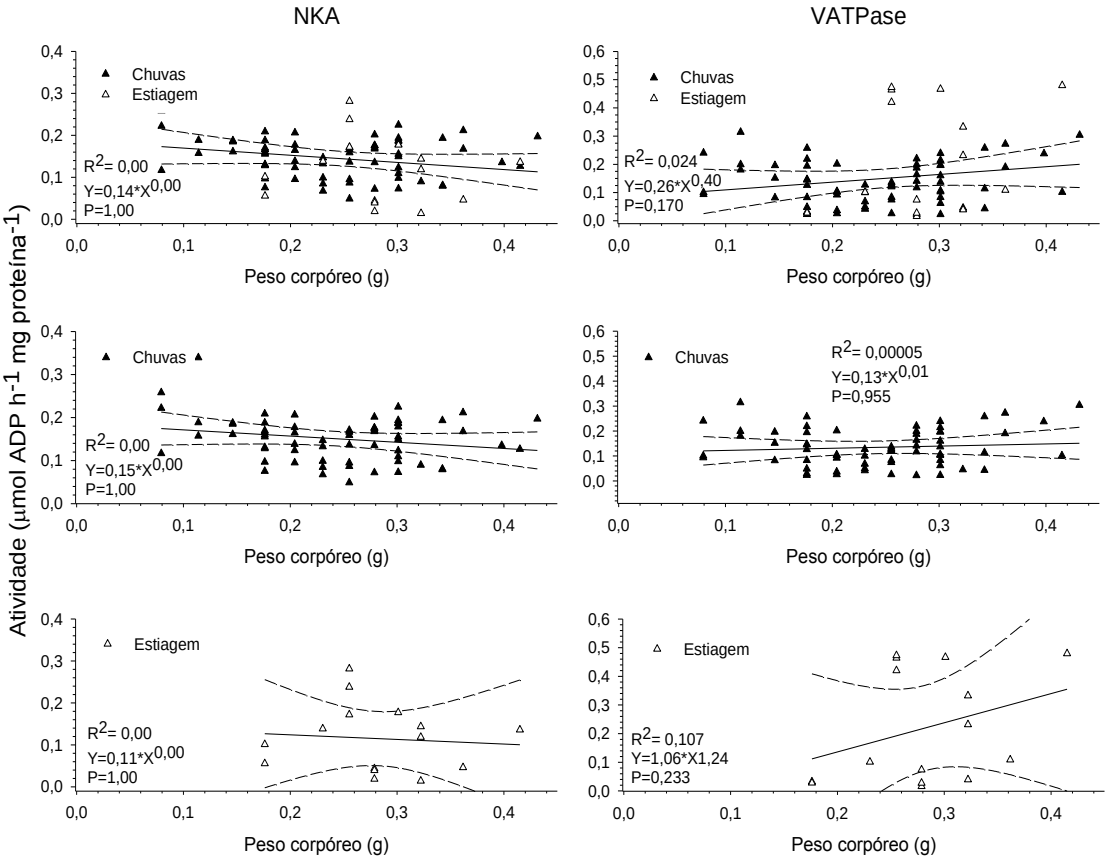


Figura 14. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Crenuchus spilurus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

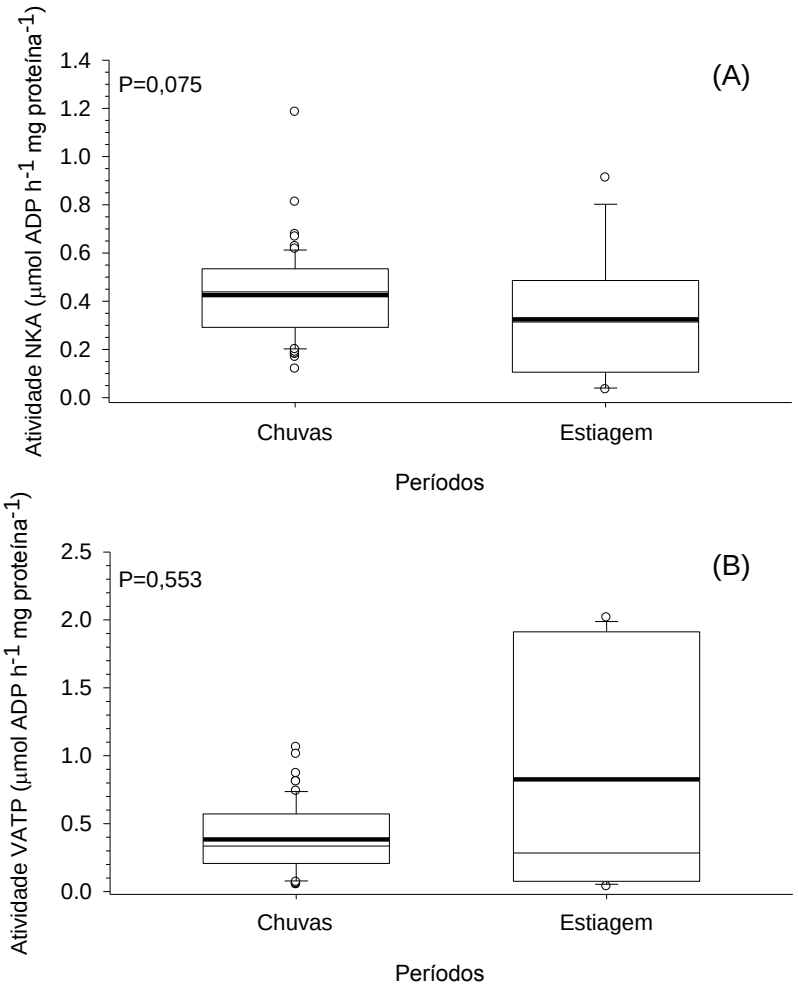


Figura 15. Boxplot da atividade da Na^+,K^+-ATPase (A) e H^+-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Crenuchus spilurus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

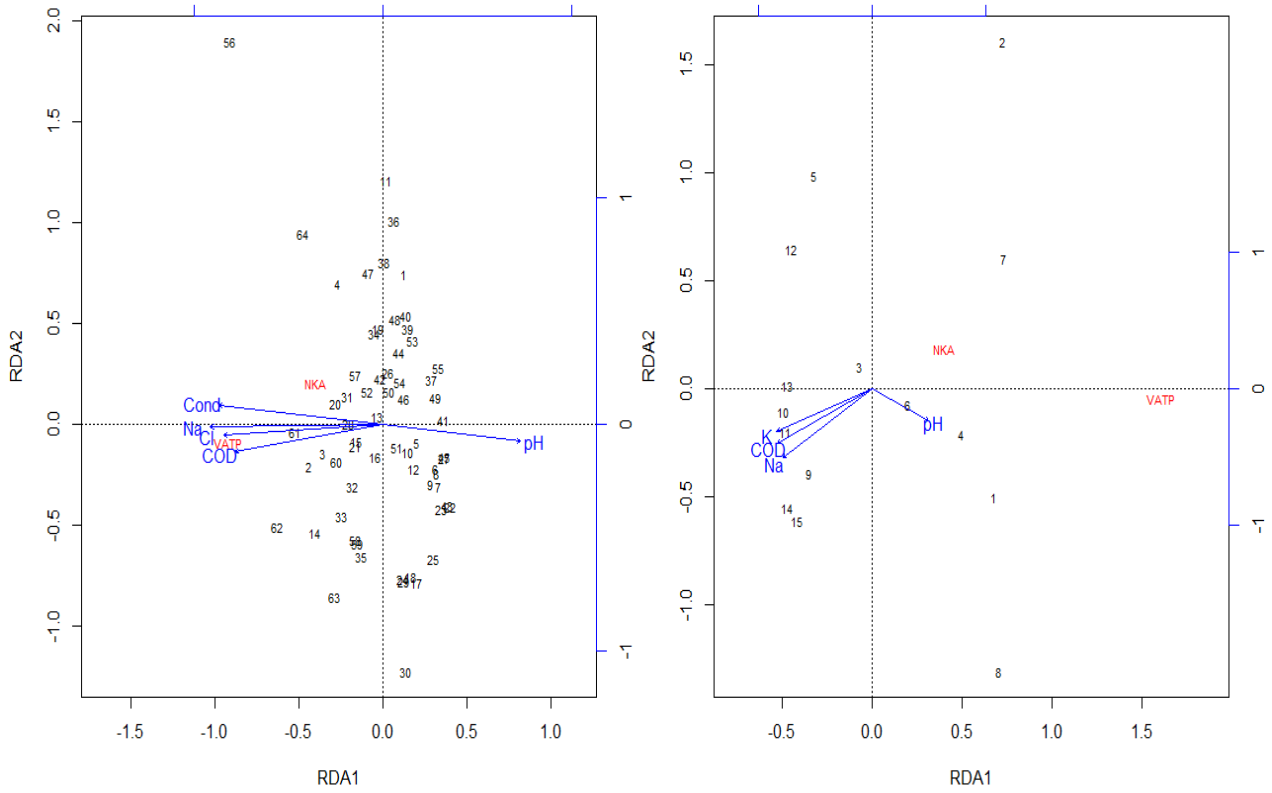


Figura 16. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Crenuchus spilurus* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

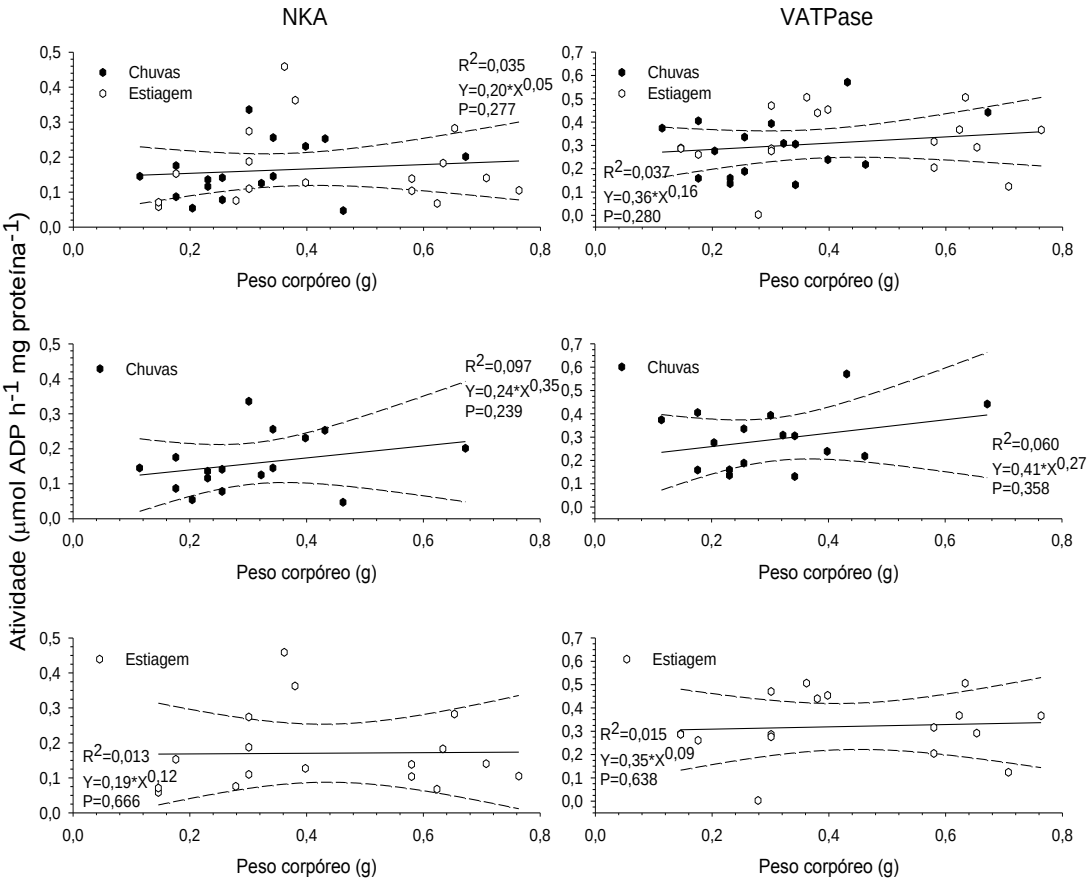


Figura 17. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Hemigrammus pretoensis* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

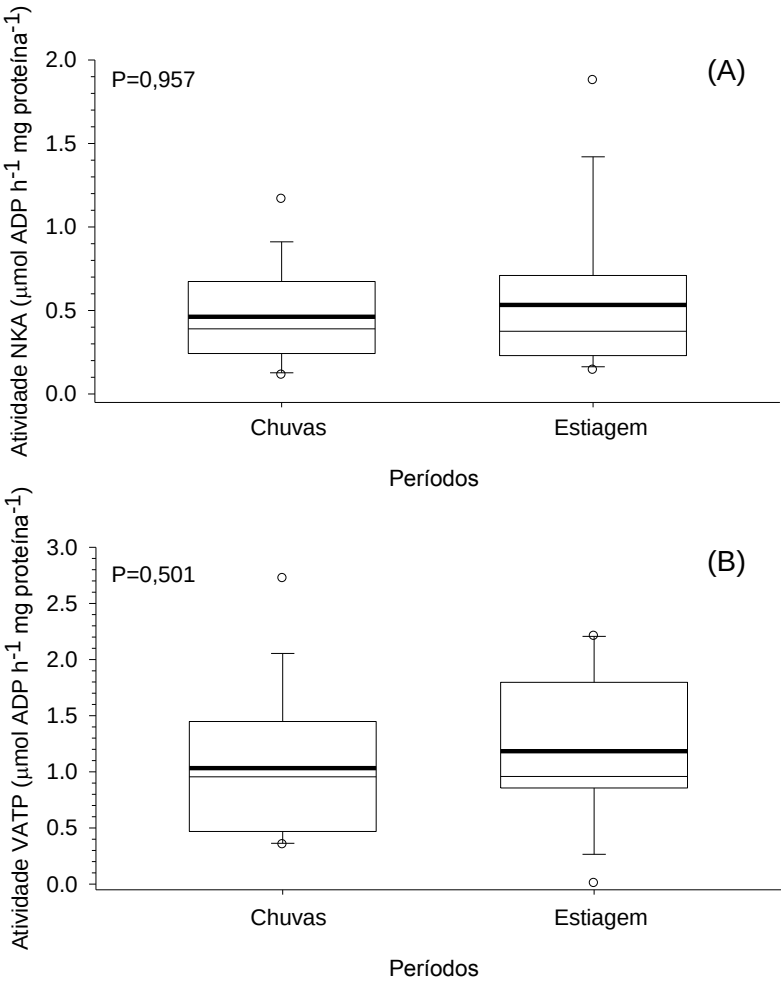


Figura 18. Boxplot da atividade da Na^+,K^+-ATPase (A) e H^+-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Hemigrammus pretoensis* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

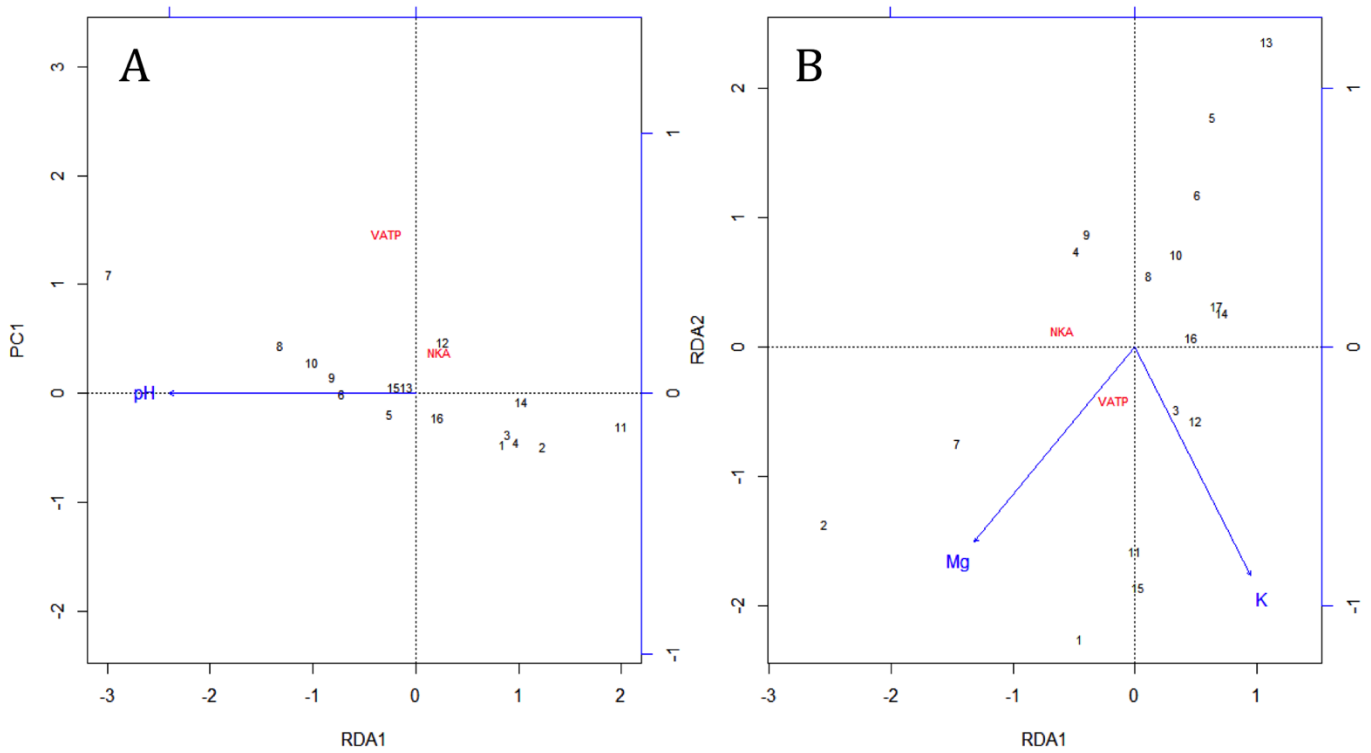


Figura 19. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Hemigrammus pretoensis* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

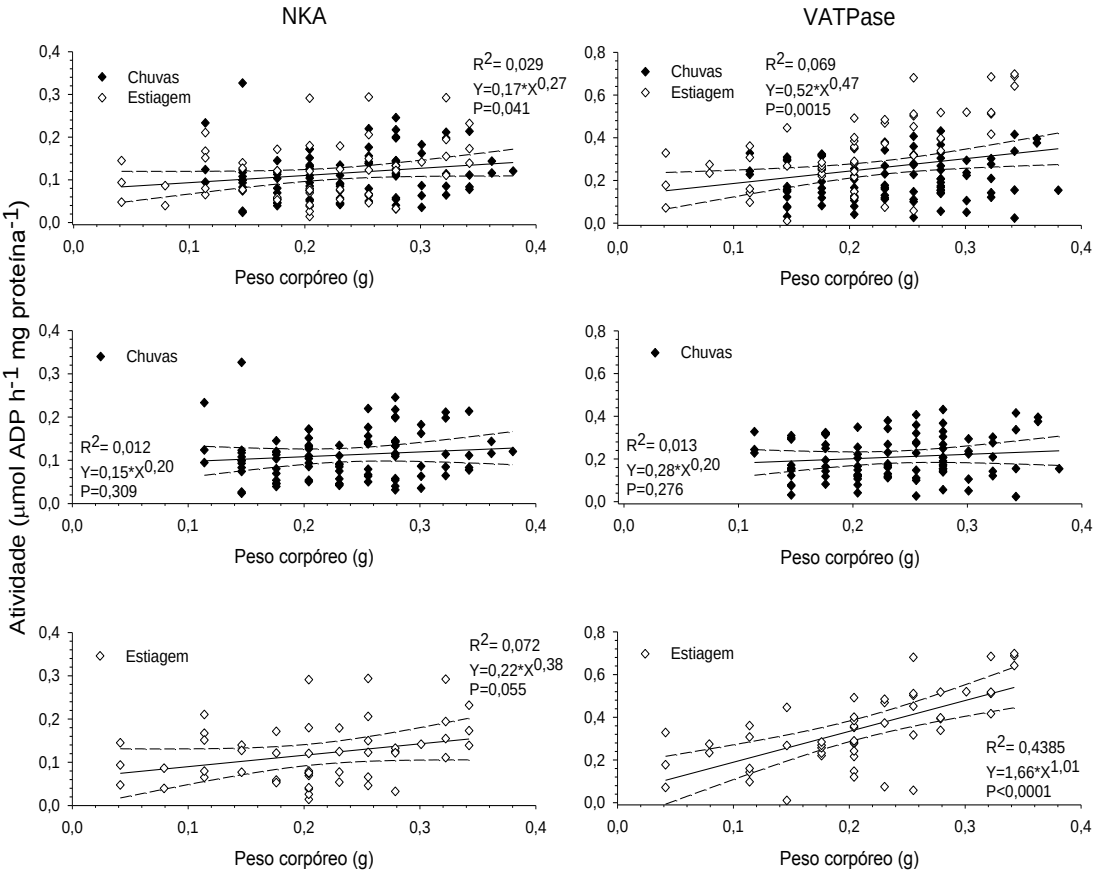


Figura 20. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Hyphessobrycon aff. melazonatus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

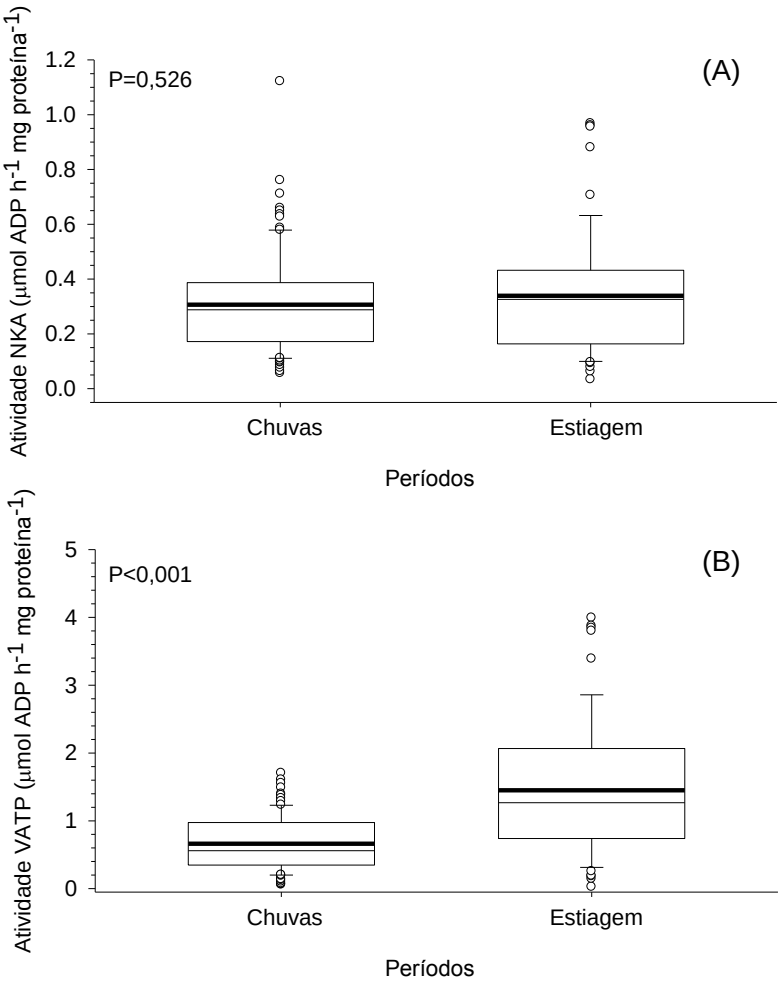


Figura 21. Boxplot da atividade da Na^+,K^+-ATPase (A) e H^+-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Hyphessobrycon aff. melazonatus* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

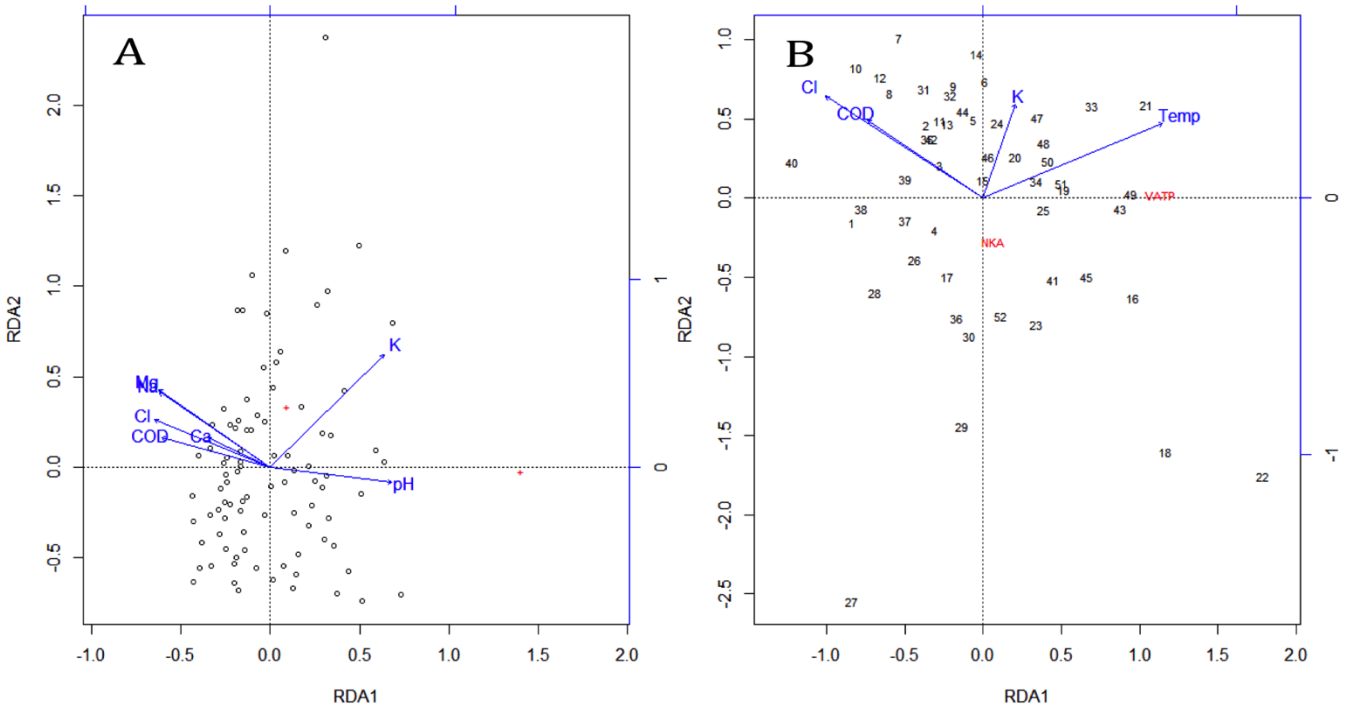


Figura 22. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Hyphessobrycon aff. melazonatus* no período de chuvas (A) e estiagem (B).

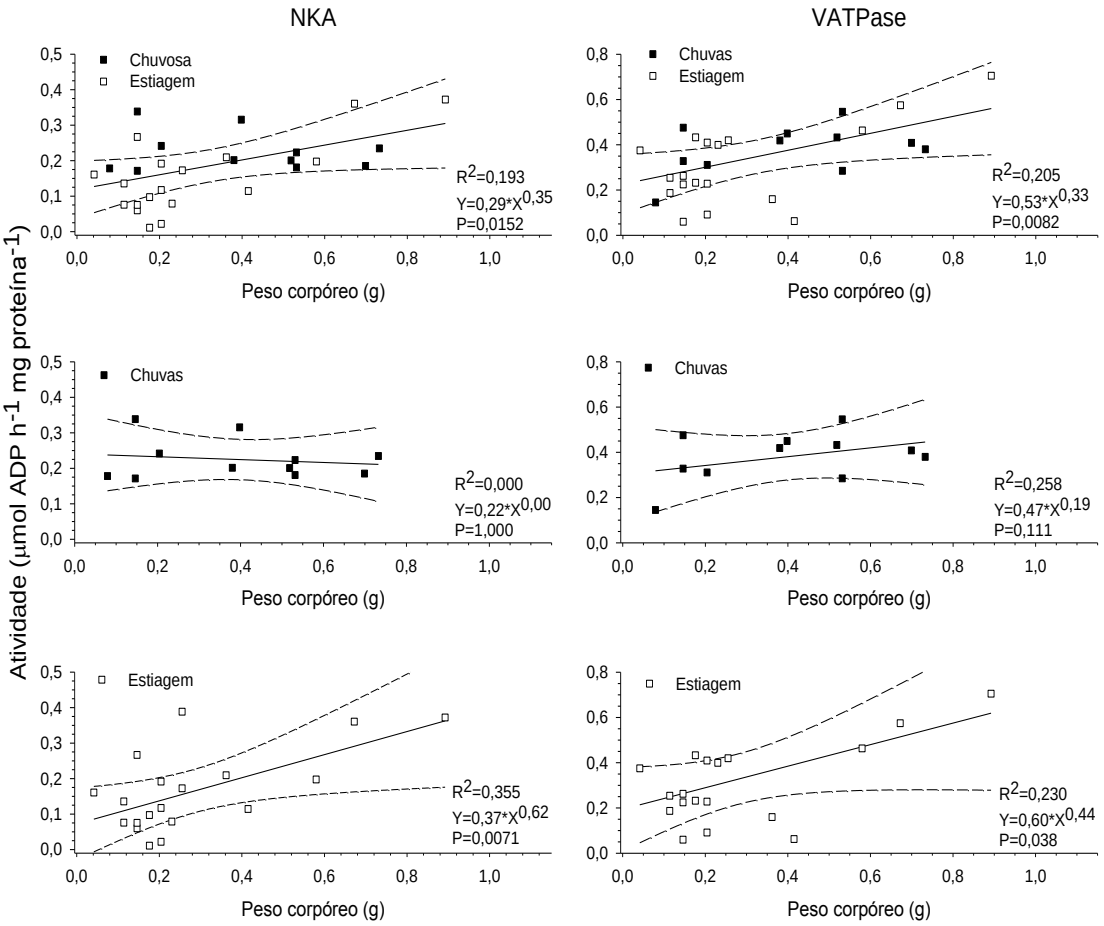


Figura 23. Relação entre o peso corpóreo (g) e atividade de ATPases (µmol ADP h^{-1} mg $proteína^{-1}$) nas brânquias de *Pyrrhulina brevis* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem). Valores de atividade enzimática (Y) foram analisados em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação $Y=a*X^b$, usando transformação logarítmica.

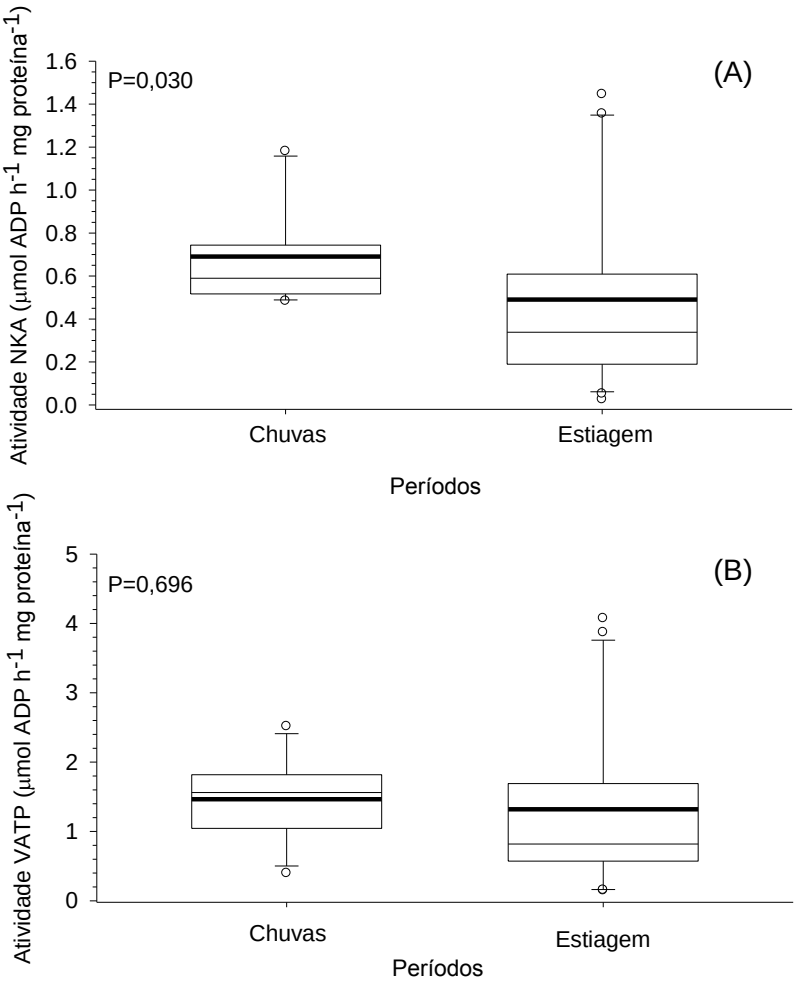


Figura 24. Boxplot da atividade da Na^+,K^+-ATPase (A) e H^+-ATPase (B) (µmol ADP h^{-1} mg proteína^{-1}) nas brânquias de *Pyrrhulina brevis* nos dois períodos de coleta (chuvas e estiagem).

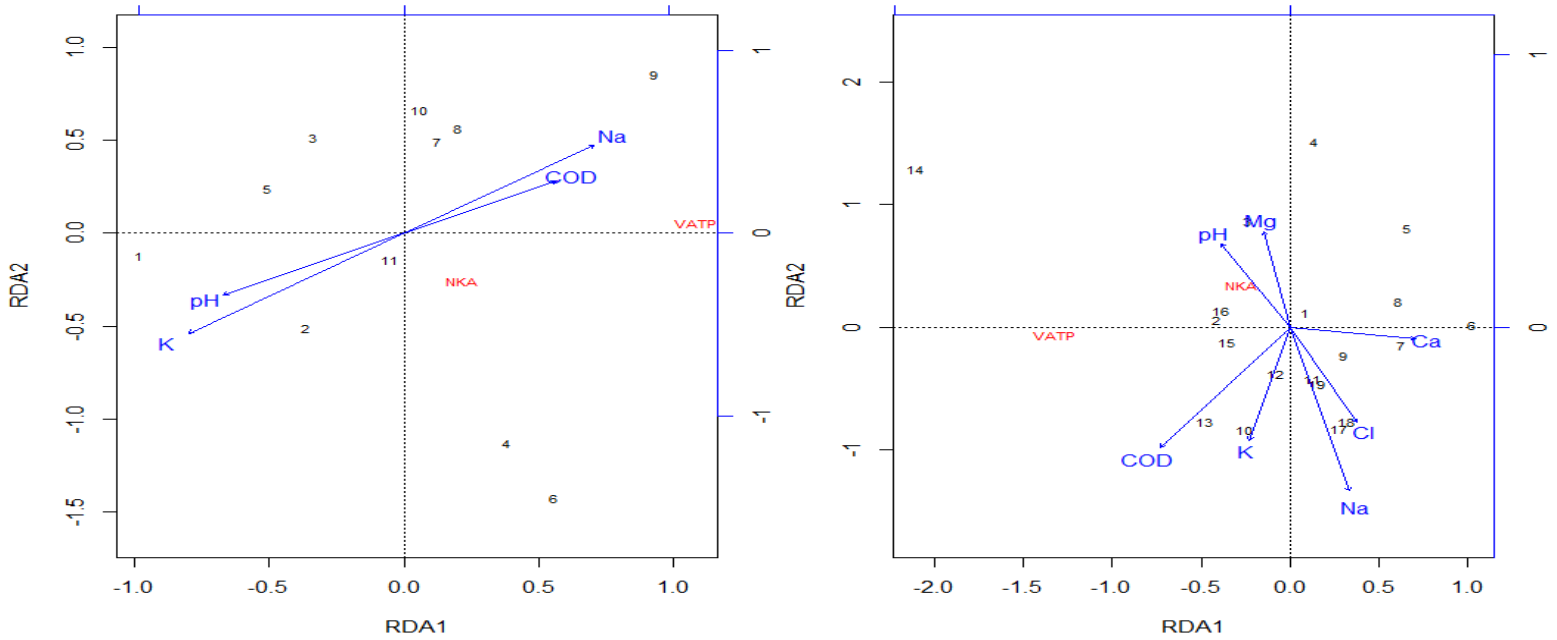


Figura 25. Representação gráfica dos dois eixos da RDA mostrando os gradientes nas propriedades físicas e químicas da água dos igarapés e sua relação com a atividade da H^+-ATPase (VATP) e Na^+/K^+-ATPase (NKA) nas brânquias de *Pyrrhulina brevis* no período de chuvas (A) e de estiagem (B).

CONCLUSÕES GERAIS

- O transporte branquial de Na^+ em diferentes espécies de peixes da Amazônia expostos de forma aguda a águas ácidas e ionicamente pobres está diretamente associado à atividade da VATP. O aumento e/ou manutenção de altas taxas de influxo de Na^+ em *N. marginatus* e *H. copelandi*, expostos por 1 h a condições ácidas e com baixa concentração de sais dissolvidos, está relacionado a uma maior atividade da VATP, enquanto a redução da atividade dessa enzima nessas condições é acompanhada de diminuição na absorção de Na^+ em *M. insignis*, sendo também associada à reduzida capacidade de transporte em *P. scalare* e *S. discus*.

- As espécies de ciclídeos *P. scalare* e *S. discus* diferem quanto ao controle da permeabilidade da membrana branquial. A maior tolerância de *S. discus* a condições ácidas e com baixa disponibilidade de sais dissolvidos envolve maior controle das perdas (efluxo e fluxo líquido) de Na^+ em relação a *P. scalare*.

- O funcionamento da VATP e da NKA no transporte branquial de Na^+ em *H. copelandi* é diferencialmente modulado pelas propriedades físicas e químicas da água, e pelo tempo de exposição a essas condições. Durante a exposição aguda ao pH ácido, em águas com reduzida concentrações de sais dissolvidos, e sob temperatura ambiente, o transporte de Na^+ nas brânquias de *H. copelandi* está relacionado à atividade da VATP. Da mesma forma, a aclimatação a longo prazo ao baixo pH e ao aumento de temperatura da água evidencia o papel fundamental da VATP no transporte branquial de Na^+ nessa espécie. Contudo, outros mecanismos de transporte de Na^+ devem estar presentes nas brânquias de *H. copelandi*, particularmente durante a exposição aguda a condições ácidas e de temperatura elevada.

- Variações intraespecíficas e interespecíficas nos mecanismos branquiais de transporte de Na^+ estão envolvidos na adaptação de peixes às condições ambientais dos igarapés da micro bacia do Acará. A variação sazonal das condições ambientais (chuvas x estiagem) modula a atividade da VATP e NKA nas brânquias de diferentes espécies de peixes de igarapés (variação interespecífica). Além disso, os gradientes formados por diferentes propriedades físicas e químicas da água dos igarapés estão diretamente relacionados à atividade da VATP, e em menor frequência e magnitude da NKA, em cada um dos períodos analisados (variação intraespecífica), sendo a atividade dessas

enzimas regulada diferencialmente entre as espécies em função dos gradientes ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonso A.G; Barbosa C.; Novo E.M.L.M. 2011. Water quality changes in flooodplain lake due to the Amazon River flood pulse: Lago Grande de Curuaí (Pará). *Brazilian Journal of Biology* 71: 601-610.

Anjos H.D.B. 2007. Efeitos da fragmentação florestal sobre as assembléias de peixes de igarapés da zona urbana de Manaus, Amazonas. Dissertação de Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, INPA, Manaus, 98p.

Anjos M.B.; Zuanon J. 2007. Sampling effort and fish species richness in small terra firme forest streams. *Neotropical Ichthyology* 5: 45-52.

Avella M.; Bornancin M. 1989 A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology* 142: 155-175.

Baldisserotto B.; Val A.L. 2002. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. *Brazilian Journal of Biology*. 62: 749-752.

Barletta A.J.; Baigun C.; Fontoura N.F.; Agostinho A.A.; Almeida-Val V.M.F.; Val A.L.; Torres R.A.; Jimenes-Segura L.F.; Giarrizzo T.; Fabré N.N.; Batista V.S.; Lasso C.; Taphorn D.C.; Costa M.F.; Chaves P.T.; Vieira J.P.; Corrêa P.T. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical system. *Journal of Fish Biology* 76: 2118-2176.

Blanco G.; Mercer R.W. 1998. Isozymes of the Na+/K+-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 275: 633-650.

Boisen A.M.; Amstrup J.; Novak I.; Grosell M. 2003. Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1618: 207-218.

Bojsen B.H.; Barriga R. 2002. Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. *Freshwater Biology* 47: 2246-2260.

Borges J.T. 2006. Saneamento e suas interfaces com os igarapés de Manaus. *T&C Amazônia* 9: 50-58.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemical* 72: 248-254.

Bührnheim C.M.; Cox-Fernandes C. 2001. Low seasonal variation of fish assemblages in Amazonian rain forest streams. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 12: 65-78.

Busacker G. P.; Chavin W. 1981 Characterization of Na^+-K^+-ATPases and Mg^{2+}-ATPases from the gill and the kidney of the goldfish *(Carassius auratus* L.). *Comparative Biocheistry and. Physiology. B* 69: 249-256.

Bystriansky J.S.; Schulte P.M. 2011. Changes in H^+-ATPase and Na^+/K^+-ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *The Journal of Experimental Biology* 214: 2435-2442.

Campell P.G.C.; Twiss M.R.; Wilkinson K.J. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2543-2554.

Carvalho L.N. 2008. História natural de peixes de igarapés amazônicos: utilizando a abordagem do Conceito do Rio Contínuo. Tese de Doutorado em Ecologia, INPA, Manaus, 142p.

Chasiotis H.; Effendi J.C.; Kelly S.P. 2009. Occludin expression in goldfish held in ion-poor water. *Journal of Comparative Physiology B* 179: 145-154.

Chasiotis H.; Kolosov D.; Bui P.; Kelly S.P. 2012. Tight junctions, tight junctions proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.020.

Chown S. L.; Gaston K. J.; Robinson D. 2004. Macrophysiology: large-scale patterns in physiological traits and their ecological im plications. *Functional Ecology* 18:159-167.

Claiborne J.B.; Edwards S.L.; Morrison-Shetlar A.I. 2002. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology* 293: 302–319.

Craig P.M.; Wood C.M.; McClelland G.B. 2007. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *Physiological Genomics* 30: 53-60.

De Pinna M.C.C. 2006. Diversity of Tropical Fishes. In: Val A.L.; Almeida-Val V.M.F.; Randall D.J. (Eds). *The Physiology of Tropical Fishes*, p. 47-84.

Delgado G.R.; Wantzen K.M.; Tolosa M.B. 2006. Leaf-litter decomposition in an Amazonian floodplain stream: effects of seasonal hydrological changes. *Journal of the North American Benthological Society* 25: 233-249.

Dias A.C.C.P.; Neves A.D.S.; Barbosa R.C.M. 1980. Levantamento de solos da Estação Experimental Rio Negro. Boletim Técnico da CEPLAC 71:1-13.

Edwards S.L.; Tse C.M.; Toop P. 1999. Immunolocalisation of NHE3-like immunoreactivity in the gills of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the blue-throated wrasse (*Pseudolabrus tetrious*). *Journal of Anatomy* 195:465-469.

Ehrenfeld J.; Garcia-Romeu F. 1977. Active hydrogen excretion and sodium absorption through isolated frog skin. *American Journal of Physiology* 233: 46–54.

Ehrenfeld J.; Klein U.. 1997. The key role of the H^+ V-ATPase in acid–base balance and Na^+ transport processes in frog skin. *Journal of Experimental Biology.* 200: 247–256.

Ehrenfeld J.; Garcia-Romeu F.; Harvey B.J. 1985. Electrogenic active proton pump in *Rana Esculenta* skin and its role in sodium ion transport. *Journal of Physiology* 359: 331–355.

Espitiro-Santo H.M.V. 2007. Variação temporal da ictiofauna em igarapés de terra-firme, Reserva Ducke, Manaus, Amazonas. Dissertação de Mestrado em Ecologia, INPA, Manaus, 44p.

Evans D.H. 2008. Teleost fish osmoregulation: What have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: 1199 –1212.

Evans D.H. (2011). Freshwater fish gill ion transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiologica* 202: 349-359.

Evans D.H.; Piermarini P.M.; Choe K.P. 2005. The multifunctional fish gill: dominat site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion nitrogenous waste. *Physiological Review* 85: 97-177.

Fenwick J.C.; Wendelaar Bonga S.E.; Flik G. 1999. *In vivo* bafilomycin-sensitive Na^+ uptake in young freshwater fish. *The Journal of Experimental Biology* 202: 3659–3666.

Ferreira S.J.F.; Miranda S.A.F.; Marques Filho A.O.; Silva C.C. 2012. Efeito da pressão antrópica sobre igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, área de floresta na Amazônia Centra. *Acta Amazônica*.42: 533-540.

Freda J.; McDonald D.G. 1988 Physiological correlates of interspecific variation in acid tolerance in fish. *The Journal of Experimental Biology* 136: 243-258.

Furch K, 1984. Water chemistry of the Amazon basin: The distribution of chemical elements among freshwater. In: Sioli H (Ed.) *The Amazon. Limninology and landscape ecology of a might tropical river and its basin*. Boston, p. 167-197.

Furch K.; Junk W.J. 1997. Physicochemical conditions in the floodplains. In: Junk WJ (Ed.) *The Central Amazon Floodplain: Ecology of a pulsing system*. New York: Springer-Verlag Berlin, p. 69-108.

Galuch A.V. 2007. Adaptação de um índice de integridade biótica para igarapés da Amazônia Central, com base em atributos ecológicos da comunidade de peixes. Dissertação de Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, INPA, Manaus, 53p.

Galvez, F.; Reid S.D.; Hawkings G.; Goss G.G. 2002. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 282: 658–668.

Galvez F.; Donini A.; Playle R.C.; Smith S.; O'Donnell M.; Wood C.M. 2009. A matter of potential concern: natural organic matter alters the electrical properties of fish gills. *Environmental Science & Technology* 42: 9385–9390.

Gaston K.J; Chown S.L.; Calosi P.; Bernardo J.; Bilton D.T.; Clarke A.; Clusella-Trullas S.; Ghalambor C.K.; Konarzewski M.; Peck L.S.; Porter W.P.; Portner H.O.; Rezendo E.L.; Schulte P.M.; Spicer J.I.; Stillman J.H.; Terblanche J.S.; van Kleunen M. 2009. Macrophysiology: A concenptual reunification. *American Naturalist* 174: 595-612.

Gonzalez R.J. Dunson W.A. 1987. Adaptations of sodium balance to low pH in a sunfish (*Enneacanthus obesus*) from naturally acidic waters. *Journal of Comparative Physiology* 157: 555-566.

Gonzalez R.J.; McDonald D.G. 1994. The relationship between uptake and ion loss in fish from diverse habitats. *The Journal of Experimental Biology* 190: 95-108.

Gonzalez R.J. Dalton V.M.; Patrick M.L. 1997. Ion regulation in ion-poor, acidic water by the blackskirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*), a fish native to the Amazon River. *Physiological Zooloogy* 70: 428–435.

Gonzalez R.J.; Wood C.M.; Wilson R.W.; Patrick M.; Bergman H.; Narahara A.; Val A.L. 1998. Effects of water pH and Ca^{2+} concentrations on ion balance in fish of Rio Negro, Amazon. *Physiological Zooloogy* 71: 15-22.

Gonzalez R.J.; Preest M. 1999. Mechanisms for exceptional tolerance of ion-poor, acidic waters in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). *Physiological and Biochemical Zooloogy* 72: 156-163.

Gonzalez R.J.; Wilson R.W. 2001. Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic Rio Negro. *The Journal of Experimental Biology* 58: 1680-1690.

Gonzalez R.J.; Wilson R.W.; Wood C.M.; Patrick M.L.; Val A.L. 2002. Diverse strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zooloogy* 75: 37-47.

Gonzalez R.J.; Wilson R.W.; Wood C.M. 2006. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (Eds). *The Physiology of Tropical Fishes,* Academic Press, London, p. 397-442.

Goss G.G.; Adamis S.; Galvez F. 2001. Peanut lectin binds to a subpopulation of mitochondria-rich cells in the rainbow trout Gill epithelium. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 281: 1718 –1725.

Grosell M.; Wood C.M. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *The Journal of Experimental Biology* 205: 1179-1188.

Hamer O.; Harper D.A.T.; Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Eletrônica* 4: 9p.

Hazel J. R.; Prosser C. L. 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological. Reviews* 54: 620-668.

Hirata T.; Kaneko T.; Ono T.; Nakazato T.; Furukawa N.; Hasegawa S.; Wakabayashi S.; Shigekawa M.; Chang M.H.; Romero M.F.; Hirose S. 2003. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: 1199 –1212.

Hirose S.; Kaneko Y.; Naito N.; Takei Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136: 593-620.

Ho S.; Chan D.K.O. 1980. Branchial ATPases and ionic transport in the eel, *Anguilla japonica*. I-Na^+/K^+-ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 66: 255-260.

Hochachka P.W.; Somero G.N. 2002. *Biochemical Adaptation – Mechanisms and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, New York, 466p.

H$_{\text{ø}}$gasen H.R. 1998. Physiological changes associated with the diadromous migration of salmonids. National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, 26p.

Holland A.; Duivenvoorden L.; Kinnear S.H.W. 2012. Naturally acidic waterways: conceptual food webs for better management and understanding of ecological functions. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* DOI: 10.1002/aqc.2267.

Horng J.L.; Lin L.Y.; Huang C.J.; Katoh F.; Kaneko T.; Hwang P.P. 2007. Knockdown of V-ATPase subunit A (*atp6v1a*) impairs acid secretion and ion balance in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 292: 2068-2076.

Horng J.L.; Lin L.Y.; Hwang P.P. 2009. Functional regulation of H^+-ATPase rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 296: 682-692.

Houston A.R.; Mearow K.M. 1982. Branchial and renal (Na^+/K^+)ATPase and carbonic anhydrase activities in a eurythermal freshwater teleost, *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 71: 175-180.

Hwang P.P.; Lee T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 148: 479-497

Hwang P.P. 2009. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Experimental Biology* 212: 1745-1752.

Hwang P.P.; Tsung-Han L.; Li-Yih L. 2011 Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 301: 28-47.

IPCC. 2007. *Fourth Assessment Report: Climate Change 2007: Synteses Report*. Geneza, Switzerland, 52p.

Jensen L.J.; Willumsen N.J.; Amstrup J.; Larsen E.H. 2003. Proton pump-driven cutaneous chloride uptake in anuran amphibian. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1618: 120–132.

Junk W.J. 1983. As águas da região amazônica. *In*: Salati, E.; Shubart, H.O.R.; Junk, W.J.; Oliveira, A.E. (Eds.). *Amazônia: Desenvolvimento, integração e ecologia*. CNPq/Ed. Brasiliense, Brasília. 327p.

Junk W.J. 1993. Wetlands of tropical South-America. *In*: Whigham, D.F. (Ed.) *Wetlands.of world*. Kluwer. Hague. p. 679-739.

Junk W.J.; Furch K. 1985. Physical and chemical properties of Amazonian waters and theirs relationship with the biota. In: Prance G.T.; Lovejoy T.E. (Eds). *Key environments Amazonia*. New York, Pergamon Press, p. 3-17.

Junk W.J.; Bayley J.B.; Sparks R.E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE, D. P. (Ed.). *In:* Dodge D.P. (Ed). *Proceedings of the International Large River Symposium*. Otawa: Canadian Special Publications on Fisheries and Aquaculture Science 106. p. 110-127.

Junk W. J.; Wantzen K. M. 2004. The flood pulse concept: new aspects, approaches, and applications—an update. In: Welcomme R. L.; Petr T. (Eds) *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries* Volume 25 Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization and Mekong River Commission, Bangkok, Thailand p. 117–149.

Katoh F.; Hyodo S.; Kaneko T. 2003. 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. *The Journal of Experimental Biology* 206: 793–803.

Kirschner L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *The Journal of Experimental Biology* 207: 1439-1452.

Kirschner L.B.; Greenwald L.; Kerstetter T.H. 1973. Effect of amiloride on sodium transport across body surfaces of freshwater animals. *American Journal Physiology* 224: 832–837.

Krogh A. 1938. The active absorption of ions in some freshwater animals. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 25: 335–350.

Krogh A. 1939. Osmotic Regulation in Aquatic Animals. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 242p.

Kültz D.; Somero G.N. 1995. Osmotic and thermal effects of in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology* 198: 1883–1894

Kumai Y.; Bahubeshi A.; Steele S.; Perry S.F. 2011 Strategies for maintaining Na^+ balance in zebrafish (*Danio rerio*) during prolonged exposure to acidic water. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 160: 52-62.

Kumai Y.; Perry S.F. 2011. Ammonia excretion via Rhcg1 facilitates Na^+ uptake in larval zebrafish, *Danio rerio*, in acidic water. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 301, 1517-1528.

Kwong R.W.M.; Kumai Y.; Perry S.F. 2012 Evidence for a role of tight junctions in regulating sodium permeability in zebrafish (*Danio rerio*) acclimated to ion-poor water. *Journal of Comparative Physiology* doi 10.1007/s00360-012-0700-9.

Legendre P.; Oksanen J.; ter Braak C.J.F. 2011. Testing the significance of canonical axes in redundancy analysis. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 269-277.

Liao B.K.; Chen R.D.; Hwang P.P. 2009 Expression regulation of Na^+-K^+-ATPase alpha1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 296: 1897–1906

Lin H.; Randall D.J. 1991. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. *The Journal of Experimental Biology* 161: 119-134.

Lin H.; Randall D.J. 1993. H^+-ATPase activity in crude homogenate of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *The Journal of Experimental Biology* 180: 163-174.

Lin H.; Randal D.J. 1995. Proton pumps in fish gills. In: Wood CM, Shuttleworth TJ (Eds.) *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation, Fish Physiology*. Academic Press, London. pp 229-255

Lin L.Y.; Horng J.L.; Kunkel J.G.; Hwang P.P. 2006. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 290: 371–378.

Lowe-McConnell R.H. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Marshall W.S. 2002. Na^{+}, Cl^{2-}, Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *The Journal of Experimental Biology* 293: 264-283.

Matsuo A.Y.O.; Val A.L. 2007. 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. *The Journal of Experimental Biology* 70: 989-1000.

McCormick S. D. 1995. Hormonal control of gill Na^{+},K^{+}-ATPase activity and chloride cell function. In: Wood C.M.; Shuttleworth T.J. (Eds) *Fish Physiology*. San Diego, CA: Academic Press vol. 14 ,p. 285-315.

McCormick S. D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Integrative and Comparative Biology* 41: 781-794.

McCormick S. D.; Regish A.M.; Christensen A.K. 2001. Distinct freshwater isoforms of Na+/K+-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *The Journal of Experimental Biology* 212: 3994-4001.

McDonald D.G.; Hobe H.; Wood C.M. 1980. The influence of environmental calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *The Journal of Experimental Biology* 88: 109-131.

McDonald D.G.; Wood C.M. 1981. Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. *The Journal of Experimental Biology* 93: 101-118.

McDonald D.G. 1983. The effects of H^{+} upon gills of freshwater fish. *Canadian Journal of Zoology* 61: 691-703

McDonald D.G.; Walker R.L.; Wilkies R.L.K. 1983 The Interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. II Branchial ionoregulatory mechanisms. *The Journal of Experimental Biology* 102: 141-155.

McDonald D. G.; Tang Y.; Boutilier R. G. 198). Acid and ion transfer across the gills of fish: mechanisms and regulation. *Canadian Journal of Zoology* 67: 3046–3054.

McGeer J.C.; Szebedinsky C.; McDonald D.G.; Wood C.M. 2002. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133: 147–160.

McWillians P.G.; Potts W.T.W. 1978. The effects of pH and calcium concentration on gill potentials in the brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Comparative Physiology* 126: 277-286

McWillians P.G. 1982 The effects of calcium on sodium fluxes in the rainbow trout, *Salmo trutta*, in neutral and acid media. *The Journal of Experimental Biology* 96: 436-442.

Melo E.G.F.; Silva M.S.R.; Miranda S.A.F. 2006. Influência antrópica sobre águas de igarapés na cidade de Manaus-AM. *Caminhos de Geografia*. http://www.ig.ufu.br/revista/caminhos.html.

Mendonça F.P.; Magnusson W.E.; Zuanon J. 2005. Relationships between habitats characteristics and fish assemblages in small streams of Central Amazonia. *Copeia* 4: 751-764.

Metz J.R.; van der Burg E.H.; Wendelaar Bonga S.E.; Flik G. 2003. Regulation of branchial Na^+/K^+-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. Acclimated to different temperatures. *The Journal of Experimental Biology* 206: 2273-2280.

Milligan C.L.; Wood C.M. 1982 Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory functions associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Biology* 99: 397-415.

Nascimento C.R.; Silva M.R.S. 2010. Alterações em parâmetros físicos e em concentrações de cátions e ânions em uma micro-bacia hidrográfica de Manaus devido a expansão urbana. *Caminhos da Geografia* 11: 208-219.

Oksanen J.; Blanchet F.G.; Kindt R.; Legendre P.; O'Hara R.B.; Simpson G.L.; Solymos P.; Stevens M.H.H.; Wagner H. 2010. Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-4. http://cran.r-project.org/ web/packages/vegan.

Parks S.K.; Tresguerres M.; Goss G.G. 2007. Interactions between Na^+ channels and Na^+-HCO_3^- cotransporters in freshwater fish gill MR cell: a model for transepitelial Na uptake. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 292: 935-944.

Parks S.K.; Tresguerres M.; Goss G.G. 2008 Theoretical consideration underlying Na^+ uptake mechanism in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 148: 411-418.

Patrick M.; Wood C.M. 1999. Ion and acid-base regulation in the freshwater mummichog (*Fundulus heteroclitus*): a departure from the standard model for freshwater teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 122: 445-456.

Pazin V.F.V; Magnusson W.E.; Zuanon J.; Mendonça F.P. 2006. Fish assemblages in temporary ponds adjacent to 'terra-firme' streams in Central Amazonia. *Freshwater Biology*. 51: 1025-1037.

Perry S.F.; Laurent P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin JC and Jense FB (Eds). *Fish Ecophysiology*, Chapman & Hall, London, p 231-264.

Perry S.F.; Shahsavarani A.; Georgalis T.; Bayaa M.; Furimsky M.; Thomas S.L. 2003. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *The Journal of Experimental Zoology* 300: 53-62.

Pfeiler E. 1976. Gill ATPase activities in the smallmouth bass (*Micropterus dolomieui*). *Comparative and Biochemistry Physiology B* 53: 119-121.

Preest M.R.; Gonzalez R.J.; Wilson R.W. 2005. A pharmacological examination of Na^+ and Cl^- transport in two species of freshwater fish. *Physiological and Biochemical Zoology* 78: 259-272.

R Core Team 2012. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/.

Randall D.J.; Lin H. 1993. Effects of water pH on gas and ion transfer across fish gills. In: Rankin J.C.; Jensen F.B. (Eds). *Fish Ecophysiology*, Chapman & Hall, London, p 265-275.

Randall D.J.; Brauner C.; Wilson J. 1996. Acid excretion in Amazonian fish. In: Val A.L.; Almeida-Val V.M.F.; Randal D.J. (Eds) *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*, Editora INPA, Manaus, p 91-100.

Reid S.D.; Hawkings G.S.; Galvez F.; Goss G.G. 2003. Localization and characterization of phenamil-sensitive Na+ influx in isolated rainbowtrout gill epithelial cells. *The Journal of Experimental Zoology* 206: 551–559.

Ribeiro M.N.G. 1976. Aspectos climatológicos de Manaus. *Acta Amazônica* 6: 229-233.

Sabino J.; Zuanon J. 1998. A stream fish assemblage in Central Amazônia: distribution, activity patterns and feeding behavior. *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 8: 201-210.

Santos, G.M., Ferreira, E.J.G., 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell (Ed). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, p. 346-373.

Scott G.R.; Richards J.G.; Forbush B.; Isenring P.; Schulte P.M. 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 287: 300 –309.

Schwarzbaum P.J.; Wieser W.; Niederstltter H. 1990. Contrasting effects of temperature acclimation on mechanisms of ionic regulation in eurythermic and stenothermic

species of freshwater fish (*Rutilus rutilus* and *Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 98: 483-489.

Schwassman H.O. 1992. Seasonality of reproduction in Amazonian streams. pp. 71-81. In: Hamlett W. (Ed.). *Reproductive biology of South America vertebrates*. Springer, New york.

Shih T.H.; Horng J.L.; Liu S.T.; Hwang P.P.; Lin L.Y. 2011. Rhcg1 and NHE3b are involved in ammonium-dependent sodium uptake by zebrafish larvae acclimated to low-sodium water. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 302: 84-93.

Shrimpton J.M.; Patterson D.A.; Richards J.G.; Cooke S.J.; Schulte P.M.; Hinch S.G. Farrell A.P. 2005. Ionoregulatory changes in different populations of maturing sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during ocean and river migration. *The Journal of Experimental Biology* 208: 4069-4078.

Sullivan G.; Fryer J.; Perry S.F. 1995. Immunolocalization of proton pumps (H^+-ATPase) in pavement cells of rainbow trout gill. *The Journal of Experimental Biology* 198: 2619–2629.

Tipsmark C.K.; Madsen S.S.; Ceidelin M.; Christensen A.S.; Cutler C.P.; Cramb G. 2002. Dynamics of Na,K,2Cl cotransporter and Na,K-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology* 293: 106-118.

Trancoso R.; Filho A.C.; Ferreira D.A.C.; Noguera S.P. 2005. Sistemas de informações geográficas como ferramenta para o diagnóstico e gestão de macrobacias no arco do desmatamento na Amazônia. *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Goiânia, p. 2405-2412.

Val A.L.; Almeida-Val V.M.F 1995. Fishes of the Amazon and their environment. Springer-Berlin

Verdouw H.; Van Echteld C.J.A.; Dekker E.M.L. 1977. Ammonia determination based on indophenols formation with sodium salicylate. *Water Research* 12: 399-402.

Walker I. 1995. Amazonian streams and small rivers. In: Tundisi J.G.; Matsumura-Tundisi T.; Bicudo C.E. (Eds.) *Limnology in Brazil.* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 167-193.

Wilson D. S. 1988. Holism and reductionism in evolutionary ecology. *Oikos* 53:269-273.

Wilson R.W.; Wood C.M.; Gonzalez R.J.; Patrick M.L.; Bergman H.L.; Narahara A.; Val A.L. 1999. Ion and Acid-Base balance in three species of Amazonian fish during gradual acidification of extremely soft water. *Physiological and Biochemical Zoology* 72: 277-285.

Wilson J.M.; Leitão A.; Gonçalves A.F.; Ferreira C.; Reis-Santos P.; Fonseca A.V.; Silva J.M.; Antunes J.C.; Pereira-Wilson C.; Coimbra J. 2007. Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L.). *Marine Biology* 151: 1633-1645.

Wood C.M. 1989. The physiological problems of fish in acid water. In: Morris R.; Brown D.J.A.; Taylor E.W.; Brown J.A. (Eds.) *Acid Toxicity and Aquatic Animals.* Society for Experimental Biology Seminar Series, Cambridge University Press, Cambridge p. 125-152.

Wood C.M. 1992. Flux measurements as indices of H^+ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 22: 239-264.

Wood C.M. 2011. Rapid regulation of Na^+ and Cl^- flux rates in killifish after acute salinity challenge. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 409: 62-69.

Wood C.M.; Grosell M. 2008. A critical analysis of transepithelial potential in intact killifish (*Fundulus heteroclitus*) subject to acute and chronic changes in salinity. *Journal of Comparative Physiology B* 178: 713-727.

Wood C.M.; Al-Reasi H.A.; Smith D.C. 2011. The two faces of DOC. *Aquatic Toxicology* 105: 3-8.

Wood C.M.; Wilson R.W.; Gonzalez R.J.; Patrick M.L.; Bergman H.L.; Narahara A.; Val A.L. 1998. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*) to low pH in extremely soft water. *Physiological Zooloogy* 71: 658-670.

Wood C.M.; Iftikar F.I.; Scott G.R.; De Boeck G.; Sloman K.A.; Matey V.; Valdez Domingos F.X.; Duarte R.M.; Almeida-Val V.M.F.; Val A.L. 2009. Regulation of gill transcellular permeability and renal function during hypoxia in the Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*): new angles to the osmorespiratory compromise. *The Journal of Experimental Biology* 212: 1949- 1964.

Wright P.A.; Wood C.M. 1985; An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: effects of environmental pH chance and sodium uptake blockage. *The Journal of Experimental Biology* 114: 329-353.

Wright P.A.; Wood C.M. 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *The Journal of Experimental Biology* 212: 2303-2312.

Yan J.J.; Chou M.Y.; Kaneko T.; Hwang P.P. 2007 Gene expression of Na^+/H^+ exchanger in zebrafish H^+-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na^+ and acidic environments. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 293: 1814-1823.

Zall D.M.; Fisher D.; Garner M.Q. 1956. Photometric determination of chloride in water. *Analytical Chemistry* 28: 1665-1668.