



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO TRANSCRIPTOMA DA ESPÉCIE
Triportheus albus Cope, 1872 NAS ÁGUAS PRETA, CLARA E BRANCA DA
AMAZÔNIA**

JOSÉ DENEY ALVES DE ARAÚJO

**MANAUS
2016**

JOSÉ DENEY ALVES DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO TRANSCRIPTOMA DA ESPÉCIE
Triportheus albus Cope, 1872 NAS ÁGUAS PRETA, CLARA E BRANCA DA
AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de *mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais*.

**Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.
Coorientadora: Andrea Ghelfi, Dra.**

**MANAUS
2016**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – MBT

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO
 ALUNO JOSÉ DENEY ALVES DE
 ARAÚJO EM BIOTECNOLOGIA E
 RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e dezesseis às nove horas, realizou-se no Auditório do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, localizado na Avenida André Araújo, 2936 – Petrópolis, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de José Deneý Alves de Araújo, sob o título “Análise da expressão diferencial do transcriptoma da espécie *Triportheus albus* Cope, 1872 nas águas preta, clara e branca da Amazônia”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador o Dr. Adalberto Luis Val, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Adalberto Luis Val, Dra. Tainá Raiol Alencar e Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo o aluno sido

APROVADO

Dr. Adalberto Luis Val

CPF: 823 590 328-87

Dra. Tainá Raiol Alencar

CPF: 717 580 701-53

Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

CPF: 242 657 302-30

FICHA CATALOGRÁFICA

A663 Araújo, José Denev Alves de
Análise da expressão diferencial do transcriptoma da espécie *Triportheus albus* cope, 1872 nas águas preta, clara e branca da Amazônia / José Denev Alves de Araújo. --- Manaus: [s.n.], 2016.
xiii, 38 f. : il.

Dissertação (Mestrado) --- UEA, Manaus, 2016.
Orientador: Adalberto Luis Val.
Coorientadora: Andrea Ghelfi.
Área de concentração: Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

1. *Triportheus albus*. 2. Baixo pH. 3. Expressão diferencial. I. Título.

CDD 597.0929

*“Prepare-se! E quando se sentir pronto,
não pare, prepare-se mais ainda”.*

Reinaldo Polito

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria, por sempre iluminar meus caminhos.

Ao meu orientador, Dr. Adalberto Luis Val, pela oportunidade e confiança depositada em um menino tímido do interior do Amazonas (Jutaí), onde por lá, pesquisa não passa de um sonho. Obrigado pela orientação, sugestões e ensinamentos, os quais me auxiliaram no crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Dra. Andrea Ghelfi, que desde a graduação tem me inspirado e me dado apoio. Obrigado por ter me apresentado esse mundo fascinante da bioinformática. Agradeço aos desafios a que fui submetido; sem dúvida alguma, foram os que mais me permitiram crescer.

Aos meus pais, Arleilson e Deuza, que mesmo não tendo a oportunidade de estudarem, trabalhando na roça, nunca deixaram de acreditar que eu poderia alçar voos cada vez maiores.

Aos meus irmãos Denis, Deuzenilde, Deuzenir, Damízia e Débora por todo apoio, pelo incentivo, carinho, conselhos. Vocês são minha fonte de inspiração.

À minha namorada Joana Azevedo, parceira que durante toda trajetória me acompanhou e pacientemente escutou muitos argumentos científicos que nem eram da sua área, mas que sem dúvida alguma me inspiraram.

Ao meu amigo Willian Lira, um irmão, tantas madrugadas, planos, ideias de programação, viagens através de livros que nos fascinavam, e proporcionavam horas de conversas e discussão.

Aos colegas do LEEM, em especial Luciana Fé e Érica Souza, que me acompanharam e deram suporte no sequenciamento dos dados. Agradeço, também, Dulcilene Martins, que me auxiliou nos primeiros passos pelas técnicas moleculares.

A Daniel Fagundes, pelo treinamento e acompanhamento da construção das bibliotecas, além de contribuições relevantes ao trabalho.

A Nazaré Paula, pela organização das expedições, contatos com as bases de suporte de coletas, pescadores e planejamento logístico.

Ao ICMBio, por meio da MSc. Priscila Santos, que forneceu todo apoio nas coletas do material biológico realizadas em Anavilhanas.

Ao INPA/NAPPA-STM, por meio do Dr. Jorge Porto, que forneceu apoio nas coletas do material biológico realizadas em Santarém-PA.

A Marcos Prado pelas sugestões para o trabalho e apoio logístico nas coletas de Santarém-PA.

Ao Projeto INCT/ADAPTA (FAPEAM/CNPq) que possibilitou a execução do trabalho.

Ao INPA/LEEM por toda estrutura física e suporte técnico laboratorial fornecido no desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de apoio à pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia/UEA. Ao CNPq e a FAPEAM pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Milhares de corpos d'água são encontrados na Amazônia. Eles podem ser classificados conforme sua cor em três categorias, águas preta, clara e branca. Estima-se que 3.000 espécies de peixes vivem nos rios da Amazônia, dentre estas a sardinha, *Triportheus albus*. Esta espécie habita os três tipos de águas da Amazônia, apesar de suas diferenças significativas em relação aos parâmetros físico-químicos. A capacidade desta espécie para sobreviver nestes diferentes habitats está relacionada com suas adaptações específicas. O objetivo do presente estudo foi descrever a resposta gênica nos três tipos de águas, e descrever os mecanismos relevantes que podem originar essa capacidade. Brânquias de *T. albus* foram coletadas em locais bem caracterizados para cada tipo de água. Nove bibliotecas de cDNA foram construídas, três réplicas biológicas de cada condição e sequenciado o RNA (RNA-Seq) na Plataforma MiSeq® (Illumina®). Um total de 51,6 milhões de *reads paired-end*, e 285.456 transcritos foram montados. Considerando o $FDR \leq 0,05$ e *fold change* ≥ 2 , foram detectados 13.754 genes diferencialmente expressos nos três desafios ambientais. Dois mecanismos relacionados com a homeostase foram detectados em *T. albus* que vivem em águas pretas. As águas pretas e ácidas, parece ser um ambiente desafiador para muitos tipos de organismos aquáticos. O primeiro está relacionado com a diminuição da permeabilidade celular e o segundo com a regulação iônica e ácido-base. Sugerimos que a espécie *T. albus* é uma boa espécie de peixe para futuros estudos envolvendo a regulação iônica e ácido-base de espécies amazônicas.

Palavras-chave: Rio Negro, Rio Tapajós, Rio Solimões, expressão diferencial, RNA-Seq, pH ácido, regulação iônica.

ABSTRACT

Thousands of water bodies are found in the Amazon. They can be classified based on their water color in blackwater, clearwater and whitewater. The Amazon basin houses approximately 3,000 fish species, including the freshwater sardine, *Triportheus albus*, locally known as “sardinha”. *Triportheus albus* lives in all three types of water, despite their significant differences regarding physicochemical parameters. The ability of this species to survive in these different habitats is anticipated to be related to specific adaptations. The goal of the present study is to describe gene transcription differences of *T. albus* collected from the three types of water, and to describe the relevant mechanisms behind this ability. Gills of specimens of *T. albus* from the three types of water (black, clear, and white) were collected. Nine cDNA libraries, three biological replicates for each condition (type of water) were prepared and sequenced for RNA (RNA-Seq) using the MiSeq® (Illumina®) platform. A total of 51.6 million of reads paired-end, were assembled into 285,456 high quality contigs. Considering $FDR \leq 0.05$ and the fold change ≥ 2 , 13,754 differentially expressed genes were detected for all three conditions. Two mechanisms related to the homeostasis control were detected for *T. albus* living in blackwater. The acidic blackwater seems to be a challenging environment to many types of organisms. The first mechanism is related to a decrease of cell permeability and the second seem to be related to ion and acid-base regulation. We suggest that *T. albus* is an important fish species for future studies exploring ion and acid-base regulation in fish of the Amazon.

Key words: Negro River, Tapajós River, Solimões River, differentially expressed genes, RNA-Seq, acid pH, ionic regulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Heatmap</i> dos padrões de expressão e clusters hierárquicos dos genes de exemplares de <i>Triportheus albus</i> diferencialmente expressos nas diferentes condições ambientais.....	15
Figura 2: Genes diferencialmente expressos de <i>Triportheus albus</i> na condição água preta <i>versus</i> água clara.....	16
Figura 3: Ontologia gênica dos termos top10 <i>up-regulated</i> na condição água preta <i>versus</i> água branca para <i>Triportheus albus</i>	17
Figura 4: Ontologia gênica dos termos top10 <i>down-regulated</i> na condição água preta <i>versus</i> água branca para <i>Triportheus albus</i>	17
Figura 5: Ontologias gênica dos termos top10 <i>up-regulated</i> na condição água preta <i>versus</i> água clara para <i>Triportheus albus</i>	18
Figura 6: Ontologia gênica dos termos top10 <i>down-regulated</i> na condição água preta <i>versus</i> água clara para <i>Triportheus albus</i>	19
Figura 7: Ontologia gênica dos termos top10 <i>down-regulated</i> na condição água clara <i>versus</i> água branca para <i>Triportheus albus</i>	19
Figura 8: Termos em comum nas condições água preta <i>versus</i> água clara e água preta <i>versus</i> água branca para <i>Triportheus albus</i> (eixo y). Quantidade de termos localizados em ambas condições (eixo x).	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das águas do Rio Negro (água preta), Rio Tapajós (água clara) e Rio Solimões (água branca).	13
Tabela 2: Dados brutos de sequenciamento e pré-processamento (CG= Citosina/Guanina).....	14
Tabela 3: Genes em comum nas condições água preta <i>versus</i> água clara e água preta <i>versus</i> água branca de <i>Triportheus albus</i> , candidatos envolvidos na resposta ao baixo pH.	22

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADAPTA** Adaptações da Biota Aquática da Amazônia
- **BLASTx** *Basic Local Alignment Search Tool protein*
(Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais de Proteínas)
- **Ca²⁺** Íon cálcio
- **CC** Componente celular
- **cDNA** Ácido desoxirribonucléico complementar
- **CEUA** Comitê de Ética e Uso de Animais
- **CG** Citosina/Guanina
- **Cl⁻** Íon cloreto
- **CO₂** Dióxido de carbono
- **COD** Carbono orgânico dissolvido
- **COOH** Grupo carboxílico
- **DNA** Ácido dexoxirribonucléico
- **FDR** *False Discovery Rate* (Controle dos falsos positivos)
- **FM** Função molecular
- **GDEs** Genes diferencialmente expressos
- **GO** Ontologia gênica
- **h** Horas
- **H⁺** Íon hidrogênio
- **HCO₃⁻** Íon bicarbonato
- **IBAMA** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
- **INCT** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
- **INPA** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- **JPs** Junções paracelulares
- **LEEM** Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular
- **MCs** Células mucosas
- **mg** Miligrama
- **mg/L** Miligrama por litro
- **mm** Milímetro

- MRCs	Células ricas em mitocôndrias
- mRNA	RNA mensageiro
- Na⁺	Íon sódio
- NH₃⁺	Íon amônia
- NH₄⁺	Íon amônio
- NHE	<i>Sodium/hydrogen exchanger</i> (Permutador Sódio/hidrogênio)
- OH	Hidroxila
- Pb	Pares de bases
- PB	Processo biológico
- PCR	Reação em cadeia da polimerase
- pH	Potencial hidrogeniônico
- PVCs	Células do pavimento
- RNA	Ácido ribonucleico
- SISbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- UEA	Universidade do Estado do Amazonas
- UFAM	Universidade Federal do Amazonas
- µg	Micrograma
- µL	Microlitro
- µS/cm	<i>Microsiemens</i> por centímetro
- °C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. DIVERSIDADE AMAZÔNICA.....	3
2.2. RIOS DA AMAZÔNIA	3
2.2.1. Águas brancas	4
2.2.2. Águas claras	5
2.2.3. Águas pretas	5
2.3. <i>Triportheus albus</i>	6
2.3.1. Diversidade	6
2.3.2. Fisiologia	7
3. OBJETIVOS	10
3.1. GERAL	10
3.2. ESPECÍFICOS	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA E AUTORIZAÇÃO DE COLETA.....	11
2.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	11
2.3. EXTRAÇÃO DO RNA E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS	11
2.4. CONTROLE DE QUALIDADE E MONTAGEM <i>de novo</i>	12
2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANOTAÇÃO GÊNICA	13
3. RESULTADOS	13
3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS ÁGUAS	13
3.2. SEQUENCIAMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	14
3.3. MONTAGEM <i>de novo</i> E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL	14
3.4. ANOTAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE <i>T. albus</i>	16
3.5. TERMOS EM COMUM NAS CONDIÇÕES “água preta <i>versus</i> água clara” E “água preta <i>versus</i> água branca”	20
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

A bacia amazônica abriga uma fonte inestimável de recursos ainda a serem estudados. A diversidade da fauna e flora amazônica vem ganhando destaque em face das mudanças ambientais. Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de compreender os efeitos e as respostas dos organismos às mudanças ambientais (WOOD et al., 2007; LEMGRUBER et al., 2013; PRADO-LIMA e VAL, 2016). O ambiente aquático amazônico tem sido alvo da pesquisa científica e tecnológica e tem ganhado espaço por conter a maior riqueza de peixes de água doce (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; MATSUO e VAL, 2007; WOOD et al., 2014).

A diversidade dos rios da bacia amazônica, além de ser o principal meio de transporte à muitas cidades desta região, abriga uma riquíssima ictiofauna. Os rios são interligados ao canal principal do Rio Amazonas, permitindo que toda bacia amazônica esteja ligada por suas águas, o que possibilita às espécies migrarem entre os rios da região (DUNCAN e FERNANDES, 2010). No entanto, estes rios contêm padrões de águas diferenciadas, graças à localização geográfica de cada rio e os materiais que são depositados em seus leitos (SIOLI, 1984; KONHAUSER et al., 1994). Em muitos casos os parâmetros físico-químicos das águas regem a seleção de espécies que sobrevivem em seus leitos (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Essa seleção depende da capacidade que as espécies possuem para se adaptarem ao ambiente a que estão expostas (EVANS et al., 2005; WOOD et al., 2007).

As águas da bacia amazônica podem ser classificadas, de acordo com o tipo de água, em água preta, clara e branca (SIOLI, 1984). Assim, da mesma forma que a cor confere um padrão específico a cada rio, os parâmetros físico-químicos guardam forte relação com suas cores características. Três principais rios contêm esses padrões de águas: Rio Negro (água preta), considerado um dos ambientes aquáticos mais desafiadores para as espécies aquáticas, graças a sua característica água ácida. Diversos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de compreender como um rio com tamanho desafio ambiental abriga uma significativa diversidade de peixes, estimada em, aproximadamente, 1.000 espécies de peixes (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; GONZALEZ et al., 2002; WOOD et al., 2014; DUARTE et al., 2016).

O outro rio característico da região é o Rio Solimões (água branca). De todos é o que possui maior quantidade de material em suspensão, que inclusive lhe

confere a cor característica. Grande parte desse material em suspensão é derivado dos Andes e é arrastada pela forte correnteza das águas por todo seu leito, que nas curvas dos rios, deposita, formando inclusive ilhas, lagos e alterando o percurso do leito do rio (SIOLI, 1984; KONHAUSER et al., 1994). Esses depósitos são importantes pois contém quantidades significativas de nutrientes contribuindo com a subsistência de comunidades ribeirinhas, que exploram as regiões de várzea para atividades agrícolas.

Por fim, mas não menos importante, temos o Rio Tapajós (água clara), que é conhecido por suas águas cristalinas ou levemente esverdeadas. Os parâmetros físico-químicos de suas águas é referenciado como intermediário entre os rios de águas preta e branca (DUNCAN e FERNANDES, 2010). Tanto o Rio Tapajós, quanto o Rio Solimões apresentam pH (potencial hidrogeniônico) próximo da neutralidade, enquanto o Rio Negro possui águas ácidas (SIOLI, 1984). Ao observamos estas condições ambientais ficam evidentes os desafios que esses ambientes impõem à ictiofauna.

Estes ambientes abrigam a mais diversa ictiofauna do mundo. Muitas espécies habitam simultaneamente dois desses ambientes (revisto por VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Poucas, entretanto, desenvolveram mecanismos biológicos para viver simultaneamente nos três tipos de água da Amazônia (FERREIRA, E.G., informação pessoal).

Entre essas espécies, destaca-se a espécie *Triporthus albus*, conhecida popularmente na região como sardinha. Essa espécie é frequentemente encontrada nos três tipos de águas da bacia amazônica (Relatório do Projeto INCT/ADAPTA 2012-2013). A compreensão de como essa espécie responde às diferentes condições dos três tipos de ambientes retromencionados, foi o fator principal que nos desafiou no presente estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. DIVERSIDADE AMAZÔNICA

A bacia amazônica é um mosaico de diferentes tipos de águas interligado ao canal principal, o Rio Amazonas (DUNCAN e FERNANDES, 2010). A diversidade amazônica abriga um imenso patrimônio biológico, composto por milhares de espécies, tendo sido cientificamente identificada somente uma pequena parcela delas (CÁUPER, 2006). É a maior bacia hidrográfica de água doce do planeta e contém cerca de 20 % de toda a água doce da Terra (MOLINIER et al., 1995).

O clima predominante na bacia é quente e úmido, com temperatura média anual em torno de 26 °C. As precipitações regionais podem ultrapassar 2.000 mm/ano (QUEIROZ et al., 2009). A bacia amazônica apresenta um ciclo de vazante e um ciclo de enchente, representando verdadeiros pulsos ambientais. Este pulso é acompanhado por variações dos descritores do sistema aquático (JUNK et al., 1989).

Os rios amazônicos diferem quanto à qualidade de suas águas e suas origens (KONHAUSER et al., 1994), contendo uma grande riqueza de peixes. O Rio Negro é o principal representante de águas ácidas da Amazônia (PINHEIRO e BORGES, 2013). Muitas espécies de peixes de água doce com pH próximo a neutralidade, como as águas do Rio Solimões e Rio Tapajós, conseguem se adaptar e sobreviver nesse ambiente extremo de acidificação (MATSUO e VAL, 2002, 2007; WOOD et al., 2014).

2.2. RIOS DA AMAZÔNIA

A variabilidade dos ambientes amazônicos é determinada, entre outros fatores, pela área de drenagem e a forte relação com os fatores ambientais, relevo, solo, clima e os diferentes tipos de vegetação presentes no entorno dos rios e igarapés. A variabilidade ambiental é responsável pela notável diferença físico-química observada nas águas (SIOLI, 1984; KONHAUSER et al., 1994).

Os rios amazônicos além de possuírem grande extensão territorial, podem ser classificados em três categorias: rios de águas preta, clara e branca (SIOLI, 1984). Os rios Solimões, Amazonas, Madeira, Purus e Branco são exemplos típicos de rios

de águas brancas (KONHAUSER et al., 1994; GAILLARDET et al., 1997). Os rios de águas claras oriundos da Amazônia Central, que tem relevo relativamente regular apresentando baixa taxa de erosão, possuem águas transparentes ou levemente esverdeadas (SIOLI, 1984). Os rios Tapajós, Xingu, Trombetas, Tocantins são representantes típicos de rios de águas claras (QUEIROZ et al., 2009). Os rios de águas pretas, característicos por suas águas ácidas, drenam área de vegetação baixa e solo arenoso (GAILLARDET et al., 1997; PINHEIRO e BORGES, 2013). Os principais representantes são os rios Negro, Nhamundá e Maués (KÜCHLER et al., 2000).

2.2.1. Águas brancas

Os rios de águas brancas são também conhecidos como rios de águas barrentas (DUNCAN e FERNANDES, 2010), apresentam concentrações relativamente alta de solutos dissolvidos e são extremamente turvas devido a suas elevadas concentrações de sedimentos em suspensão, grande parte derivada dos Andes (KONHAUSER et al., 1994), com sólidos totais dissolvidos da ordem de 8,8 – 55 mg/L (DUNCAN e FERNANDES, 2010). Esses sedimentos são amplamente variados, podendo estar relacionados com os tipos de rochas presentes nas margens do rio ou em suas proximidades (QUEIROZ et al., 2009).

Os principais cátions presentes no Rio Solimões são o cálcio com 11,8 mg/L, seguido de silício (5,36 mg/L), potássio (1,4 mg/L) e magnésio (1,2 mg/L) (KONHAUSER et al., 1994). Possui concentração de Carbono em torno de 8,1 mg/L (KÜCHLER et al., 2000). O HCO_3^- é o ânion mais abundante, com média de 25 mg/L (QUEIROZ et al., 2009).

A água do Rio Solimões apresenta temperatura média anual em torno de 29,5 °C e elevada condutividade elétrica (50 – 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$), característica esta que reflete o nível de íons dissolvidos (PASCOALOTO e BRINGEL, 2010). O pH das águas brancas está próximo da neutralidade (6 – 7,2) (GAILLARDET et al., 1997; DUNCAN e FERNANDES, 2010).

2.2.2. Águas claras

Os rios de águas claras apresentam águas cristalinas de cor levemente esverdeadas ou transparentes (SIOLI, 1984). O Rio Tapajós é o principal representante desse tipo de água e possui baixa concentração de sólidos totais dissolvidos (6 – 13 mg/L) (DUNCAN e FERNANDES, 2010), comparado com as águas do Rio Solimões. Suas águas contem pouco sedimento argiloso, graças à drenagem que o rio faz sobre solo de origem Pré-Cambriana (SIOLI, 1984).

A foz do Rio Tapajós é represada pelo Rio Amazonas, o que pode influenciar as propriedades físico-químicas das águas até 50 km rio acima (DUNCAN e FERNANDES, 2010). É o rio que possui temperaturas mais elevadas quando comparado com as águas dos Rios Solimões e Negro, com média anual em torno de 30 °C. O pH varia de 6 – 7,5 (KONHAUSER et al., 1994). A quantidade de material em suspensão nas águas claras é reduzida, sendo a condutividade elétrica baixa (11 – 25 μ S/cm (PASCOALOTO e BRINGEL, 2010).

Os principais cátions presentes no Rio Tapajós são cálcio com 1,67 mg/L, seguido de potássio (1,4 mg/L), ferro (0,56 mg/L) e magnésio (0,47 mg/L) (SILVA et al., 2010). As concentrações de Alumínio são altas (0,28 mg/L). Rochas intemperizáveis contribuem com elementos químicos nas formas de íons monoatômicos e íons poliatômicos (MIRANDA et al., 2009). Apresenta ainda, concentrações de HCO_3^- de 22,57 mg/L (SILVA et al., 2013). Suas águas possuem características físico-químicas intermediárias entre rios de águas brancas e pretas (SIOLI, 1984; DUNCAN e FERNANDES, 2010).

2.2.3. Águas pretas

Os rios de águas pretas, com suas águas ácidas, abrigam significativa diversidade de espécies de peixes. Algumas dessas espécies são restritas a esse ambiente (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; KODRA et al., 2014). As águas pretas possuem características que as diferenciam dos demais rios da região amazônica, entre elas a presença de concentrações significativas de material orgânico dissolvido (ácidos húmicos e fúlvicos), produzido pela decomposição vegetal devido à inundação durante o ciclo sazonal de parte da floresta (SIOLI, 1984; ERTEL et al., 1986).

Os ácidos húmicos e fúlvicos, que possuem em sua estrutura grupos carboxílicos (-COOH) e hidroxílicos (-OH), se dissociam e liberam na água íons H⁺, reduzindo o pH do meio (QUEIROZ et al., 2009). O Rio Negro é o principal representante de águas pretas, possui baixa quantidade de sedimentos em suspensão (SIOLI, 1984), o que permite altas concentrações de ácidos húmicos e fúlvicos diluídos, uma vez que partículas em suspensão adsorveriam esses ácidos se estivessem presentes na água (KÜCHLER et al., 2000).

A natureza geológica do solo drenado confere às águas pretas além da cor, parâmetros físico-químicos como baixa condutividade (7 – 20 µS/cm) e reduzida concentração de sólidos totais (4 – 19 mg/L) (DUNCAN e FERNANDES, 2010). No Rio Negro o silício é o cátion dominante com 1,85 mg/L, seguido de potássio (0,46 mg/L), cálcio (0,39 mg/L) e magnésio (0,12 mg/L). A concentração de HCO₃⁻ (3,97 mg/L) é a mais baixa comparada com as concentrações observadas para os rios Solimões e Tapajós (SILVA et al., 2010). Suas águas são ácidas (pH 4 – 5,5), porém alguns ambientes aquáticos, conhecidos como igapós (floresta alagada) (SIOLI, 1984), o pH pode atingir valores ainda mais ácidos, como pH 3,0 (WALKER, 1995).

2.3. *Triportheus albus*

2.3.1. Diversidade

A espécie *T. albus* (Cope, 1872), conhecida popularmente na região como sardinha (ALMEIDA, 1984), pertence à ordem Characiformes e à família Triportheidae. Sua dieta alimentar é onívora, incluindo frutos, sementes, plâncton e pequenos invertebrados (MALABARBA, 2004). Realiza grandes migrações para reprodução, sem proteção da prole (DORIA e QUEIROZ, 2008).

Segundo Malabarba (2004), é possível a identificação dessa espécie graças a presença de uma linha de escala longitudinal entre a inserção da nadadeira peitoral e da quilha ventral, diferenciando-a das demais espécies do gênero *Triportheus* que possuem duas fileiras de escamas longitudinais entre a inserção da nadadeira peitoral e a quilha ventral. Assim, a combinação de 32-35 escamas na linha lateral, 24-28 nos raios ramificados na nadadeira anal e 30-39 nos rastros branquiais no

membro inferior do primeiro arco branquial, distinguem a espécie *T. albus* de suas congêneres de corpos alongados.

A capacidade de adaptação a diferentes ambientes confere às espécies do gênero *Triportheus* habilidade para habitar a maioria das bacias hidrográficas da América do Sul (ALMEIDA, 1984), incluindo os diferentes tipos de águas da região amazônica, como rios de águas preta, clara e branca (COOKE et al., 2012); FERREIRA, E.G., informação pessoal). Constituem um importante recurso alimentar para as comunidades ribeirinhas (AMARAL, 2005), sendo explorado pela pesca comercial em praticamente toda a Amazônia brasileira (DORIA e QUEIROZ, 2008).

2.3.2. Fisiologia

A brânquia é o principal local de processos de transportes que auxiliam na regulação osmótica em face dos gradientes iônicos, bem como importante local para a troca gasosa e regulação do pH do fluido corporal (EVANS et al., 2005). Três tipos principais de células estão presentes na superfície branquial, como as células ricas em mitocôndrias (MRCs), células do pavimento (PVCs) e células mucosas (MCs) (MATEY et al., 2011). Assim, os epitélios branquiais são os principais alvos das elevadas quantidades de íons de hidrogênio e compostos orgânicos no ambiente aquático, assumindo parte das funções que são exclusivas dos rins nos vertebrados terrestres (MCDONALD, 1983). Cerca de 80% da amônia produzida por peixes é excretado pelas brânquias (WOOD et al., 2007).

O carbono orgânico dissolvido (COD), presente na água, tem papel importante na regulação iônica de algumas espécies de peixes em ambiente acidificado (MATSUO e VAL, 2007; DUARTE et al., 2013), promovendo a excreção de amônia, induzindo absorção de Na^+ e limitando seu efluxo, especialmente sob condições de baixo pH (WOOD et al., 2014; DUARTE et al., 2016).

Muitos autores têm mostrado que as respostas ao baixo pH de espécies amazônicas pode variar, muitas vezes apresentando mecanismos de respostas diferenciadas. Isto tem sido claramente observado entre os caracídeos e ciclídeos amazônicos (GONZALEZ e WILSON, 2001; WOOD et al., 2014). De modo geral, a inibição da absorção ativa de Na^+ e Cl^- , juntamente com o aumento passivo de suas perdas são consequências da exposição ao baixo pH (MCDONALD, 1983; WOOD et

al., 1998; HARTER et al., 2014). A regulação iônica e ácido-base é, em parte, um dos processos fundamentais associados à homeostase em organismos vivos que conseguem manter equilíbrio em pH ácido (HARTER et al., 2014). Isso é possível por uma série de mecanismos que permite a adaptação fisiológica, como a troca ativa de HCO_3^- por Cl^- , extrusão ativa de H^+ em troca de Na^+ (complexo NHE), complexo H^+ -ATPase e, ainda, a bomba de Na^+/K^+ -ATPase, responsável por manter um microambiente intracelular favorável para que os processos retrocitados funcionem (revisado por EVANS et al., 2005).

As junções paracelulares (JPs) também são de grande importância para o controle fisiológico, pois estão envolvidas na estabilidade e permeabilidade apical das membranas celulares. O aumento da perda de íons durante a exposição ácida está associada ao rompimento das JPs (MCDONALD, 1983). O cálcio é essencial para a montagem e selagem das proteínas envolvidas nas JPs (GONZALEZ-MARISCAL et al., 1990); assim, a perda de Ca^{2+} para o ambiente pode perturbar o contato célula-célula e aumentar a permeabilidade paracelular de íons (FLIK e PERRY, 1989; MATSUO e VAL, 2002). Além disso, Duarte et al. (2016) comprovaram que o COD do Rio Negro, desempenha papel fundamental no controle da permeabilidade celular. Os autores demonstram que a presença do COD na água foi suficiente para reduzir as perdas de Na^+ e Cl^- para o ambiente.

As respostas endócrinas em peixes também tem sido alvo de estudos frente aos mecanismos de respostas a ambientes acidificados. Dentre estas, podemos verificar o envolvimento dos hormônios, como cortisol e prolactina (WENDELAAR BONGA et al., 1984; FLIK e PERRY, 1989; KUMAI et al., 2012). Existem evidências que esses hormônios desencadeiam respostas tanto nos trocadores iônicos, quanto nas JPs. Como observado por Kumai et al. (2012) e Breves et al. (2014), o aumento dos níveis desses hormônios aumentaram a captação de Na^+ , juntamente com redução da permeabilidade paracelular, evitando perdas excessivas dos íons Na^+ e Cl^- .

Os mecanismos de absorção de Na^+ e Cl^- necessitam do fornecimento de H^+ e HCO_3^- intracelular, respectivamente (CLAIBORNE et al., 2002). Assim, a enzima anidrase carbônica desempenha um papel fundamental, hidrolisando a molécula de dióxido de carbono (CO_2), produzido como produto intermediário da respiração celular, por meio da reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (GILMOUR e PERRY, 2009).

Além de fatores intracelulares, os peixes que vivem nos rios amazônicos, devem superar outros desafios externos, pois dependendo do ciclo sazonal de vazante e enchente, ocorrem mudanças nos parâmetros físico-químicos das águas. Tais mudanças representam desafios adicionais para os peixes que precisam manter o equilíbrio orgânico nessas águas (VAL et al., 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Analisar a expressão gênica diferencial em brânquias de *Triportheus albus* em rios de águas preta, clara e branca da bacia amazônica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Construir bibliotecas de cDNA de brânquias de *T. albus* coletados em rios de águas preta, clara e branca, e sequenciar na plataforma MiSeq® (Illumina®).
- Avaliar os níveis de expressão gênica de genes envolvidos na regulação iônica e ácido-base em brânquias *T. albus* em cada condição ambiental.
- Avaliar os níveis de expressão gênica de genes envolvidos na resposta hormonal em brânquias de *T. albus* relacionada com as águas preta, clara e branca.
- Classificar os genes diferencialmente expressos em categorias da ontologia gênica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA E AUTORIZAÇÃO DE COLETA

O uso dos procedimentos experimentais foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA) (Protocolo 026/2015). A autorização para coleta do material biológico para realização da pesquisa foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/SISBio), número 29837-8/2015.

2.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Os exemplares de *T. albus* foram capturados em seus ambientes naturais, abrangendo os diferentes tipos de águas da bacia amazônica em expedições realizadas nos meses de julho e agosto de 2015. Na condição ambiental de água preta, os exemplares foram capturados nas margens do Rio Negro, no arquipélago de Anavilhanas (2°43'11.8"S, 60°45'19.1"W). A coleta realizada na água branca foi realizada nas margens do Rio Solimões, em mediações da ilha da Marchantaria (3°14'47.0"S, 59°57'23.3"W). Já na coleta dos exemplares de água clara a coleta foi realizada na margem do Rio Tapajós (2°48'46.3"S, 55°02'21.2"W).

As brânquias foram o tecido-alvo. De acordo com Evans et al. (2005), as brânquias se constituem num órgão polivalente, que além de ser o sítio para as trocas gasosas, desempenha um papel essencial na regulação iônica e ácido-base, e, ainda, na excreção de resíduos nitrogenados. Um total de nove exemplares de *T. albus* foram coletados utilizando linha de pesca e anzol, três indivíduos para cada condição ambiental. Após a captura foram sacrificados por secção medular e as brânquias retiradas, armazenadas imediatamente em RNALater® (Ambion®), e mantido a 4 °C, até a chegada ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), nas dependências do INPA em Manaus/Amazonas/Brasil.

2.3. EXTRAÇÃO DO RNA E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS

A extração do RNA total foi realizada individualmente para cada uma das nove amostras de tecido branquial de *T. albus*, utilizando o protocolo *TRIzol*® reagent (Invitrogen™). Em seguida adicionou-se 30 µL de água ultrapura (*Nuclease-*

Free) e armazenado em *freezer* -80 °C até o momento das análises. A quantificação e purificação do RNA extraído foi analisado usando *BioAnalyzer Agilent 2100* (*Agilent Technologie*[®]). Os procedimentos de construção das bibliotecas foram realizados, de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o protocolo *TruSeq RNA Sample Prep v2 LS* (*Illumina*[®]).

O mRNA foi isolado do RNA total usando *beads* magnéticas de oligo (dT) que se ligaram a calda poli(A) do mRNA. Em seguida, foi sintetizada a primeira cadeia de cDNA usando *transcriptase* reversa e *primers* randômicos. Imediatamente foi sintetizada a segunda cadeia de cDNA, utilizando as enzimas *DNA Polymerase I* e *RNase H*. Foi então adicionado à extremidade 3' dos fragmentos um único nucleotídeo A (adenina), os adaptadores foram ligados à esses fragmentos. Sendo em seguida realizada a PCR para enriquecimento das bibliotecas.

Finalmente, a qualidade e quantificação das bibliotecas construídas foram analisadas utilizando o *BioAnalyzer Agilent 2100* (*Agilent Technologie*[®]) e *Real-Time PCR 7500* (*Applied Biosystems*[®]). Três réplicas biológicas de cada condição ambiental foram sequenciadas na plataforma *MiSeq*[®] (*Illumina*[®]) em três corridas de sequenciamento (uma corrida de 2x150 *paired-end* e duas corridas de 2x250 *paired-end*).

2.4. CONTROLE DE QUALIDADE E MONTAGEM *de novo*

As análises de bioinformática foram realizadas no Laboratório de Bioinformática do LEEM nas dependências do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O programa *FastQC* [v. 0.11.3] (ANDREWS, 2010) foi utilizado para analisar a qualidade das *reads* sequenciadas. De modo geral, os sequenciamentos apresentaram boa qualidade, mesmo assim, optou-se por fazer tratamento das extremidades 5' e 3' das *reads* de baixa qualidade (Q-Score \leq 20) e filtragem das *reads* menores que 50 pb (pares de bases) (\leq 50), para isto, foi utilizado o programa *Trimmomatic* [v. 0.33] (BOLGER et al., 2014).

A montagem do transcriptoma *de novo* foi realizada com o programa *Trinity* [v. 2.1.1] (GRABHERR et al., 2011). Além disto, foram utilizados programas que auxiliaram o *Trinity* na montagem do transcriptoma e no cálculo da abundância dos transcritos, dentre eles estão o *Bowtie2* [v. 2.2.6] (LANGMEAD e SALZBERG, 2012),

RSEM [v. 1.2.19] (LI e DEWEY, 2011), e ainda pacotes do R/Bioconductor [v. 3.1] (GENTLEMAN et al., 2004).

2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANOTAÇÃO GÊNICA

A análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs), foi realizada com o pacote do R/Bioconductor, edgeR [v. 3.8.6] (ROBINSON et al., 2010), com um *False Discovery Rate* (FDR) $\leq 0,05$. Após a quantificação dos transcritos, os dados gerados pelo RSEM, serviram de entrada para o edgeR, quando foi calculado “*fold change*”. A anotação dos GDEs foi realizada com o programa BLASTx [v. 2.3.1] (ALTSCHUL et al., 1997), por meio de consulta à base de dados de proteínas Uniprot/TrEMBL (classe *Actinopterygii*) (www.uniprot.org), com E-value 1.0E-5. Após anotação funcional, os genes foram classificados em suas ontologias gênicas (GO), por meio de um script desenvolvido no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM/UFAM).

3. RESULTADOS

3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS ÁGUAS

Os parâmetros físico-químicos foram medidos sempre no final da tarde entre os horários de 17 e 19 h. No período de coleta predominava o ciclo sazonal da região amazônica, conhecido como “cheia dos rios”. Como mostrado na Tabela 1, os parâmetros físico-químicos são bem distintos de cada rio, mantendo um padrão de água específico de cada condição ambiental.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das águas do Rio Negro (água preta), Rio Tapajós (água clara) e Rio Solimões (água branca).

Características	Tipos de águas		
	<i>Rio Negro</i>	<i>Rio Tapajós</i>	<i>Rio Solimões</i>
<i>Cor</i>	Preta	Clara	Branca
<i>Condutividade</i>	10,5 ± 0,5	17,3 ± 0,3	74,3 ± 0,1
<i>Oxigênio</i>	3,1 ± 0,5	6,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2
<i>Temperatura</i>	29,6 ± 0,1	31,3 ± 0,4	28,3 ± 0,1
<i>pH</i>	4,6 ± 0,1	6,0 ± 0,4	6,4 ± 0,1

3.2. SEQUENCIAMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE

Nove bibliotecas de cDNA de *T. albus* foram construídas, três réplicas biológicas para cada condição ambiental, água preta, clara e branca. O sequenciamento de RNA-Seq na Plataforma MiSeq® (Illumina®), produziu cerca de 51,6 milhões de *reads paired-end*. No controle de qualidade e filtragem dos dados brutos, foram removidas as bases das extremidades das *reads* com Q-Score ≤ 20 e excluídas as *reads* com tamanho inferior a 50 pb, sendo, então, o total de 45,8 milhões de *reads paired-end* salvas. Apenas 11,17 % do total de *reads* sequenciadas foram descartadas. A tabela 2 mostra os dados brutos dos sequenciamentos e o resultado do pré-processamento.

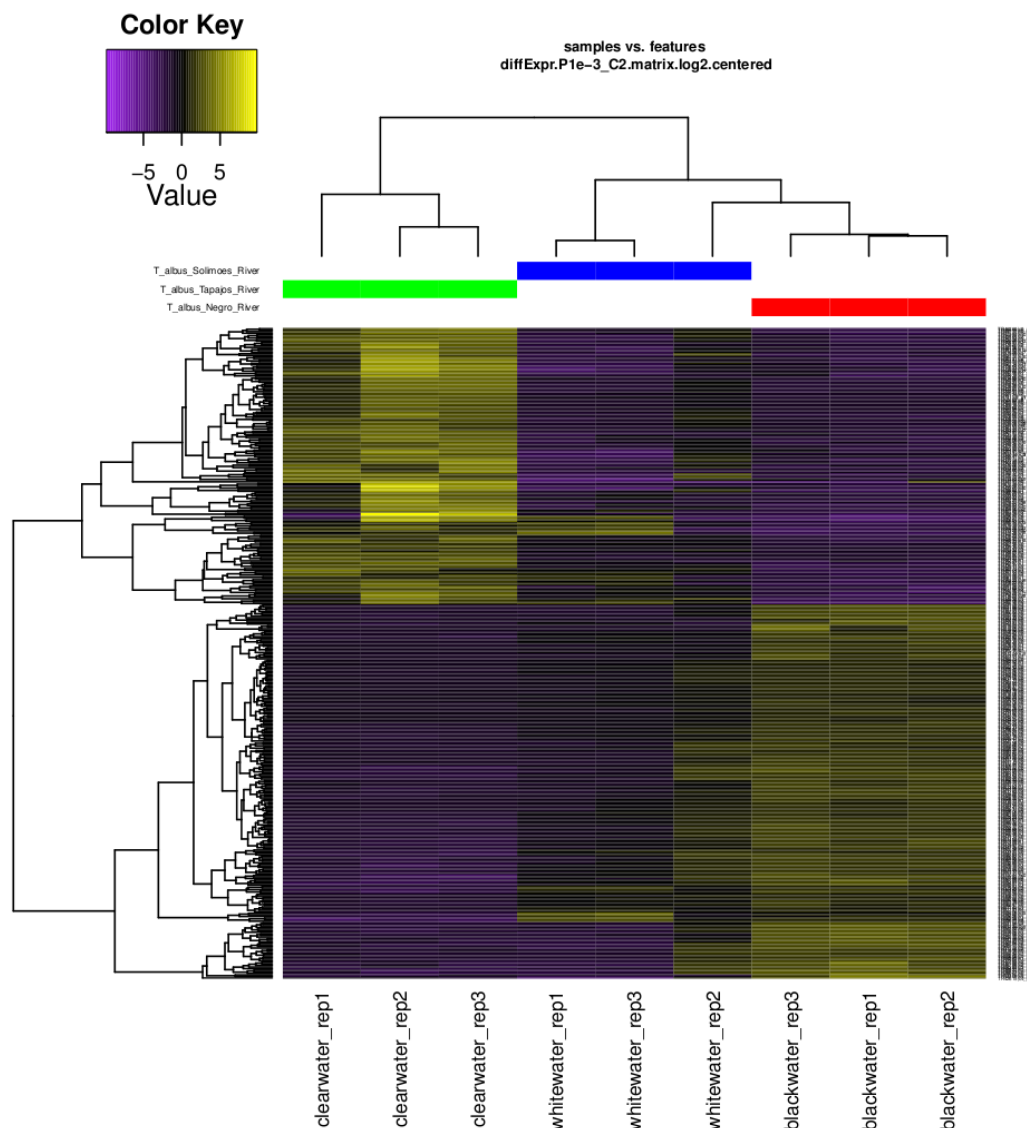
Tabela 2: Dados brutos de sequenciamento e pré-processamento (CG= Citosina/Guanina).

<i>Reads</i>	Água preta	Água clara	Água branca
<i>Reads</i> brutas	6.349.720 (100 %)	27.340.067 (100 %)	17.932.268 (100 %)
<i>Reads</i> descartadas	535.841 (8,43 %)	3.255.075 (11,9 %)	1.980.282 (11,04 %)
<i>Reads</i> salvas	5.813.879 (91,56 %)	24.084.992 (88,09 %)	15.951.986 (88,95 %)
CG	47,66 %	48,0 %	48,66 %

3.3. MONTAGEM *de novo* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

As *reads* resultantes do pré-processamento dos dados, foram agrupadas e a montagem do transcriptoma *de novo* realizada com o programa Trinity. Um total de 285.456 transcritos foram montados, através das análises dos grafos de *Bruijin* (GRABHERR et al., 2011), dos quais derivaram os *contigs* com comprimentos médio de 584,93 pb. O valor de N50 foi de 751 pb, totalizando 166.972.252 bases montadas. Utilizando os programas RSEM e Bowtie2, os *contigs* foram alinhados e a abundância dos transcritos quantificada em cada condição ambiental e suas respectivas réplicas biológicas. A análise da expressão diferencial de *T. albus* entre as condições ambientais foi realizada com o programa edgeR, utilizando o FDR $\leq 0,001$ para gerar o *heatmap* (Figura 1).

Figura 1: *Heatmap* dos padrões de expressão e *clusters* hierárquicos dos genes de exemplares de *Triportheus albus* diferencialmente expressos nas diferentes condições ambientais.

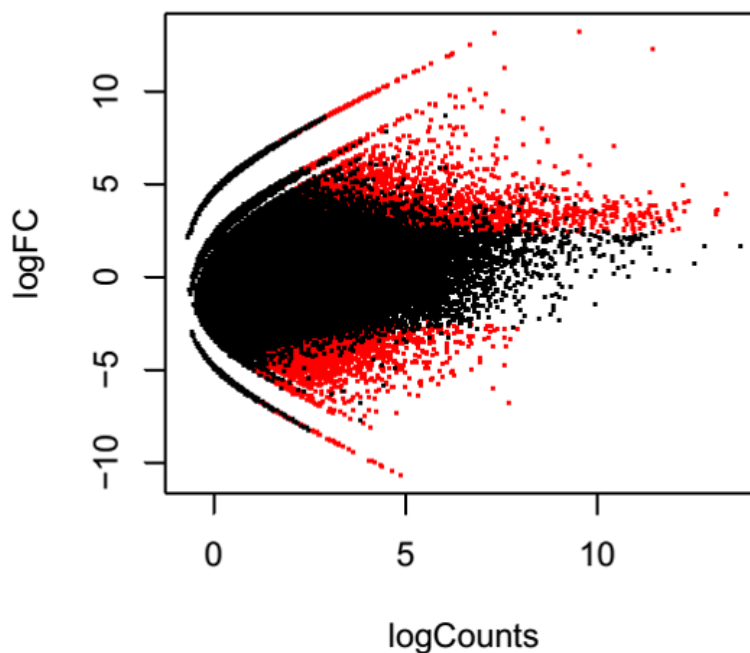


Os padrões de transcrição do dendrograma foram estimados apenas para os genes diferencialmente expressos. As cores das barras refletem os níveis de expressão do gene, preto (baixo), roxo (*down-regulated*), e amarelo (*up-regulated*).

Para analisarmos a diferença da expressão diferencial entre as condições ambientais, consideramos o $FDR \leq 0,05$ e $fold\ change \geq 2$. Um total de 13.754 genes foram diferencialmente expressos nas três condições ambientais. Na condição água preta *versus* água branca, foram encontrados 3.956 genes diferencialmente expressos (GDEs), 265 *up-regulated* (6,7 %), 3.691 *down-regulated* (93,3 %). Na condição água clara *versus* água branca, foram encontrados apenas 30 transcritos diferencialmente expressos, 2 *up-regulated* (6,7 %), 28 *down-regulated* (93,3 %). Já

na condição água preta *versus* água clara, foram localizados 9.768 GDEs, 4.318 *up-regulated* (43,2 %), 5.550 *down-regulated* (56,8 %) (Figura 2).

Figura 2: Genes diferencialmente expressos de *Triportheus albus* na condição água preta *versus* água clara.



Os dados são mostrados em escala logarítima (base 2), considerando o *fold change* da expressão *versus* a média do nível de expressão entre as condições analisadas. Os pontos vermelhos acima de zero no eixo y, representam os transcritos *up-regulated*, enquanto que os abaixo de zero, representam os transcritos *down-regulated*.

3.4. ANOTAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE *T. albus*

Utilizando o BLASTx, com E-value de 1.0E-5, por meio de consultas à base de dados Uniprot/TrEMBL (classe *Actinopterygii*), foram identificados 33.739 genes. Os *tops hits* do BLAST estão associados às espécies de peixes *Astyanax mexicanus* (43 %), *Danio rerio* (14 %), *Oncorhynchus mykiss* (7 %), *Poeciliopsis prolifica* (6 %), *Ictalurus punctatus* (5 %), outras espécies (25 %).

Os genes diferencialmente expressos (GDEs), foram agrupados por suas ontologias gênicas (GO). Na condição água preta *versus* água branca, foram anotados 3.206 termos. Destes, 159 *up-* (Processo Biológico – PB: 54, Função Molecular – FM: 50 e Componente Celular - CC: 55) (Figura 3) e 3.047 *down-regulated* (PB: 1.100, FM: 1.064 e CC: 883) (Figura 4).

Figura 3: Ontologia gênica dos termos top10 *up-regulated* na condição água preta versus água branca para *Triportheus albus*.

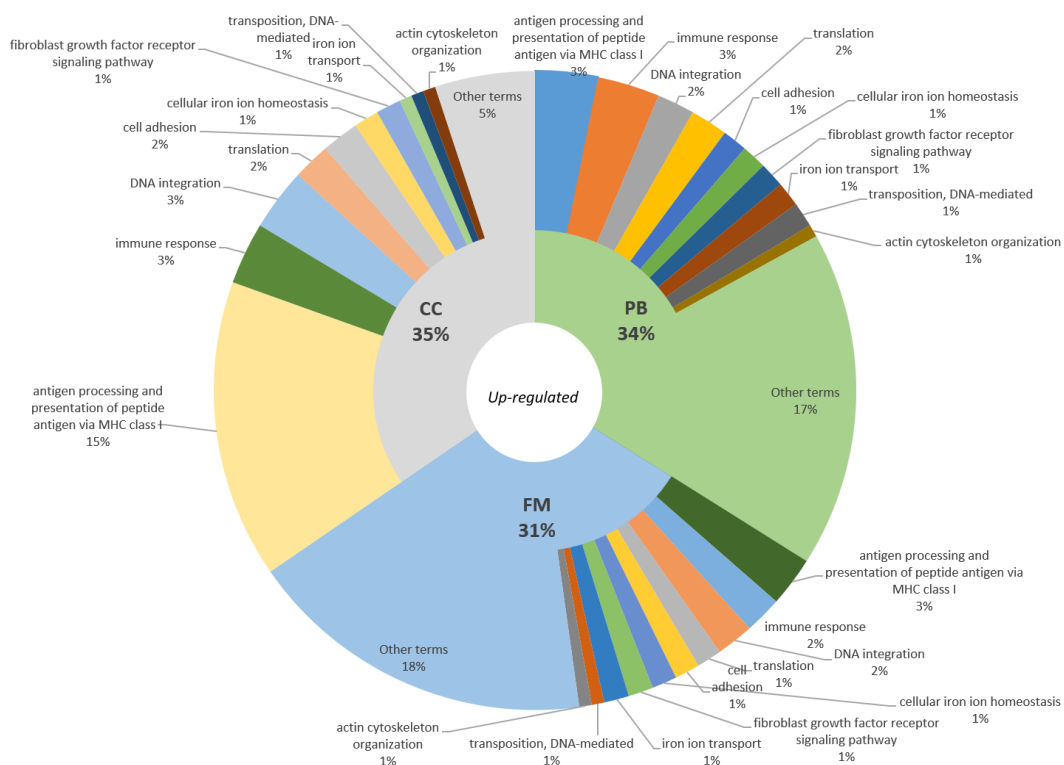
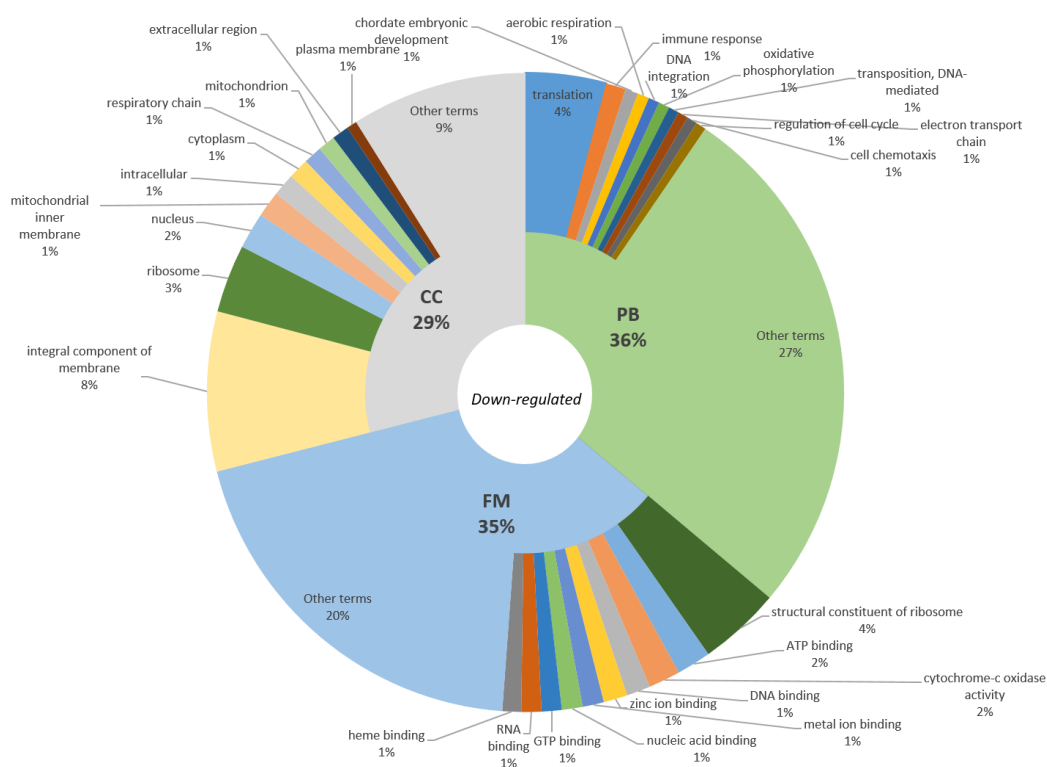


Figura 4: Ontologia gênica dos termos top10 *down-regulated* na condição água preta versus água branca para *Triportheus albus*.



Na condição água preta versus água clara, foram anotados 9.566 termos – 5.938 em *up-* (PB: 2.476, FM: 2.077 e CC: 1.385) (Figura 5) e 3.628 *down-regulated*

(PB: 2.476, FM: 2.077 e CC: 1.385) (Figura 6). Já na condição água clara *versus* água branca, apenas 21 termos foram anotados (9 em PB, 9 em FM e 3 em CC, todos *up-regulated*) (Figura 7).

Figura 5: Ontologias gênica dos termos top10 *up-regulated* na condição água preta *versus* água clara para *Triportheus albus*.

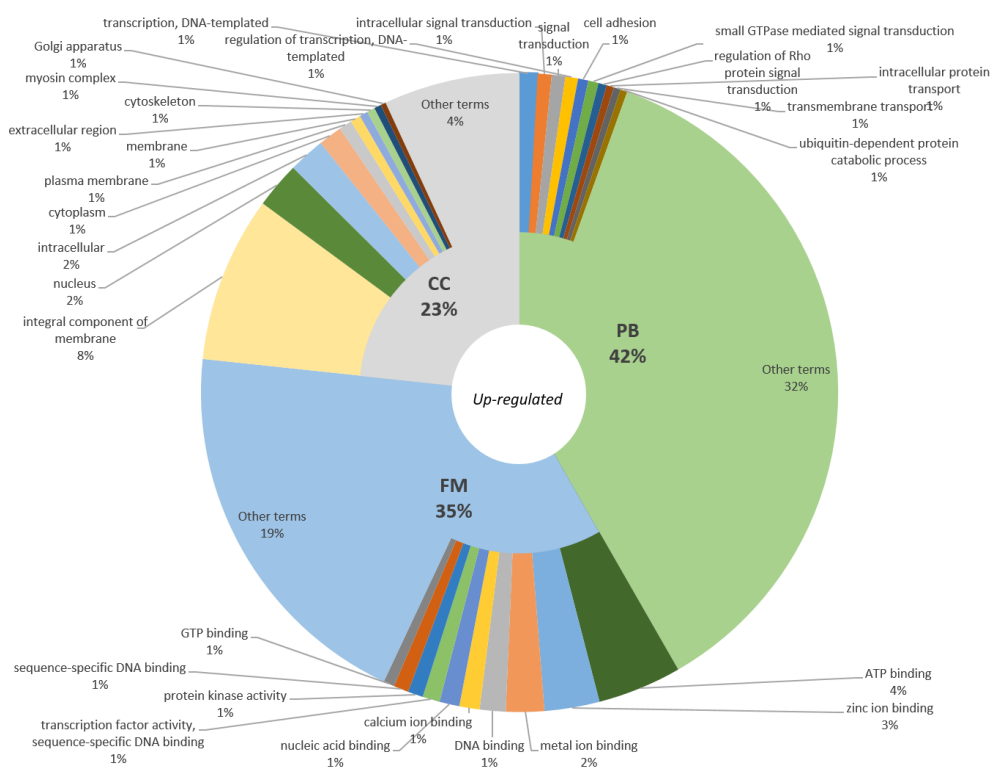


Figura 6: Ontologia gênica dos termos top10 *down-regulated* na condição água preta versus água clara para *Triportheus albus*.

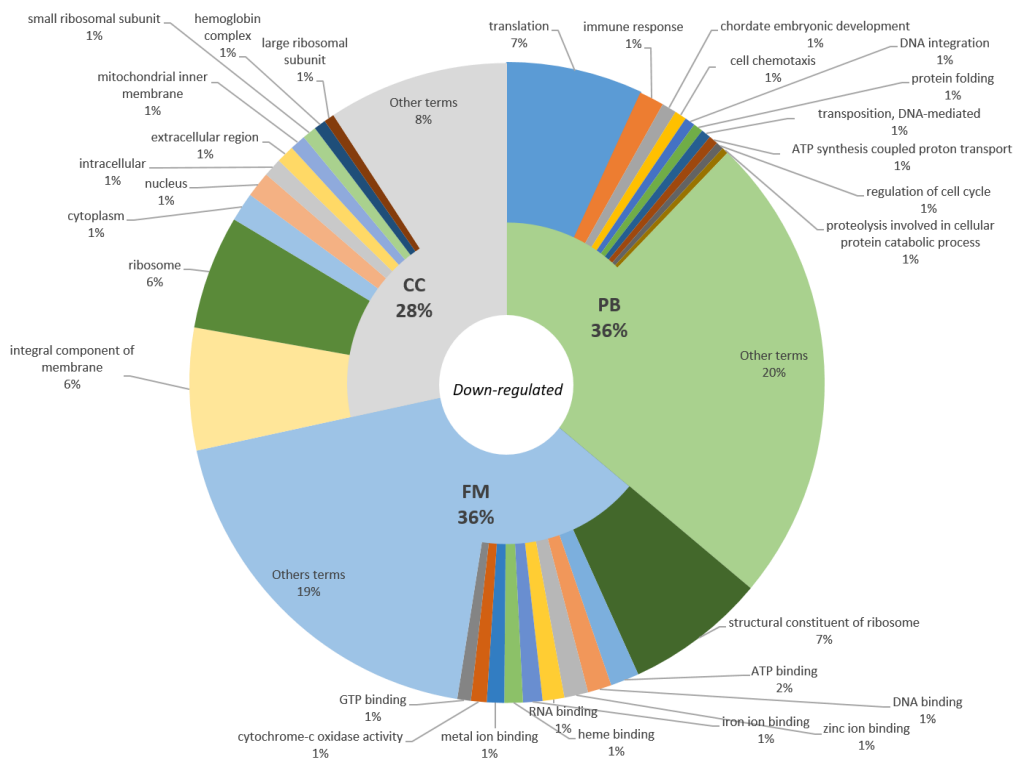
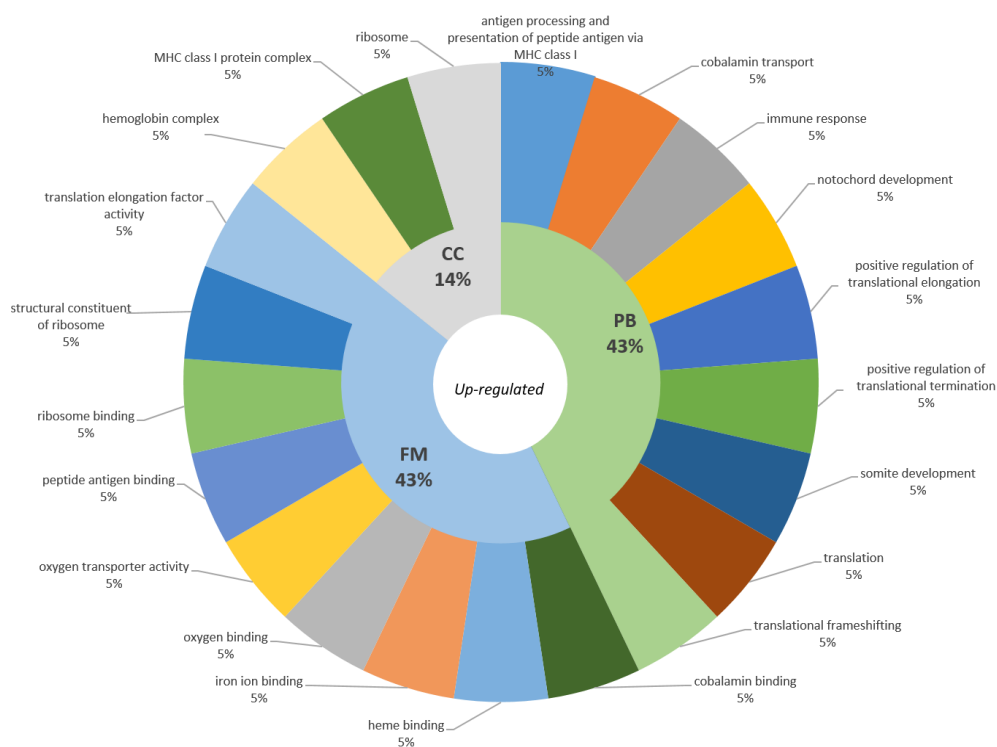


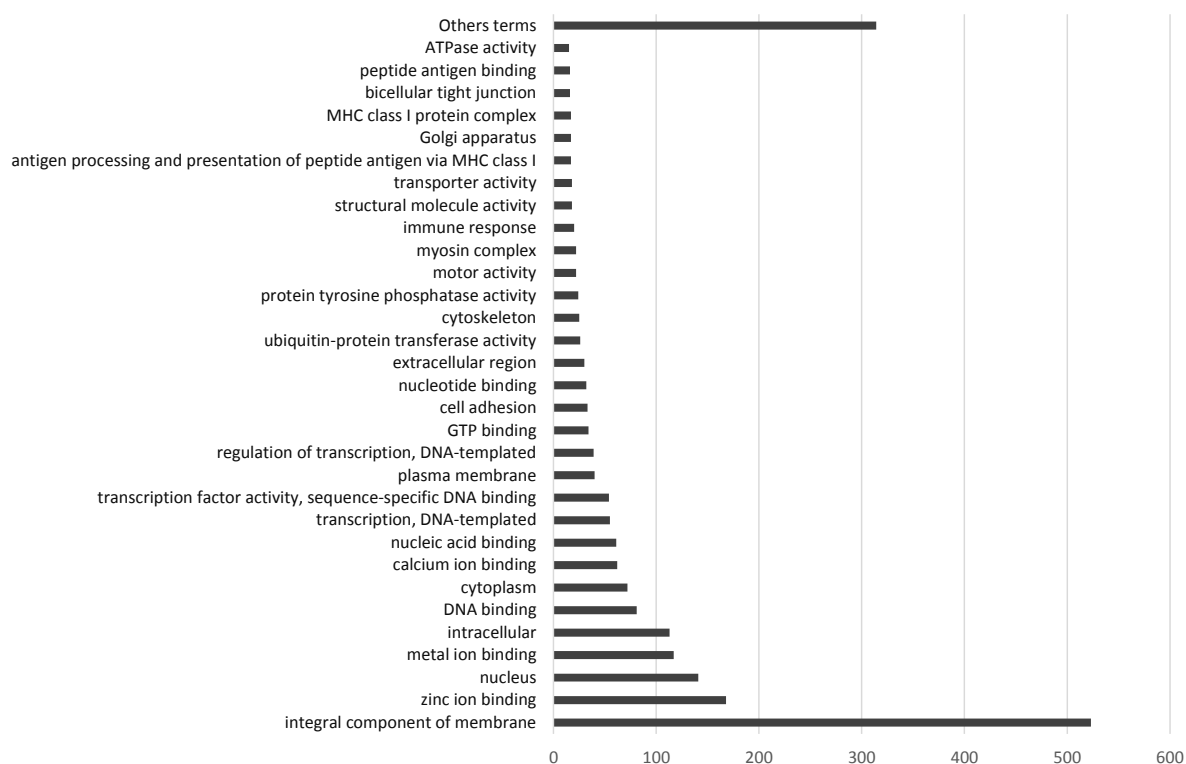
Figura 7: Ontologia gênica dos termos top10 *down-regulated* na condição água clara versus água branca para *Triportheus albus*.



3.5. TERMOS EM COMUM NAS CONDIÇÕES “água preta *versus* água clara” E “água preta *versus* água branca”

Na análise dos GDEs, observou-se maior quantidade de transcritos expressos nas condições de água preta *versus* água clara e água preta *versus* água branca. Verificamos, então, se tais condições compartilhavam os mesmos termos da ontologia gênica. Assim, localizamos 1.551 termos *up-regulated*, em comum nas duas condições. Dentre estes, destacamos alguns termos como *integral component of membrane*, *calcium ion binding*, *plasma membrane*, *cell adhesion*, *cytoskeleton*, *myosin complex*, *transporter activity*, *ammonium transmembrane transporter activity*, *bicellular tight junction* e *ATPase activity* (Figura 8).

Figura 8: Termos em comum nas condições água preta *versus* água clara e água preta *versus* água branca para *Tripurtheus albus* (eixo y). Quantidade de termos localizados em ambas condições (eixo x).



Em seguida, verificamos os genes ligados aos termos anotados. Percebemos que os genes identificados estavam relacionados em um papel fundamental na permeabilidade celular, regulação iônica e ácido-base, quando levado em consideração o pH da água preta em relação às águas clara e branca (Tabela 2). Dentre estes, encontramos os genes *claudin*, *actn4* (*actinin, alpha 4*), *itgb3b* (*integrin beta*) (junção paracelular e adesão celular) *rhcg1* (*ammonium transporter Rh type C 1*), *slc9a6a* (*sodium/hydrogen exchanger*) (NHE), *ATP6V0A2* (*V-type proton ATPase subunit a*), *Na⁺/K⁺-ATPase* (*sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha*) (regulação iônica e ácido-base) *nr3c1* (*glucocorticoid receptor*), *prlra* (*prolactin receptor a*) (reposta endócrina) (Tabela 3).

Tabela 3: Genes em comum nas condições água preta *versus* água clara e água preta *versus* água branca de *Triportheus albus*, candidatos envolvidos na resposta ao baixo pH.

Contig ID	E-value	LogFC	Gene/Proteína	Anotação (GO)
TR35387 c0_g1_i1	5.00E-157	6.65	Ca ²⁺ -ATPase	calcium ion transport (PB) e calcium-transporting ATPase activity (FM)
TR31771 c0_g1_i1	2.00E-11	6.33	claudin	bicellular tight junction (CC) e cell junction (CC)
TR44997 c0_g2_i1	0.00E-00	6.18	DSP	cell adhesion molecule binding (FM) e cell junction (CC)
TR53695 c1_g2_i1	0.00E-00	4.56	actn4	bicellular tight junction assembly (PB) e protein localization to bicellular tight junction (PB)
TR49051 c2_g2_i1	0.00E-00	4.55	itgb3b	Cell-substrate junction assembly (PB) e cell adhesion (PB)
TR58189 c5_g2_i3	8.00E-158	4.11	Gap junction protein	gap junction (CC) e cell junction (CC)
TR57503 c3_g54_i1	8.00E-48	5.86	slc26a4	bicarbonate transport (PB) e chloride transport (PB)
TR39575 c0_g1_i2	0.00E-00	4.71	slc9a6a (NHE)	sodium ion transport (PB) e hydrogen ion transmembrane transport (PB)
TR53402 c0_g3_i1	0.00E-00	4.04	slc4a4b	bicarbonate transport (PB) e anion transmembrane transporter activity (FM)
TR42005 c0_g1_i1	8.00E-173	4.34	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	sodium ion transport (PB) e sodium:potassium-exchanging ATPase activity (FM)
TR54587 c4_g2_i6	0.00E-00	3.82	rhcg1	ammonium transport (PB) e ammonium transmembrane transporter activity (FM)
TR42033 c0_g1_i1	0.00E-00	3.16	ATP6V0A2	ion transport (PB) e hydrogen ion transmembrane transporter activity (FM)
TR46875 c0_g2_i1	0.00E-00	4.73	prlra	prolactin signaling pathway (PB) e prolactin receptor activity (CC)
TR33864 c0_g2_i2	0.00E-00	3.45	nr3c1	sodium ion homeostasis (PB) e regulation of ion homeostasis (PB)

4. DISCUSSÃO

A diversidade dos rios da bacia amazônica, além de conter a maior quantidade de espécies de peixes de água doce, por si só, é capaz de fazer barreiras geográficas por meio de seus padrões de águas restritos de cada rio. Isso torna o montante das espécies especializadas em um só ambiente, ou em duas condições ambientais (DE PINNA, 2006). A maioria dos peixes vivem em um ambiente próximo da neutralidade (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Exposições a condições ambientais com baixo pH pode influenciar em diversas respostas fisiológicas (WOOD et al., 1998; MATSUO e VAL, 2007). A espécie *T. albus* é uma das poucas espécies que possuem um diferencial das inúmeras outras espécies de peixes da região, pois consegue sobreviver nos três tipos de águas (preta, clara e branca) da bacia amazônica.

Até o momento, não se tem informação do perfil de transcriptoma de uma mesma espécie que consiga sobreviver nos três tipos de água da Amazônia. Nesse contexto, nosso estudo realizou a análise do transcriptoma de *T. albus*. Foram observados 13.754 transcritos diferencialmente expressos nas três condições ambientais. Os GDEs foram agrupados por suas categorias funcionais de acordo com as GOs (ASHBURNER et al., 2000). Assim, selecionamos os termos top10 de cada categoria funcional (PB, FM e CC), tanto *up-*, quanto *down-regulated*.

Nas condições de água preta *versus* água branca e água preta *versus* água clara os termos *up-regulated* enriquecidos da GO estão envolvidos principalmente nos componentes da membrana, transporte ativo de íons através da membrana, alteração no citoesqueleto/adesão celular e síntese de proteínas (Figuras 3 e 5). Tais categorias funcionais sugerem resposta à exposição ao ambiente ácido, uma vez que, a água preta possui média do pH em torno 4,6, enquanto a água clara e branca possuem pH próximo da neutralidade (6,0 e 6,4 respectivamente). Estas respostas desencadeiam processos celulares que visam manter a homeostase do organismo ao ambiente exposto. De modo geral, a resposta se dá pelo aumento da rigidez das junções paracelulares e transporte ativo através de proteínas da membrana (BONGA et al., 1990; EVANS et al., 2005; KUMAI e PERRY, 2011).

Em contrapartida, os termos *down-regulated* estão relacionados à redução da síntese de proteínas, desenvolvimento embrionário, núcleo, regulação do ciclo celular, componentes da membrana, mitocôndria e cadeia respiratória (Figuras 4 e 6). Estas categorias reprimidas, podem indicar um reajuste metabólico, uma vez que além dos mecanismos essenciais do organismo, tem que manter a homeostase no desafio ambiental exposto (LI et al., 2016). Como podemos observar no padrão de expressão gênica, tanto nas condições de água preta *versus* água branca, quanto água preta *versus* água clara, os genes *up-regulated* estavam principalmente envolvidos em mecanismos para manter a homeostase do organismo (revisado por KWONG et al., 2014).

Assim, alguns mecanismos celulares podem ter sido desativados/reduzidos para reserva energética (LI et al., 2016). Logan e Buckley (2015) e Vidal-Dupiol et al. (2013) também observaram que para manter as funções vitais do organismo, alguns genes podem ser reajustados até o estabelecimento do equilíbrio homeostático. No entanto, estudos futuros devem verificar a relação dos genes reprimidos quando expostos ao ambiente aquático acidificado.

Na condição de água clara versus água branca não houve uma diferença significativa levando em consideração a abordagem de um transcriptoma inteiro; apenas 30 transcritos diferencialmente expressos foram encontrados e 21 termos anotados, respectivamente (Figura 7). Tais termos estão relacionados à resposta imunológica, complexo de hemoglobina e RNA ribossomal. Neste trabalho abordamos apenas as condições que apresentaram maior diferença na expressão gênica.

De acordo com os termos anotados em comum, tanto na condição de água preta versus água branca, quanto água preta versus água clara (Figura 8), localizamos os genes dos referidos termos, e verificamos se estes genes poderiam estar interligados na resposta ao ambiente acidificado. Desta forma, foram selecionados 12 genes envolvidos em tal resposta (Tabela 3). Agrupamos esses genes em dois mecanismos principais de atuação na resposta ao baixo pH para *T. albus*.

O primeiro mecanismo está relacionado à modulação do epitélio branquial (junções paracelulares - JPs), onde podemos destacar os genes/proteínas *claudin*, *actn4* (*actinin, alpha 4*), *itgb3b* (*integrin beta*), *DSP* (*desmoplakin*), *Gap junction protein*, e *Ca²⁺-ATPase* (*calcium-transporting ATPase*) (Tabela 3). Diversos trabalhos têm mostrado respostas diferenciadas em algumas espécies amazônicas expostas ao baixo pH (GONZALEZ e WILSON, 2001; MATSUO e VAL, 2007; WOOD et al., 2014). Uma das características fundamentais para manter a homeostase nas águas acidificadas do Rio Negro é o aumento da rigidez das JPs, evitando perdas excessiva de Na⁺ e Cl⁻ para o ambiente (WOOD et al., 1998; GONZALEZ et al., 2002; MATSUO e VAL, 2007). A proteína *claudin* juntamente com os demais genes/proteínas encontrados nesse trabalho estão entre os principais responsáveis pela selagem das JPs (KUMAI e PERRY, 2011; KWONG e PERRY, 2013). Essa característica não havia sido aventada com tantos genes envolvidos nesse mecanismo para caracídeos amazônicos, uma vez que, essa característica comum para os ciclídeos amazônicos (GONZALEZ e WILSON, 2001; DUARTE et al., 2013).

Vale ressaltar, que as águas pretas são ricas em H⁺, e isso de alguma maneira afetaria as JPs negativamente, aumentando a permeabilidade, devido dissociação do Ca²⁺ na adesão celular (MCDONALD, 1983; FREDA et al., 1991). No entanto, as águas pretas possuem uma característica exclusiva que as diferenciam

das demais. Ela é rica em material orgânico dissolvido, com alta concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) (WALKER, 1995). Uma função importante do COD na água acidificada é a capacidade de tamponamento contra os efeitos prejudiciais ao baixo pH (HOLLAND et al., 2012).

Campbell et al. (1997) mostraram que o COD pode se ligar diretamente na membrana biológica de células das brânquias e alterar a permeabilidade da membrana celular. Também Wood et al. (2011) apontaram um importante papel do COD sobre as JPs, afirmando que o COD poderia atuar como o Ca^{2+} nas JPs, reduzindo a permeabilidade paracelular. Esta afirmação do papel protetor do COD foi recentemente confirmada por Duarte et al. (2016). Em seus achados observaram que em águas pobres de Ca^{2+} como as do Rio Negro, o COD pode atuar com funções similares às funções do Ca^{2+} sobre a proteção da integridade das JPs. Assim nossos dados corroboram as informações de Duarte et al. (2016), mostrando que mesmo em águas pobres em Ca^{2+} os genes/proteínas continuaram sendo expressos para manter a integridade das JPs e consequente manter o equilíbrio iônico para sobrevivência do organismo em águas desafiadoras para muitas espécies aquáticas.

O segundo mecanismo está relacionado à regulação iônica e ácido-base (*rhcg1* (*ammonium transporter Rh type C 1*), *slc9a6a* (*sodium/hydrogen exchanger*) (NHE), *ATP6V0A2* (*V-type proton ATPase subunit a*), Na^+/K^+ -ATPase (*sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha*), *slc26a4* (*pedrin*), *slc4a4b* (*anion exchange protein*) (Tabela 3). Uma das funções essenciais para manter a homeostase em peixes é a excreção de amônia (NH_3^+), principalmente pelas brânquias (WOOD et al., 2007). Vários trabalhos têm mostrado que o organismo exposto ao ambiente acidificado pode usar essa função de excreção da NH_3^+ para fazer a captação de Na^+ do ambiente (KUMAI e PERRY, 2011; WRIGHT e WOOD, 2012; WOOD et al., 2014).

Essa informação foi questionada levando-se em consideração a termodinâmica (PARKS et al., 2008). Porém, Kumai et al. (2011) e Duarte et al. (2013) observaram que a excreção de amônia pelas brânquias aumentou a captação de Na^+ , através do complexo NHE. Esta interação foi associada à presença da glicoproteína *rhcg1* responsável pela dissociação do amônio (NH_4^+) em NH_3^+ e H^+ , criando um microambiente favorável para o transporte de NH_3^+ e H^+ , através da

rhcg1 e NHE, respectivamente (WRIGHT e WOOD, 2012; DUARTE et al., 2013; ITO et al., 2013).

Além das proteínas rhcg1 e slc9a6a (NHE), também observamos a expressão da ATP6V0A2 (H⁺-ATPase). Assim como as proteínas rhcg1 e NHE, a H⁺-ATPase tem sido bastante estudada, pois é responsável por propiciar um ambiente intracelular que favorece a captação de Na⁺ durante a exposição ao baixo pH, através da extrusão ativa de H⁺ da célula (LIN et al., 2006; CHANG et al., 2009).

Também observamos que a bomba de Na⁺/K⁺-ATPase foi diferencialmente expressa. Isso já era esperado, uma vez que, havíamos notado que o organismo exposto ao ambiente acidificado estava fazendo a captação de Na⁺ através do mecanismo descrito acima. Portanto, seria necessário haver um ambiente eletroquímico favorável para que esse mecanismo de troca não fosse interrompido. Esse ambiente favorável para manter os trocadores NHE funcionando é realizado através da bomba de Na⁺/K⁺-ATPase (MARSHALL, 2002; EVANS et al., 2005; WOOD et al., 2014).

Além do controle da permeabilidade celular e regulação iônica, é necessário manter a regulação ácido-base, tendo em vista a tendência natural de perda de Cl⁻ para o ambiente acidificado (EVANS et al., 2005). Observamos a expressão dos genes slc26a4 e slc4a4b. Estes genes estão envolvidos no controle do pH intracelular. Esta informação corrobora os trabalhos de Perry et al. (2009) e Bayaa et al. (2009) que propuseram que a captação de Cl⁻ do ambiente se daria por famílias de proteínas trocadoras, como slc26.

No entanto, para que essa troca seja possível, é necessário uma molécula de HCO₃⁻ intracelular para o acoplamento do trocador Cl⁻/HCO₃⁻ (EVANS et al., 2005). Estudos têm mostrado que a anidrase carbônica é responsável pelo fornecimento do HCO₃⁻ interno, por meio da hidratação do CO₂ (LIN et al., 2008; GILMOUR e PERRY, 2009). Em nossos dados não localizamos a expressão diferencial da anidrase carbônica. Contudo, podemos constatar sua atuação através do subproduto (HCO₃⁻), que está sendo utilizado no equilíbrio ácido-base, através da expressão da proteína slc26a4 que atua na membrana apical da célula fazendo a permuta do Cl⁻/HCO₃⁻ e também slc4a4b, proteína localizada na membrana basolateral, que utiliza o HCO₃⁻ e Na⁺, para transportar o HCO₃⁻ para o sangue, mantendo o pH interno equilibrado (EVANS et al., 2005).

Os mecanismos descritos acima são essenciais para manter a homeostase do organismo quando exposto a ambientes acidificados. Para que esses mecanismos sejam desencadeados, muitos autores têm relatado a importância das respostas endócrinas em peixes (como revisado por BREVES et al., 2014; KWONG et al., 2014). Fechando esse ciclo de respostas iônicas e ácido-base, destacamos os genes *nr3c1* (*glucocorticoid receptor*) e *prlra* (*prolactin receptor a*) (Tabela 3), ambos envolvidos em respostas hormonais, cortisol e prolactina, respectivamente. Segundo Kwong e Perry (2013), quando esses hormônios estão expressos são capazes de reduzir a permeabilidade epitelial, evitando perdas excessivas de Na^+ e Cl^- para o ambiente. Também podem promover a reabsorção desses íons (FLIK e PERRY, 1989; KELLY e WOOD, 2001; KUMAI et al., 2012), e ainda aumentar atividade H^+ -ATPase (LIN e RANDALL, 1993).

As respostas fisiológicas de peixes amazônicos ao longo dos anos vêm sendo melhor compreendida (MATSUO e VAL, 2007; DUARTE et al., 2013; WOOD et al., 2014). O avanço das novas técnicas da biologia molecular e recursos da bioinformática, tem aumentado o conhecimento de como algumas espécies de peixes respondem a condições ambientais adversas (LEMGRUBER et al., 2013; JESUS et al., 2016; PRADO-LIMA e VAL, 2016). Neste âmbito, pudemos observar no presente trabalho que a espécie *T. albus* responde de maneira diferenciada conforme o ambiente exposto (Figura 1). Ao analisarmos o gráfico *heatmap*, verificamos claramente dois *clusters* de respostas gênicas diferenciais, à dois extremos de ambientes aquáticos, respectivamente. Essa informação foi observada pela primeira vez no presente trabalho.

Apesar da literatura enfatizar que a água clara é classificada como intermediária entre a água preta e branca (SIOLI, 1984; DUNCAN e FERNANDES, 2010), pudemos observar que *T. albus* apresenta maior conjunto de ajustes na expressão gênica no Rio Tapajós e no Rio Negro. Assim, por meio da resposta gênica observada nessa espécie, podemos concluir que a água clara e água preta são dois extremos distintos, e que apresentam maior desafio ambiental para a sobrevivência do organismo. Por outro lado, verificamos que a água branca, foi a que apresentou um nível intermediário, exigindo menor ajuste quantitativo da resposta gênica ao ambiente exposto. Isso de alguma maneira pode estar relacionado a maior abundância dessa espécie no Rio Solimões.

5. CONCLUSÃO

O Rio Negro é o ambiente mais crítico para a sobrevivência de muitas espécies aquáticas na bacia amazônica, em função de sua elevada acidez. Contudo, podemos observar que a espécie *T. albus* mostrou dois principais mecanismos que permitem a sobrevivência nos ambientes aquáticos amazônicos, inclusive aqueles com baixo pH. O primeiro mecanismo é o controle de genes nas junções paracelulares, como *claudin*, *actn4*, *itgb3b*, *DSP* que estão envolvidos no processo de manutenção do controle da permeabilidade paracelular e, conseqüentemente, diminuição da perda de íons de Na^+ e Cl^- para o ambiente. Esta característica que até então havia sido observado somente em ciclídeos amazônicos, mostrou-se bem desenvolvida em *T. albus*.

O segundo mecanismo foi atribuído à capacidade de regulação iônica e ácido-base desenvolvido por esta espécie. Observamos alta expressão dos genes envolvidos na captação de Na^+ , onde a excreção de NH_3^- através da proteína *rhcg1* de alguma maneira favorece a captação de Na^+ através do trocador NHE, além da H^+ -ATPase e da bomba de Na^+/K^+ -ATPase. Encontramos ainda, os genes *prlra* e *nr3c1*, responsáveis por desencadear os dois mecanismos descritos acima. Portanto, podemos constatar que a espécie *T. albus* desenvolveu mecanismos que conferem habilidades para sobreviver em ambientes considerados críticos para muitas espécies. Por meio dos dados do presente trabalho sugerimos que a espécie *T. albus* é uma boa candidata para futuros estudos envolvendo um modelo de regulação iônica e ácido-base de espécies amazônicas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. G. DE. Biologia Alimentar de três espécies de *Triportheus* (Pisces: Characoideil, characidae) do lago do Castanho, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 14, n. 1-2, p. 48–76, 1984.

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHÄFFER, A.; ZHENG, J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

AMARAL, B. D. DO. Fisheries and fishing effort at the Indigenous Reserves Ashaninka/Kaxinawá, river Breu, Brazil/Peru. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p. 133–144, 2005.

ANDREWS, S. **FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

BAYAA, M.; VULESEVIC, B.; ESBAUGH, A.; BRAUN, M.; EKKER, M. E.; GROSELL, M.; PERRY, S. F. The involvement of SLC26 anion transporters in chloride uptake in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 20, p. 3283–3295, 2009.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONGA, S. E.; FLIK, G.; BALM, P. H. M.; VAN DER MEIJ, J. C. A. The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. **Cell and Tissue Research**, v. 259, n. 3, p. 575–585, 1990.

BREVES, J. P.; MCCORMICK, S. D.; KARLSTROM, R. O. Prolactin and teleost ionocytes: New insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia. **General and comparative endocrinology**, v. 203C, p. 21–28, 2014.

CAMPBELL, P. G.; TWISS, M. R.; WILKINSON, K. J. 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**, v. 54, n. 11, p. 2543–2554, 1997.

CÁUPER, G. C. DE B. Biodiversidade Amazônica. **Centro Cultural dos povos da Amazônia**, v. 1, p. 1–162, 2006.

CHANG, W. J.; HORNG, J. L.; YAN, J. J.; HSIAO, C. D.; HWANG, P. P. The transcription factor, glial cell missing 2, is involved in differentiation and functional regulation of H⁺-ATPase-rich cells in zebrafish (*Danio rerio*). **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 4, p. R1192–R1201, 2009.

CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A. I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 3, p. 302–319, 2002.

COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome scans, population genetics and phylogeography of the characin fish *Triportheus albus*. **Molecular ecology**, v. 21, n. 10, p. 2410–2427, 2012.

DE PINNA, M. Diversity of Tropical Fishes. In: L, V. A.; F, A.-V. V. M.; RANDALL, D. J. (Eds.). **The Physiology of Tropical Fishes**. p. 47–84, 2006.

DORIA, C. R. DA C.; QUEIROZ, L. J. DE. A pesca comercial das sardinhas (*Triportheus* spp.) desembarcadas no mercado pesqueiro de Porto Velho, Rondônia (1990-2004): Produção pesqueira e perfil geral. **Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 99–106, 2008.

DUARTE, R. M.; FERREIRA, M. S.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effect of low pH exposure on Na⁺ regulation in two cichlid fish species of the Amazon. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 166, n. 3, p. 441–8, 2013.

DUARTE, R. M.; SMITH, D. S.; VAL, A. L.; WOOD, C. M. Dissolved organic carbon from the upper Rio Negro protects zebrafish (*Danio rerio*) against ionoregulatory disturbances caused by low pH exposure. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-10, 2016.

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

ERTEL, J. R.; HEDGES, J. I.; DEVOL, A. H.; RICHEY, J. E.; NAZARG, M. DE; RIBEIRO, G. Dissolved humic substances of the Amazon River system. **Limnology and Oceanography**, v. 31, n. 4, p. 739–754, 1986.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological reviews**, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

FLIK, G.; PERRY, S. F. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. **Journal of Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 75–82, 1989.

FREDA, J.; SANCHEZ, D. A.; BERGMAN, H. L. Shortening of Branchial Tight Junctions in Acid-Exposed Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, n. 10, p. 2028–2033, 1991.

GAILLARDET, J.; DUPRE, B.; ALLEGRE, C. J.; NÉGREL, P. Chemical and physical denudation in the Amazon River Basin. **Chemical Geology**, v. 142, n. 3-4, p. 141–173, 1997.

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. H.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GILMOUR, K. M.; PERRY, S. F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. **The Journal of experimental biology**, v. 212, n. 11, p. 1647–1661, 2009.

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

GONZALEZ, R. J.; WILSON, R. W.; WOOD, C. M.; PATRICK, M. L.; VAL, A. L. Diverse Strategies for Ion Regulation in Fish Collected from the Ion-Poor, Acidic Rio Negro. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, n. 1, p. 37–47, 2002.

GONZALEZ-MARISCAL, L.; CONTRERAS, R. G.; BOLIVAR, J. J.; PONCE, A.; CHAVEZ DE RAMIREZ, B.; CERREJIDO, M. Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. C987–C994, 1990.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011.

HARTER, T. S.; SHARTAU, R. B.; BAKER, D. W.; JACKSON, D. C.; VAL, A. L.; BRAUNER, C. J. Preferential intracellular pH regulation represents a general pattern of pH homeostasis during acid–base disturbances in the armoured catfish, *Pterygoplichthys pardalis*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 184, n. 6, p. 709–718, 2014.

HOLLAND, A.; DUIVENVOORDEN, L. J.; KINNEAR, S. H. W. Naturally acidic waterways: conceptual food webs for better management and understanding of ecological functioning. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 22, n. 6, p. 836–847, 2012.

ITO, Y.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, N.; MIYAGI, H.; ESAKI, M.; HOSHIJIMA, K.; HIROSE, S. Close Association of Carbonic Anhydrase (CA2a and CA15a), Na⁺/H⁺ Exchanger (Nhe3b), and Ammonia Transporter Rhcg1 in Zebrafish Ionocytes Responsible for Na⁺ Uptake. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1–17, 2013.

JESUS, T. F.; GROSSO, A. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; COELHO, M. M. Transcriptome profiling of two Iberian freshwater fish exposed to thermal stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 55, p. 54–61, 2016.

Junk, W.J.; Bayley, P. B.; Sparks, R. E. The flood pulse concept in River-Floodplain Systems, in: D.P. Dodge (Ed.), **Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.**, Canada, 110-127, 1989.

KELLY, S. P.; WOOD, C. M. Effect of cortisol on the physiology of cultured pavement cell epithelia from freshwater trout gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, integrativa e fisiologia comparativa**, v. 281, n. 3, p. R811–R820, 2001.

KODRA, A. DE S.; FERNANDES, M. N.; DUNCAN, W. L. P. Effect of clearwater on osmoregulation of cururu ray, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes; Potamotrygonidae), an endemic specie from blackwater river. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 1, p. 15–24, 2014.

KONHAUSER, K. O.; FYFE, W. S.; KRONBERG, B. I. Multi-element chemistry of some Amazonian waters and soils. **Chemical Geology**, v. 111, n. 1-4, p. 155–175, 1994.

KÜCHLER, I. L.; MIEKELEY, N.; FORSBERG, B. R. A contribution to the chemical characterization of rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 3, p. 286–292, 2000.

KUMAI, Y.; NESAN, D.; VIJAYAN, M. M.; PERRY, S. F. Cortisol regulates Na⁺ uptake in zebrafish, *Danio rerio*, larvae via the glucocorticoid receptor. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 364, n. 1-2, p. 113–25, 2012.

KUMAI, Y.; PERRY, S. F. Ammonia excretion via Rhcg1 facilitates Na⁺ uptake in larval zebrafish, *Danio rerio*, in acidic water. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, p. R1517–R1528, 2011.

KWONG, R. W. M.; KUMAI, Y.; PERRY, S. F. The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system. **The Journal of experimental biology**, v. 217, n. 5, p.

651–662, 2014.

KWONG, R. W. M.; PERRY, S. F. Cortisol regulates epithelial permeability and sodium losses in zebrafish exposed to acidic water. **The Journal of endocrinology**, v. 217, n. 3, p. 253–264, 2013.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, p. 357–359, 2012.

LEMGRUBER, R. D. S. P.; MARSHALL, N. A. D. A.; GHELFI, A.; FAGUNDES, D. B.; VAL, A. L. Functional categorization of transcriptome in the species *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin 1904 (Perciformes: Cichlidae) exposed to benzo[a]pyrene and phenanthrene. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011.

LI, S.; LIU, C.; HUANG, J.; LIU, Y.; ZHANG, S.; ZHENG, G.; XIE, L.; ZHANG, R. Transcriptome and biomineralization responses of the pearl oyster *Pinctada fucata* to elevated CO₂ and temperature. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18943, 2016.

LIN, H.; RANDALL, D. J. H⁺-ATPase Activity in crude homogenates of fish gill tissue: Inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 174, n. 180, p. 163–174, 1993.

LIN, L. Y.; HORNG, J. L.; KUNKEL, J. G.; HWANG, P. P. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. **AJP: Cell Physiology**, v. 290, n. 2, p. C371–C378, 2006.

LIN, T. Y.; LIAO, B. K.; HORNG, J. L.; YAN, J. J.; HSIAO, C. D.; HWANG, P. P. Carbonic anhydrase 2-like a and 15a are involved in acid-base regulation and Na⁺ uptake in zebrafish H⁺-ATPase-rich cells. **AJP: Cell Physiology**, v. 294, n. 5, p. C1250–C1260, 2008.

LOGAN, C. A.; BUCKLEY, B. A. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1915–1924, 2015.

MALABARBA, M. C. S. L. Revision of the Neotropical genus *Triportheus* Cope, 1872 (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 4, p. 167–204, 2004.

MARSHALL, W. S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 3, p. 264–283, 2002.

MATEY, V.; IFTIKAR, F. I.; DE BOECK, G.; SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; WOOD, C. M. Gill morphology and acute hypoxia: responses of mitochondria-rich, pavement, and mucous cells in the Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), two species with very different approaches to the osmo-respiratory com. **Canadian Journal of Zoology**, v. 89, p. 307–324, 2011.

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

MATSUO, A. Y.; VAL, A. L. Low pH and calcium effects on net Na^+ and K^+ fluxes in two catfish species from the Amazon River (Corydoras: Callichthyidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 361–367, 2002.

MCDONALD, D. G. The effects of H^+ upon the gills of freshwater fish. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, n. 4, p. 691–703, 1983.

MIRANDA, R.; PEREIRA, S.; ALVES, D.; OLIVEIRA, G. Qualidade dos recursos hídricos da Amazônia - Rio Tapajós: avaliação de caso em relação aos elementos químicos e parâmetros físico-químicos. **Ambiente e Água**, v. 4, n. 2, p. 75–92, 2009.

MOLINIER, M.; GUYOT, J. L.; GUIMAMES, V.; OLIVEIRA, E. Hydrologie du bassin de l'Amazone. **Grands Bassins Fluviaux Péri-atlantiques**, v. 1, p. 335–344, 1995.

PARKS, S. K.; TRESGUERRES, M.; GOSS, G. G. Theoretical considerations underlying Na^+ uptake mechanisms in freshwater fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 4,

p. 411–418, 2008.

PASCOALOTO, D.; BRINGEL, S. R. B. Macroalgas e qualidade da água na bacia do alto Rio Negro - Município de São Gabriel da Cachoeira (AM). **Caminhos da Geografia**, v. 11, n. 36, p. 318–330, 2010.

PERRY, S. F.; VULESEVIC, B.; GROSELL, M.; BAYAA, M. Evidence that SLC26 anion transporters mediate branchial chloride uptake in adult zebrafish (*Danio rerio*). **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 4, p. R988–R997, 2009.

PINHEIRO, L. A.; BORGES, J. T. Avaliação hidroquímica qualitativa das águas do baixo rio negro. **Revista Eletrônica de Petróleo e Gás**, v. 1, n. 2, p. 23–32, 2013.

PRADO-LIMA, M.; VAL, A. L. Transcriptomic Characterization of Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) Exposed to Three Climate Change Scenarios. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1-21, 2016.

QUEIROZ, M. M. A.; HORBE, A. M. C.; SEYLER, P.; AUGUSTO, C.; MOURA, V. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 943–952, 2009.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

SILVA, M. S.; CUNHA, H. B.; MIRANDA, S.; SANTANA, G. P.; PASCOALOTO, D. Química das águas de superfície dos rios da bacia amazônica: uma contribuição para classificação de acordo com seus usos. **XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, 2010.

SILVA, M. S.; NAVES, S. Á. F. R. S.; PEREIRA, S. L. R. DA S. G. Classification of Amazonian rivers: A strategy for the preservation of these resources. **Holos Environment**, v. 13, n. 2, p. 163–174, 2013.

SIOLI, H. **The Amazon**. Dordrecht: Springer Netherlands, v. 56, 1984.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and Their Environment**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 32, 1995.

VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. . Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, n. 2, p. 107–114, 1998.

VIDAL-DUPIOL, J.; ZOCCOLA, D.; TAMBUTTÉ, E.; GRUNAU, C.; COSSEAU, C.; SMITH, K. M.; FREITAG, M.; DHEILLY, N. M.; ALLEMAND, D.; TAMBUTTÉ, S. Genes Related to Ion-Transport and Energy Production Are Upregulated in Response to CO₂-Driven pH Decrease in Corals: New Insights from Transcriptome Analysis. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.

WALKER, I. Amazonian streams and small rivers. In: TUNDISI, J. G.; MATSUMURA TUNDISI, T.; BICUDO, C. E. (Eds.). **Limnology in Brazil**. Academia B ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 167–193, 1995.

WENDELAAR BONGA, S. E.; VAN DER MEIJ, J. C. A.; FLIK, G. Prolactin and acid stress in the teleost *Oreochromis* (formerly *Sarotherodon*) *mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 55, n. 2, p. 323–332, 1984.

WOOD, C. M.; AL-REASI, H. A.; SMITH, D. S. The two faces of DOC. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 3–8, 2011.

WOOD, C. M.; KAJIMURA, M.; SLOMAN, K. A.; SCOTT, G. R.; WALSH, P. J.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Rapid regulation of Na⁺ fluxes and ammonia excretion in response to acute environmental hypoxia in the Amazonian oscar, *Astronotus ocellatus*. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, p. R2048–R2058, 2007.

WOOD, C. M.; ROBERTSON, L. M.; JOHANNSSON, O. E.; VAL, A. L. Mechanisms of Na⁺ uptake, ammonia excretion, and their potential linkage in native Rio Negro tetras (*Paracheirodon axelrodi*, *Hemigrammus rhodostomus*, and *Moenkhausia diktyota*). **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 184, n. 7, p. 877–90, 2014.

WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; VAL, A. L. Responses of an Amazonian teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. **Physiological zoology**, v. 71, n. 6, p. 658–670, 1998.

WRIGHT, P. A.; WOOD, C. M. Seven things fish know about ammonia and we don't. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 231–240, 2012.