

**FABIO CARNEIRO STERZELECKI**

**EFEITOS DA SALINIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE JUVENIS  
DE ROBALO-PEVA, *CENTROPOMUS PARALLELUS* (POEY).**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular do  
Departamento de Biologia Celular,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadores: Dra. Edith Fanta,  
Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Co-orientador: Dr. Edson Rodrigues**

**CURITIBA  
2009**


# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná


---

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**  
Orientador, em substituição a Profª. Drª. Edith Fanta, in memoriam da Universidade Federal do Paraná - (UFPR)

  
**Dr. José Milton Andriguette**  
Universidade Federal do Paraná - (UFPR)

  
**Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire**  
(Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Como Suplente:

**Dra. Viviane Prodocimo**  
(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

após arguir o(a) mestrando(a) **Fábio Carneiro Sterzelecki** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "Efeitos da salinidade no desenvolvimento de juvenis de robalo-Peva, *Centropomus Parallelus* (Poey)", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 28 de maio de 2009.

  
**Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Curso

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo grande incentivo durante o mestrado e que nesse período consentiram a minha ausência nas reuniões familiares. Ao meu pai, em especial, que ajudou muito no desenvolvimento do estudo.

A todo grupo do LAPMAR da Universidade Federal de Santa Catarina que juntamente com Lúcio Tadeu de Araújo, da Fundação Terra, disponibilizaram os alevinos de robalo-peva para o presente estudo.

A Paty, a minha grande pequena parceira que em diversas vezes auxiliou-me nas coletas, contribuindo incondicionalmente para o trabalho. A Luciana Badeluck Cettina que também me auxiliou em diversas etapas do trabalho e a todos os amigos.

Ao Steven D. McCormick, que me enviou seu protocolo bioquímico detalhado e ao meu coorientador Edson Rodrigues, que me traduziu e introduziu o “bioquimiquês”.

A todos aqueles do Programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular que em algum momento ajudaram, solucionando dúvidas e até mesmo compartilhando seus conhecimentos.

Ao Ciro de Oliveira que mesmo sobrecarregado de orientados recebeu-me para o término do trabalho e que antes mesmo de assumir o papel oficial de orientador, disponibilizou suas estruturas laboratoriais e seu tempo.

À minha orientadora Edith Suzana Elizabeth Fanta, que acreditou nesse estudo e mostrou-me algo de grandeza maior: o amor pelo trabalho. Mesmo na fragilidade de sua vida, continuou a fazer o que mais gostava, contribuindo enormemente para as pesquisas Antárticas. Dedico esse trabalho a principal responsável pela sua realização, que infelizmente não pode ver a conclusão.

## RESUMO

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase branquial possui um importante papel no equilíbrio osmótico e consumo de energia na osmorregulação dos peixes teleósteos. Algumas salinidades podem proporcionar maior crescimento nos peixes, devido, em parte, ao menor gasto energético dessa proteína transportadora. Portanto, os efeitos da salinidade sobre a taxa de crescimento específico (SGR), sobrevivência, células de cloreto e atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase branquial foram avaliadas em 308 juvenis de robalo-peva, *Centropomus parallelus*. Os indivíduos com  $0,129 \pm 0,51\text{g}$  (média  $\pm$  SD) foram submetidos a 5, 20 e 35psu (unidade prática de salinidade) durante 60 dias. O peso inicial, após 30 e 60 dias foram anotados e utilizados para o estudo da taxa de crescimento específico. A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase e as células de cloreto foram analisadas em curto (6, 24, 96 horas) e longo prazo (30 e 60 dias). A salinidade não teve efeito sobre a sobrevivência. A taxa de crescimento específico foi similar, mas a média de peso final do grupo em 5psu ( $0,606 \pm 0,235\text{g}$ ) foi significativamente maior do que aquele em 20psu ( $0,446 \pm 0,232\text{g}$ ). Não houve diferença significativa quando comparados com os peixes em 35psu ( $0,524 \pm 0,21\text{g}$ ). A quantidade de células de cloreto aumentou visivelmente nas concentrações de 5 e 35psu e apresentaram características típicas de células de cloreto que absorvem e secretam íons, respectivamente. A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase dos peixes em 5 e 35psu também aumentou significativamente após a mudança de salinidade. Contudo, a atividade dos indivíduos na menor salinidade retornou aos níveis iniciais em 30 dias, enquanto aqueles em água marinha (35psu) aumentou gradativamente até o sexagésimo dia. A energia dispensada pela  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase correlacionou positivamente com o crescimento do robalo-peva, e os juvenis em 5psu mostraram uma economia de atividade em longo prazo que pode ter influenciado no maior crescimento.

.

Palavras-chave: Salinidade. *Centropomus-parallelus*.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase. Crescimento.

## ABSTRACT

Branchial  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase plays an important role in osmotic equilibrium of teleost fish. There are salinities that promote higher growth in some fish species, due to, in part, the economy of energy consumed by this protein. Thus, salinity effects on specific growth rate (SGR), survival, chloride cell ultrastructure and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase activity were evaluated on *Centropomus parallelus*. Individuals weighing  $0.129 \pm 0.51\text{g}$  (mean  $\pm$  SD) were exposed to 5, 20 and 35psu (practical salinity unit). The weight was measured at initial, after 30 and 60 days of salinity change to evaluate specific growth rate. The survival curve was compared among treatments. Chloride cells and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase activity were analysed after acute (6, 24, 96 hours) and long-term exposition (30 and 60 days). Salinity had no effects on survival and SGR was similar among groups, but after 60 days, 5psu individuals reached higher mean weight ( $0.606 \pm 0.235\text{g}$ ) than those at 20psu ( $0.446 \pm 0.232\text{g}$ ). There was no significant difference when compared with 35psu fishes ( $0.524 \pm 0.21\text{g}$ ). The quantity of chloride cells increased visibly after hyposmotic (5psu) and hyperosmotic (35psu) challenge, assuming typical features of uptake and secretory cells, respectively. Individuals in 35psu and 5psu displayed significant augment in branchial  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase activity. However, the activity at 5psu returned to initial level after 30 days, while in 35psu increased gradually during the 60-day trial. The osmoregulation costs of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase activity correlated positively with growth, and the 5psu juveniles showed a long-term energy economy that could have influenced the higher final weight.

Key words: Salinity. *Centropomus-parallelus*.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase. Growth.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRODUÇÃO DA AQUICULTURA NO BRASIL.....	8
FIGURA 2- FOTOGRAFIA DO ROBALO-PEVA, <i>C. parallelus</i> .....	10
FIGURA 3- DESENHO REPRESENTATIVO DA BOMBA DE $Na^+, K^+$ ATPase .....	19
FIGURA 4- ESQUEMA EXPERIMENTAL.....	25
FIGURA 5- TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO.....	30
FIGURA 6- CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>C.parallelus</i> .....	30
FIGURA 7- ELETROMICROGRAFIAS DE CÉLULAS BRANQUIAIS DE <i>C.parallelus</i> .....	32
FIGURA 8- ATIVIDADE DA $Na^+, K^+$ ATPase.....	33
FIGURA 9- NÚMERO DE INDIVÍDUOS TOTAIS DE <i>C.parallelus</i> AO LONGO DO TEMPO.....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 AQUICULTURA.....	7
1.2 <i>CENTROPOMUS PARALLELUS</i> .....	9
1.3 SALINIDADE .....	11
1.4 EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO .....	13
1.5 CONTROLE OSMÓTICO .....	16
1.6 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPASE .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	23
3.2 ACLIMATAÇÃO .....	23
3.3 BIOENSAIO .....	24
3.4 TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO.....	25
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	25
3.6 ATIVIDADE $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPASE .....	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 AQUICULTURA

Os oceanos possuem imenso potencial para suprir a crescente demanda de proteína mundial. Cobrindo cerca de 75% do nosso planeta, os mares têm uma grande fonte alimentícia que incluem principalmente crustáceos, moluscos e peixes. Contudo, se explorada inadequadamente, essa fonte pode esgotar. Desde o início de sua prática, a pesca raramente vem capturando esses organismos aquáticos de uma forma sustentável (PAULY et al., 2002). Estudos mostram que populações de peixes desapareceram no passado (PITCHER, 2001) e, atualmente, muitos estoques passam por um processo de sobre-exploração, o que pode levar a extinção de muitas espécies (HUTCHINGS, 2000; PAULY et al., 2002; PAULY, 2005). Além do mais, a produção pesqueira total atingiu o máximo no final dos anos 80, e desde então houve um declínio gradual na captura de peixes (PAULY, 2005). Portanto, um suprimento sustentável de peixes para a crescente demanda mundial não será alcançada através da pesca (FAO, 2006).

Diferentemente da pesca que é essencialmente extrativista, a aquicultura é uma atividade que primeiramente semeia e depois cultiva até o momento da colheita (PAULY et al., 1998). Nos últimos 15 anos, a produção de peixes através da aquicultura mais que dobrou, e por esta razão é creditada por ter a maior taxa de crescimento no setor de produção de alimentos. Atualmente, é responsável por cerca de metade da produção mundial de peixes. A aquicultura também possui outros impactos positivos na sociedade, como o sustento do meio rural, melhoria da renda, alternativa de emprego, segurança alimentar, melhor nutrição e o desenvolvimento de áreas rurais (FAO, 2006).

Embora a aquicultura também produza impactos negativos no meio ambiente, esses podem ser minimizados quando adotados um manejo e policiamento corretos (NAYLOR et al., 2000). Portanto, muitos supõem que a aquicultura é capaz de



suplementar a produção de comida aquática e ao mesmo tempo diminuir a pressão sobre os estoques pesqueiros (NAYLOR et al., 2000; SAMPAIO et al., 2001; FAO 2006).

Segundo a FAO (2006), com o aumento populacional nas próximas duas décadas, será necessário um acréscimo de 40 milhões de toneladas para sustentar o consumo per capita atual. Em 2004, a produção mundial através da aquicultura foi em torno de 60 milhões de toneladas. Do total, cerca de 70% foi produzido na China e 21% no resto dos países asiáticos. A Europa contribuiu com 4%, a América com 3,5% e a África com o restante.

O Brasil com dimensões costeiras expressivas contribui modestamente para a produção mundial (FIGURA 1). Banhado pelo Oceano Atlântico, o litoral brasileiro possui 9.198 quilômetros de extensão, e que poderiam servir à aquicultura. Contudo, o cultivo realizado em nosso território se resume principalmente a alguns poucos milhares de toneladas de tilápia e carpa em águas doces e de camarão marinho em águas salgadas (FAO, 2006).

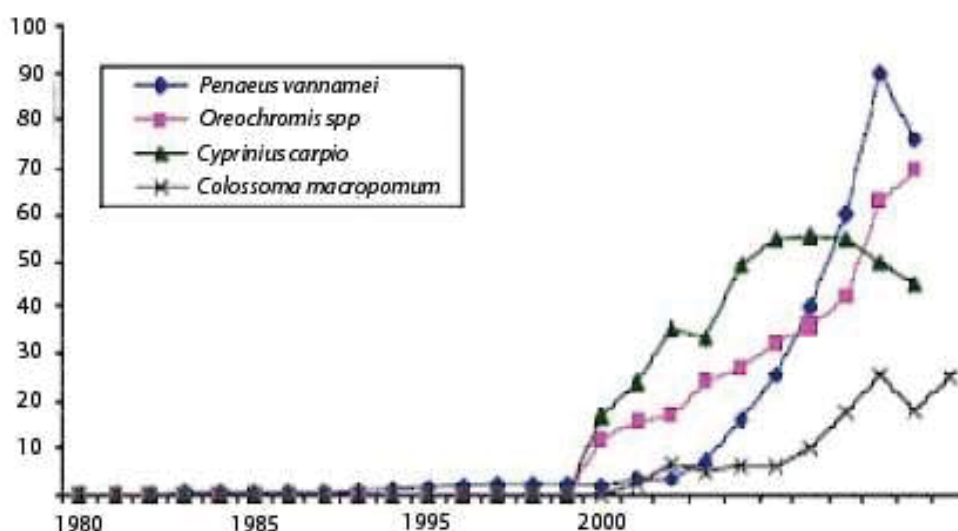


FIGURA 1- PRODUÇÃO DA AQUICULTURA NO BRASIL.

FONTES: FAO (2006)

Na abscissa a produção em milhares de toneladas. Na ordenada, produção ao longo dos anos.

A cultura de peixes marinhos no Brasil, um ramo da aquicultura, está ainda no início. A arabaiana (*Seriola lalandi*), a carapeba (*Diapterus rhombeus*), a garopa (*Epinephelus* spp.) e os robalos (*Centropomus* spp.) são exemplos de algumas espécies com predisposição à produção comercial (FAO, 2007). Apesar do potencial reconhecido de algumas espécies, o domínio completo da tecnologia para o cultivo comercial até a despesca ainda precisa ser alcançado (FAO, 2007; CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009).

### 1.2 *Centropomus parallelus*

Um dos primeiros programas de pesquisa para o desenvolvimento de peixes nativos de águas marinhas brasileiras foi iniciado somente em 1990, com as espécies de robalo *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* (CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009). Tardiamente quando comparados a espécie *Salmo solar*, que começou seu cultivo já na década de 80 no Chile e na de 60 na Noruega (CLARKE et al., 1996).

Os robalos (*Centropomus* spp) têm sido reconhecidos como espécies com grande potencial para a aquicultura, devido à sua resistência a adversidades, à boa taxa de crescimento, ao seu valor comercial e à alta frequência em que se encontram nos mercados (CERQUEIRA, 2002; BARROSO et al., 2002).

O robalo-peva, *Centropomus parallelus*, pode atingir dimensões promissoras de 75 cm de comprimento total e peso entorno de 4 Kg. No Brasil a produção é variável, chegando a 3.000 toneladas por ano. Devido à baixa produção, o preço no mercado pode atingir no mínimo a marca dos cinco dólares americanos o quilograma (CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009). Apesar da excepcional capacidade biológica e prosperidade econômica, são escassos os incentivos à pesquisa do desenvolvimento do seu cultivo. Os poucos estudos realizados estão reservados principalmente à fase inicial do ciclo de vida do robalo (CERQUEIRA, 2002; TEMPLE et al., 2004). A maior parte desses tem se destinado à alimentação

(SEIFFERT et al., 2001; TEMPLE et al., 2004; ALVES Jr. et al., 2006) e influência da intensidade luminosa sobre o desenvolvimento larval (CERQUEIRA; BRÜGGER, 2001). Na sua grande maioria, os trabalhos sobre os estágios mais avançados do desenvolvimento concentram-se na reprodução (CERQUEIRA, 2002; REIS; CERQUEIRA, 2003), densidade de estocagem (SOUZA- FILHO, 2003) e nutrição (BARROSO, 2002).

O Robalo-Peva (FIGURA 2), pertencente à família Centropomidae, é encontrado no Oceano Atlântico desde os Estados Unidos (Flórida) até o sul do Brasil (FROESE; PAULY, 2007). As doze espécies do gênero *Centropomus* formam um grupo compacto, homogêneo, e muito distinto dos outros taxa da família. Todos possuem corpos similares com formas finas, cores prateadas uniformes e uma conspícua linha lateral escura (RIVAS, 1986).



FIGURA 2- FOTOGRAFIA DO ROBALO-PEVA, *C. parallelus*  
FONTE:FISH BASE

As espécies de peixes do gênero *Centropomus* são estenotérmicos e termofílicos, habitando regiões tropicais e subtropicais que atingem naturalmente temperaturas entre 15°C e 24°C (RIVAS, 1986), contudo possuem melhor crescimento entre 25°C e 30°C (CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009). A alimentação de adultos de robalo-peva é essencialmente carnívora e consiste principalmente de

crustáceos, peixes, poliquetos, vegetais e gastrópodos. Dentre os primeiros, existe a preferência para siris no outono, tanaidáceos na primavera e camarões na primavera e verão (CHAVES; BOUCHEREAU, 2006).

A maturação gonadal dos Robalos alcança maior intensidade na primavera e no verão na região sul do Brasil. Predominantemente durante o verão, os adultos provavelmente desovam no interior dos rios. Os ovos e larvas são transportados pelos movimentos fluviais, dispersando-os ao longo do trajeto à foz (CHAVES; BOUCHEREAU, 2006). Juvenis são encontrados próximos a estuários e em águas marinhas. Os adultos também são localizados a dezenas de quilômetros rio acima (CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009). Portanto os peixes do gênero *Centropomus* são diádromos e eurihalinos, ou seja, apresentam migrações entre os habitats marinhos e dulcícolas, com o propósito de alimentação e procriação, e podem tolerar uma grande variação de salinidade (RIVAS, 1986; CERQUEIRA, 2002; CHAVES; BOUCHEREAU, 2006).

Apesar do robalo-peva suportar naturalmente ambientes com grande variação ao longo do seu ciclo de vida, as diferentes salinidades do meio parecem afetar inúmeros aspectos relacionados à regulação do crescimento dos peixes teleósteos (LAMBERT, 1994; WOO; KELLY, 1995; DUTIL, 1997 apud RUBIO, 2005). Dentre eles estão a taxa metabólica padrão no fígado e o balanceamento dos hormônios envolvidos com o metabolismo (BJÖRNSSON, 1998; McCORMICK, 1996 apud RUBIO, 2005; LAIZ-CARRIÓN, 2005).

### 1.3 SALINIDADE

Os corpos de água contêm substâncias dissolvidas, como sais, gases, compostos orgânicos e poluentes. Além da temperatura da água, esses são os fatores de maior importância fisiológica (SCHMIEGELOW, 2004).

Ainda existe muita divergência sobre a unidade da salinidade, pois ainda não há como medir diretamente a exata quantidade de sais dissolvidos na água

marinha. Para maiores estudos, a salinidade era mensurada através da titulação de íons cloro, mas atualmente a salinidade é principalmente captada através da condutividade (GROS et al., 2008; MILLERO et al., 2008). A unidade adimensional é a recomendada pela UNESCO, mas gerou muitas discussões que ainda estão em pauta. Portanto, no presente estudo foi utilizada a unidade de salinidade prática, o psu. Apesar de não constar no sistema internacional de medidas, S.I., ainda é muito utilizada na bibliografia oceanográfica (GROS et al., 2008; MILLERO et al., 2008).

Os minerais dissolvidos em água doce e água salgada diferem tanto na composição quanto na quantidade (RICKLEFS, 1996; SCHMIEGELOW, 2004). A água do mar contém cerca de 3,5% de sal, ou seja, 35 partes de sal por 1000 partes de água (MILLERO et al., 2008). Os principais íons marinhos são o sódio e o cloreto, mas também são encontrados o magnésio, bromo, enxofre e cálcio (SCHMIEGELOW, 2004; GROS et al., 2008; MILLERO et al., 2008). A solubilidade do cloreto de sódio é de 0,36g por grama de água, o que excede de longe a sua concentração na água do mar, sendo assim encontrado dissolvido no oceano (RICKLEFS, 1996).

A concentração total de sal varia segundo a localização geográfica. Em regiões litorâneas, a salinidade é relativamente mais baixa do que em mar aberto. Dependendo da estação do ano ou até mesmo durante um mesmo dia é possível observar repentinas modificações em águas estuarinas (FANTA, 1997; SCHMIEGELOW, 2004). Os estuários são regiões formadas por água salobra, ou seja, sujeitas tanto à água doce dos rios quanto às águas salgadas do mar. Estas áreas estão entre os ecossistemas mais produtivos do planeta (LOWE-MCCONNELL, 1987; FANTA, 1997; RANDALL et al., 2000, SCHMIEGELOW, 2004). É difícil determinar exatamente a partir de que ponto a água do mar torna-se salobra e quando essa, mais diluída, torna-se doce. Como uma definição comumente aceita, pode-se dizer que a água salobra corresponde a uma salinidade entre 30 e 0,5psu (SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; BRASIL, 2005).

A água salobra é extremamente importante do ponto de vista fisiológico, pois

representa uma barreira para a distribuição de muitos animais marinhos, assim como os de água doce. Contudo, nas regiões estuarinas, constitui também um ecótono que é muito utilizado por fases iniciais da vida de muitos peixes e invertebrados e que continuam mais tarde seus ciclos de vida no mar (LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996).

Segundo Kurbel et al. (2008), nossos ancestrais não poderiam deixar mares salgados em direção água salobras e doces, sem adequada regulação do fluído extracelular. A estrutura e a fisiologia dos organismos evoluem em resposta às características dos seus ambientes. A sobrevivência de cada indivíduo depende de sua habilidade em lidar com as variações do ambiente. As características do meio possibilitam que as espécies adaptadas estruturalmente e fisiologicamente possam viver em determinadas regiões (RICKLEFS, 1996; FANTA, 1997).

A maneira com a qual as espécies de peixes respondem as diferentes salinidades permite avaliar o melhor local para seu cultivo. Muitas espécies eurihalinas comerciais apresentam o melhor crescimento em determinadas salinidades e que pode mudar conforme o estágio de desenvolvimento.

#### 1.4 EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO

Em diferentes estágios da vida de diversos peixes, a salinidade mostra uma grande influência sobre o desenvolvimento dos organismos (BOEUF; PAYAN, 2001). Na fase inicial, a salinidade apresenta diferentes graus de interferência na fertilização (GRIFFIN et al., 1998), na incubação de ovos (GRIFFIN et al., 1998; ARAÚJO; CERQUEIRA, 2005) e no crescimento larval (GUNASEKERA; DE-SILVA, 2000; EL-SAYED et al., 2005).

Experimentos com diferentes concentrações de sais na água também constataram mudanças em estágios mais avançados na vida de algumas espécies de peixes, como na desova (EL-SAYED et al., 2005) e na velocidade de crescimento (QUADRO 1).

ESPÉCIE	HABITAT	SALINIDADE (psu)	PESO INICIAL (g)	REFERÊNCIA
<i>Sparus sarba</i>	S/M	7- <b>15</b> -35	150-250	Woo; Kelly (1995)
<i>Sparus aurata</i>	S/M	6- <b>12</b> -38	20	Laiz-Carrión et al. (2005)
<i>Micropogonias undulatus</i>	S/M	<b>5</b> -20	0,01	Peterson et al. (1999)
<i>Rachycentron canadum</i>	S/M	<b>5</b> -15-30	6	Resley et al. (2005)
<i>Scophthalmus maximus</i>	S/M	<b>15</b> -25-33,5	14,3	Imsland (2001)
<i>Chanos chanos</i>	D/S/M	<b>0</b> -16-34	0,05	Alava (1998)
<i>Trinectes maculatus fasciatus</i>	D/S/M	0-7-15*	0,01	Peterson-Curtis (1997)
<i>Centropomus parallelus</i>	D/S/M	<b>5</b> -20-30	2	Rocha et al. (2005)
<i>D. labrax</i>	D/S/M	0- <b>7</b> -20	52,4	Rubio et al. (2005)
<i>Salmo salar</i>	D/S/M	28-34*	59,4	Handeland et al. (1998)
<i>Oreochromis niloticus</i>	D/B	<b>0</b> -8-12-16	4,6	Likongwe et al. (1996)
<i>Centropristis striata</i>	M	10- <b>20</b> -30	9,2	Cotton et al. (2003)

QUADRO 1– CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE PEIXES EM DIFERENTES SALINIDADES.

A segunda coluna mostra o ambiente natural de cada espécie, sendo em águas doce(D), salobra (S) e marinha (M). Na terceira coluna, em negrito está apresentada a salinidade na qual a houve a melhor taxa de crescimento e o (\*) mostra que não houve diferença significativa.

Diversos autores têm estudado a influência da salinidade da água sobre o desenvolvimento dos peixes eurihalinos e, quase sempre, o grau de concentração afeta seu crescimento (MACIEL, 2005).

Muitos peixes podem se adaptar em condições ambientais desfavoráveis. Entretanto, a alteração da salinidade para além da concentração corporal das diferentes espécies, pode fazer com que essas percam ou ganhem água ou sais. Para estabilizar esse influxo ou efluxo e manter a quantidade de sais do organismo em um determinado nível, os peixes gastam energia (JOBILING, 1994; BOEUF; PAYAN, 2001).

Diferentes análises mostram que o gasto energético para a osmorregulação pode alcançar entre 10% e 50% do metabolismo padrão dos peixes (MARSHALL; BRYSSON, 1998; BOEUF; PAYAN, 2001). Essa energia gasta no equilíbrio

osmótico, quando minimizada poderia ser direcionada para o crescimento dos peixes (TSUZUKI et al., 2006). Em Lemos et al. (2006), juvenis selvagens de robalo sob 20psu apresentaram um gasto metabólico total de 82% da energia consumida. Apenas 10% da energia ingerida foram canalizadas para o crescimento. Contudo, não foram testadas outras salinidades nesse estudo e, portanto, a parcela utilizada para o crescimento em virtude da economia no gasto osmorregulatório pode ser maior em outros meios. Ainda carecem estudos sobre o real custo da osmorregulação apresentado por essa espécie em diferentes salinidades.

Apesar de pouco esclarecidos, outros processos metabólicos dos peixes sofrem influência da salinidade ambiental e que também podem modificar a taxa de crescimento. Foi observado que a taxa de conversão alimentar e a ingestão de alimento podem ser alteradas em determinadas espécies (BOEUF; PAYAN, 2001). No estudo de TSUZUKI et al. (2007b), podemos observar um bom exemplo da influência da salinidade sobre a conversão alimentar. Nesse, as atividades enzimáticas da proteinase alcalina e da amilase protéica diferiram significativamente quando juvenis de *C.parallelus* foram criados em distintas salinidades. Dessa maneira, a concentração de sal do líquido no trato digestório pode interferir na taxa de conversão alimentar e conseqüentemente no crescimento do animal.

A salinidade também pode influenciar o desenvolvimento dos peixes através da ação de hormônios. Existem hormônios que além de responsáveis pela regulação da freqüência de ingestão de alimentos e pelo crescimento do animal, também possuem um papel na regulação osmótica do organismo. O eixo somatotrópico GH/IGF-I é um exemplo dessa dupla atuação, e que pode justificar a maior taxa de crescimento alcançada por alguns peixes aclimatados em águas hiperosmóticas (BOEUF; PAYAN, 2001; SHEPHERD et al., 2005; SAKAMOTO; McCORMICK, 2006). Além desses hormônios, o sistema arginina-angiotensina (BROWN et al., 2005; WONG et al., 2006), a tireóide, o cortisol e a prolactina também são importantes na osmorregulação de diversas espécies de peixes (McCORMICK; BRADSHAW, 2006).



## 1.5 CONTROLE OSMÓTICO

Os peixes podem ser expostos a uma grande variedade de agentes naturais ou artificiais em seus ambientes. Cada vez mais as conseqüências ecofisiológicas da exposição de peixes e outros animais aquáticos a agentes estressantes têm sido estudadas. Entre os agentes estressantes, a salinidade e a temperatura são os fatores reguladores mais importantes no mar (RANKIN; JENSEN, 1993).

A estratégia básica para balancear os íons nos peixes teleósteos de água salgada é semelhante (McCORMICK et al., 2003; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007). Em geral, eles mantêm suas concentrações osmóticas em torno de um terço da concentração da água do mar, sendo chamados de hiposmóticos. Assim, há uma tendência de perderem água para o meio, especialmente através do epitélio branquial (JOBILING, 1995; EVANS et al., 2005).

Para repor o volume perdido de água, os peixes teleósteos bebem água do mar. A maior parte da absorção de sal ocorre por ingestão de água do mar e uma pequena quantidade através da superfície corpórea ou das brânquias (JOBILING, 1995; CARVALHO FILHO, 1999; EVANS et al., 2005). No epitélio intestinal ocorre a absorção para a corrente sanguínea de 70 a 80% da água ingerida e da maior parte do NaCl e do KCl presentes na água do mar. Inicialmente a água do mar ingerida é diluída a 50% por absorção passiva dos sais através do esôfago (JOBILING, 1995; RANDALL et al. 2000). No intestino delgado, ocorre a absorção ativa secundária na membrana apical, por meio dos cotransportadores Na/2Cl/K e Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, seguida de transporte ativo na membrana basolateral pela Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase (SCOTT et al. 2006). A maioria dos íons divalentes, tais como Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, permanece no trato gastrointestinal e é expelido pelo ânus (JOBILING, 1995; RANDALL et al., 2000).

O excesso de sal absorvido é posteriormente eliminado do organismo para a água do mar, principalmente, através das brânquias. As células de cloreto no epitélio branquial são as grandes responsáveis pela secreção de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Os sais divalentes são eliminados através do rim. O resultado do trabalho osmótico

combinado, das brânquias e dos rins, é a retenção de água nos peixes teleósteos marinhos (JOBILING, 1995; BOEUF; PAYAN, 2001; EVANS et al., 2005).

As células de cloreto são altamente especializadas e caracterizadas por uma aparência colunar larga, numerosas mitocôndrias, um sistema de retículo endoplasmático tubular extenso, cripta apical e superfície muco serosa (McCORMICK, 1995; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007). O sistema tubular tem continuidade com a membrana basolateral, resultando em uma grande área de superfície, onde é localizada grande quantidade de proteínas transportadoras. A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase é uma proteína transportadora altamente difundida na membrana basolateral, com um papel central na secreção salina (JOBILING, 1995; McCORMICK, 1995; MARSHALL; BRYSON, 1998). Através do transporte ativo, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase cria baixa concentração de  $\text{Na}^+$  e grande concentração de cargas negativas no meio intracelular. O gradiente do íon sódio é então utilizado para transportar íon cloro para o interior da célula através do cotransportador  $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ . Dessa maneira, o  $\text{Cl}^-$  deixa a célula a favor do gradiente eletroquímico através do canal de  $\text{Cl}^-$  apical. O sódio então é secretado a favor do gradiente eletroquímico por uma via paracelular, entre as células de cloreto e as células acessórias (EVANS, 1982 apud McCORMICK, 1995; JOBILING, 1995; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007).

Em águas com concentração de sal menor do que a do organismo, ou hiposmóticas, os peixes teleósteos tendem a perder íons através da excreção e, principalmente, pela superfície branquial. Para a manutenção da homeostasia, os peixes teleósteos possuem um eficiente sistema de reabsorção renal, evitando a saída de grande parte dos íons. Em paralelo, as brânquias trabalham no sentido de captar íons da água, repondo grande parte dos sais. A alimentação é uma outra fonte importante para a reposição de sais perdidos (EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007).

Existem ainda incertezas na maneira exata em que o epitélio branquial absorve sal (EVANS, 2008). Hwang e Lee (2007) apontam dois modelos para a

absorção de  $\text{Na}^+$ . No primeiro, o transporte é realizado através do trocador apical eletroneutro  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) estimulado pelo trabalho da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$  ATPase basolateral. No entanto, pesquisadores apontam a impossibilidade de absorção sódio através desse sistema em ambientes extremamente diluídos, devido a contradições com princípios termodinâmicos (EVANS et al., 2005; PARKS et al., 2008). Dessa maneira, outros estudos apontam um segundo modelo de absorção de sal com o auxílio de outra ATPase, a eletrogênica  $\text{H}^+$ -ATPase. Na membrana apical, essa proteína transportaria prótons para fora das brânquias, gerando um potencial eletroquímico que possibilitaria a entrada de  $\text{Na}^+$  na célula através do canal de  $\text{Na}^+$ . Assim, a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$  ATPase na membrana basolateral exportaria o  $\text{Na}^+$  para o fluido extracelular. Apesar de poucos estudos, foi proposto que o cloro poderia penetrar na célula branquial através dos trocadores aniônicos  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e alcançaria o espaço extracelular através dos canais de  $\text{Cl}^-$  na membrana basal (EVANS et al., 2005; TRESGUERRES et al., 2006; PARKS et al., 2008).

Kirschner (2004), afirma que mesmo no sistema em que é auxiliado pela  $\text{H}^+$ -ATPase, a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$  ATPase é responsável em pelo menos a metade da energia de troca de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , pois para cada molécula de ATP gasta pela bomba de prótons, 2 ou 3  $\text{H}^+$  são bombeados. Em alguns tecidos, como no renal, o consumo da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$  ATPase chega a 30% do ATP celular (NIGGLI; SIGEL, 2008) e nas células de cloreto branquiais é apontada pelo maior consumo de ATP (MARSHALL; BRYSON, 1998).

### 1.6 $\text{Na}^+,\text{K}^+$ ATPase

A  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ ATPase é uma proteína transportadora da família das p-ATPases, pois apresenta estado intermediário fosforilado. É uma enzima heteromérica composta de uma subunidade catalítica principal, a  $\alpha$  subunidade, e uma subunidade glicosilada menor, a  $\beta$  subunidade (FIGURA 3).

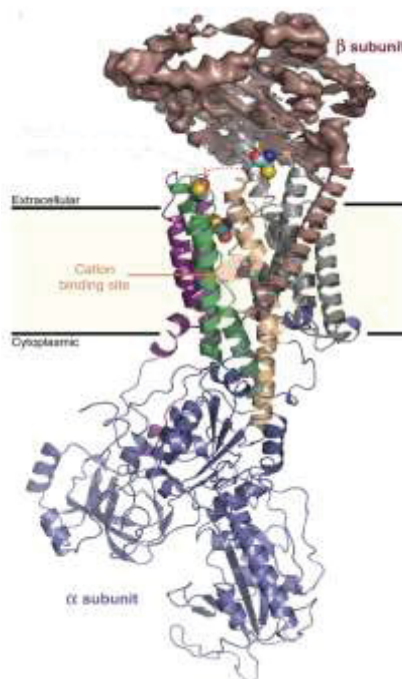


FIGURA 3- DESENHO REPRESENTATIVO DA BOMBA DE  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase

FONTE: YATIME et al. (2009)

Vista geral da estrutura da  $\alpha$  e  $\beta$  subunidades em associação aproximada na bicamada lipídica.

A capacidade de bombear  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  foi somente demonstrada com a presença de ambas as subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$  subunidades). Um terceiro peptídeo, a subunidade  $\gamma$ , é encontrada associada aos dímeros  $\alpha$  e  $\beta$  em alguns tecidos e apresenta indícios na regulação catalítica da enzima (HORISBERGER; DOUCET, 2002; FALLER, 2008).

Em condições fisiológicas, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase transporta 3 íons de  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular na troca por 2 íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular e usa uma molécula de ATP durante cada ciclo de transporte (ARTIGAS; GADSBY, 2006; HWANG; LEE, 2007; FALLER, 2008; NIGGLI; SIGEL, 2008). Portanto, a atividade de transporte da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  é a fonte de uma corrente com sentido para o meio extracelular de uma carga por ciclo (100 cargas por segundo, ou  $10^{-5}$  pA) (HORISBERGER; DOUCET, 2002).

A corrente gerada pela atividade da bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  tende a hiperpolarizar a membrana celular. Entretanto o maior responsável pela hiperpolarização da

membrana é o canal de  $K^+$ . A  $Na^+,K^+$  ATPase mantém a diferença de concentração desses íons entre o lado extracelular e intracelular de praticamente todas as células animais, mantendo o seu volume citoplasmático (HORISBERGER; DOUCET, 2002; FALLER, 2008).

O gradiente eletroquímico gerado pela troca desigual de íons sódio por potássio é utilizado para conduzir o transporte de diversos íons e metabólitos (FALLER, 2008). Entre eles estão a captação e extrusão de sal através das brânquias dos peixes (JOBILING, 1995; McCORMICK, 1995; HWANG; LEE, 2007).

A regulação da  $Na^+K^+$ ATPase é crítica durante o movimento do peixe entre as águas doces, salobras e marinhas presentes em regiões estuarinas (McCORMICK, 1995), e ocorre em diversos níveis (JOBILING, 1995; HORISBERGER; DOUCET, 2002). Primeiro, a atividade é dependente dos três substratos,  $Na^+$ ,  $K^+$  e ATP. O sódio intracelular é supostamente considerado de maior relevância fisiológica em se tratando da ativação da bomba  $Na^+$ ,  $K^+$  pelos substratos, visto que o ATP está disposto em grande concentração intracelular, assim como o  $K^+$  extracelular. A concentração de  $Na^+$  é normalmente abaixo ou próximo da constante da meia ativação ( $K_{1/2}$ ) e sempre que há uma pequena variação intracelular de  $Na^+$ , instantaneamente deve ser seguida por uma variação na atividade da bomba de  $Na^+$ ,  $K^+$  (HORISBERGER; DOUCET, 2002).

Em um segundo nível, por uma regulação em curto prazo, a atividade da  $Na^+,K^+$  ATPase na superfície celular pode ser controlada através da sua fosforilação. Por último, em maior prazo de tempo, a regulação ocorre sobre a densidade da bomba  $Na^+$ ,  $K^+$ . A ocorrência sobre a superfície celular pode ser controlada pela taxa de síntese em um nível transcricional e pós-transcricional, através da taxa de degradação da proteína, ou pela distribuição entre o estado ativado na superfície celular e o conjunto armazenado em vesículas intracelulares (HORISBERGER; DOUCET, 2002).

Portanto, a  $Na^+,K^+$  ATPase apresenta função imprescindível na osmorregulação dos peixes, seja em ambiente hipo ou hiperosmótico, e o

importante papel desempenhado na osmorregulação mostra a sua condição de boa biomarcadora para a aclimatação a salinidade e para o conseqüente gasto de energia durante o equilíbrio osmótico dos peixes teleósteos. Assim, as relações entre os componentes osmoregulatórios, células de cloreto e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase, e o crescimento de *Centropomus parallelus* em diferentes salinidades, foram avaliadas no presente estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da salinidade sobre o desenvolvimento de juvenis de Robalo-Peva (*Centropomus parallelus*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de crescimento da espécie de peixe *Centropomus parallelus* expostos a diferentes salinidades 5psu, 20psu e 35psu em 30 e 60 dias;
- Averiguar a influência das salinidades de 5psu, 20psu e 35psu sobre a taxa de sobrevivência de *Centropomus parallelus*;
- Avaliar os efeitos das salinidades 5psu, 20psu e 35psu na ultraestrutura das células de cloreto através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Investigar a relação entre as salinidades 5psu, 20psu e 35psu com a atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase de células branquiais e o crescimento de *Centropomus parallelus*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

O presente estudo foi realizado em dois momentos. Primeiramente em fevereiro de 2007 e o segundo em maio do mesmo ano. No total, 308 juvenis com 65 dias de vida e peso  $0,129 \pm 0,51$ g foram adquiridos no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina. Os alevinos foram transportados em saco plástico oxigenado com água salobra (20psu) e Benzocaína (0,0084%), para o laboratório de Biologia Integrativa de Peixes e Impacto Ambiental (BioPx), localizado no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.2 ACLIMATAÇÃO

Para manter estáveis as condições químicas, físicas e biológicas da água, foram preparados três aquários de 120L com um mês de antecedência da chegada dos juvenis de robalo-peva. A água de torneira utilizada foi decolorificada e filtrada com carvão ativado. Para obter a salinidade de 20psu foi adicionado sal marinho CORELIFE<sup>®</sup>. A salinidade desejada foi certificada através de um refratômetro com precisão de 1psu. A temperatura foi mantida a  $26 \pm 2$  °C.

Dessa maneira os alevinos de robalo-peva foram distribuídos nos três aquários e aclimatados por um período de nove dias sob fotoperíodo natural (FIGURA 4). O sistema de tratamento foi o fechado, ou seja, os aquários possuíam sexto vidro, onde era posicionado o filtro mecânico (malha acrílica), filtro biológico (porcelana) e bomba de água com potência de  $600 \text{ L.h}^{-1}$ . Para ajudar na oxigenação, foi utilizado um aerador em cada aquário. O  $\text{O}_2$  foi mantido acima da concentração de 4mg/L e os  $\text{NH}_3/\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  foram mantidos abaixo da concentração de 1,2 mg/L, 3,3 mg/L, 120 mg/L e 2,2 miliequivalentes, respectivamente. Essas qualidades da água foram mensuradas semanalmente com testes colirimétricos SERA<sup>®</sup>. Uma vez



ao meio-dia eram oferecidos 6g de camarão (*Artemia* spp.) para a alimentação dos alevinos de robalo.

### 3.3 BIOENSAIO

Após o período de aclimação, as salinidades foram alteradas para 5psu, 20psu e 35psu. A salinidade intermediária foi determinada como “controle”, pois os peixes provinham desse meio. A partir desse ponto foi definida a menor salinidade a ser experimentada através de um teste de limite de morte. Os juvenis de robalo na salinidade de 0psu obtiveram 90% na taxa de mortalidade após 24 horas, mas em 5psu alcançaram alta taxa de sobrevivência, demonstrando ser um ambiente hiposmótico adequado para experimentos crônicos. A salinidade hiperosmótica foi determinada como aquela em que é encontrada na água marinha, a de 35psu.

Para a diluição da salinidade foi adicionada água de torneira declorificada e filtrada (0psu), e para o acréscimo foi adicionado sal marinho já diluído, para que não houvesse um choque de salinidade. A velocidade de mudança da salinidade foi de 2,5 psu/h. O aquário dos peixes sob 20psu teve a mesma quantia e velocidade de água trocada, porém com mesma concentração de sal. Durante todo o período experimental, o pH, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram mantidos no mesmo nível do período de aclimação através da filtragem constante e da troca semanal de 20% da água total dos aquários.

Após um período de exposição aguda de 6h, 24h, 96h e um crônico de 30 e 60 dias, até 10 peixes foram sacrificados em cada tempo amostral (FIGURA 4). De cada peixe foram retiradas as suas medidas, tamanho e peso, e em seguida as brânquias foram coletadas para análises morfológicas e bioquímicas.

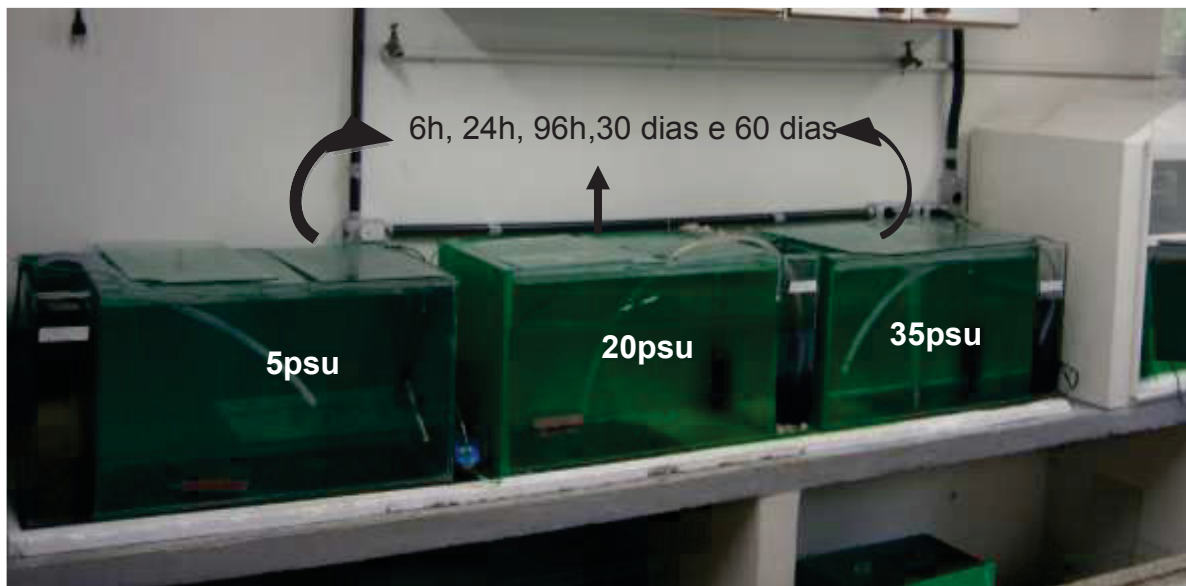


Figura 4- ESQUEMA EXPERIMENTAL.

Após o início do período experimental, nos tempos determinados acima foram amostrados até 10 peixes de cada aquário.

### 3.4 TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO

Após 96 horas do início do experimento, cada peixe foi anestesiado com benzocaína 0,84%. Assim que sob efeito da anestesia, cada indivíduo foi pesado, medido o comprimento total (ct) e o comprimento padrão (cp). Nos tempos de 30 e 60 dias foram tomadas novamente as medidas biométricas, sendo que, os peixes sacrificados nessas etapas para as análises bioquímicas, também foram contabilizados no tempo final do cálculo estatístico. A taxa de crescimento específico foi calculada de acordo com Imstrand et al. (2001) através da fórmula  $SGR = (e^g - 1) \cdot 100$ . Nessa, o valor de  $g$  é igual a  $(\ln(W2) - \ln(W1)) / (t2 - t1)$ , onde  $W2$  é o peso final e  $W1$  o inicial nos tempos  $t2$  e  $t1$ , respectivamente.

### 3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Após secção da medula espinhal, as brânquias do segundo arco branquial esquerdo foram retiradas e fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, 0,2M cacodilato, pH 7,2 durante 24 horas. O material foi

lavado em tampão cacodilato 0,2M (pH 7,2) por três vezes de 10 minutos para a retirada do excesso do fixador. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 2% e tampão cacodilato 0,2M durante o tempo de uma hora para depois ser lavado duas vezes em água destilada, pelo tempo de 10 minutos cada. Para melhor contrastação, as amostras foram imersas em uma solução aquosa de uranila 2% por duas horas, lavado em água destilada em 2 banhos de 10 minutos. O material então foi desidratado com acetona 50%, 70%, 90% e 100% durante 10 minutos cada etapa. Para a inclusão as amostras foram imersas em uma mistura de resina e acetona, na proporção de 1:1 durante o período de uma hora e trinta minutos e 24 horas em resina pura. Em seguida, a resina foi polimerizada a 60°C pelo período de 72 horas. Os cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo foram capturados em uma grade de cobre e contrastados com uranila 5% por vinte minutos e citrato de chumbo por cinco minutos. As imagens foram capturadas pelo microscópio eletrônico JEOL TEM 1200 EXII do centro de microscopia da Universidade Federal do Paraná.

### 3.6 ATIVIDADE $\text{Na}^+, \text{K}^+$ ATPase

Após a secção transversal da medula espinhal imediatamente após a região occipital, as brânquias foram retiradas pela abertura opercular, com exceção dos segundos arcos branquiais. Em seguida, as brânquias foram congeladas e preservadas em nitrogênio líquido até a realização do ensaio bioquímico modificado de McCORMICK, (1993).

Para que houvesse a detecção da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase, foram analisadas em conjunto as brânquias de 3 peixes. Portanto o número amostral variou de quatro a seis conjuntos por tratamento. As brânquias foram descongeladas e homogeneizadas em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão SEI (Sacarose 250mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  10mM, Imidazol 50mM) e 50  $\mu\text{L}$  de SEID (0,1g de ácido desoxicólico adicionado em 33 mL de SEI), utilizando um homogeneizador

para pequenas amostras tipo TURRAX (modelo MA-102/MINI, fabricado pela Marconi) durante 15 segundos. O homogeneizado foi centrifugado em temperatura de 4°C, durante 2 minutos a 5000xg, para remover o material insolúvel, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase.

A atividade da ATPase branquial foi determinada em um sistema de reação contendo tampão Imidazol 50 mM (pH7,5), NaCl 189 mM,  $\text{MgCl}_2$  10,5 mM, LDH 2,86 U/mL, PK 3,57 U/mL, PEP 2 mM, NADH 150  $\mu\text{M}$ , ATP 0,5 mM. A atividade também foi avaliada na presença de ouabaína, adicionada ao sistema de reação para concentração final de 0,5 mM. A reação teve início pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a 200  $\mu\text{L}$  do sistema de reação. A atividade da ATPase foi quantificada em um leitor de microplacas (Versamax -Molecular Devices), através da oxidação do NADH a 340nm.

A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi calculada subtraindo a atividade total (sem ouabaína) da atividade determinada na presença desse glicosídeo. A concentração protéica total das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando soro albumina bovina como padrão.

A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase foi expressa em relação a concentração de proteínas totais presente no sobrenadante dos homogeneizados branquiais (U/mg de proteína). Uma unidade internacional de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de ATP em ADP no tempo de 1 minuto, a 28°C.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para a análise dos resultados biométricos foi utilizada a análise de variância ANOVA. O teste de Tukey foi empregado para o contraste entre os pares de médias. Como não foi possível acompanhar o desenvolvimento individual, a taxa de crescimento específico foi analisada com as médias das duplicatas. Portanto, assim como em Imsland et al. (2001), os resultados foram transformados no  $\text{seno}^{-1}$  para

então ser utilizada a ANOVA e o teste posterior de Tukey.

Cada curva de sobrevivência foi calculada pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank ou Mantel-Cox. A atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase foi analisada através do teste Kruskal-Wallis e comparadas com o teste de Dunn's. Em todos testes a significância estatística foi assumida com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Os três grupos de *Centropomus parallelus* testados iniciaram o experimento sem diferença significativa entre os pesos e comprimentos. No tempo de 30 dias, o grupo em 35psu apresentou maior média de peso do que aquele em 20psu (Tabela 1), mas após 60 dias a diferença já não era mais significativa. Os peixes em 5psu mostraram as maiores médias biométricas finais, diferindo significativamente em relação aos indivíduos controle.

TABELA 1 – MÉDIA DE PESO, COMPRIMENTO TOTAL E PADRÃO

	Salinidade	N	(t0)	N	(t30)	N	(t 60)
<b>Peso (gramas)</b>	5psu	50	0,119±0,037 <sup>a</sup>	25	0,230±0,070 <sup>ab</sup>	10	0,606± 0,235 <sup>a</sup>
	20psu	57	0,137±0,047 <sup>a</sup>	42	0,192±0,065 <sup>b</sup>	18	0,446±0,233 <sup>b</sup>
	35psu	47	0,166±0,062 <sup>a</sup>	31	0,271±0,123 <sup>a</sup>	16	0,524±0,21 <sup>ab</sup>
<b>Comprimento Total (cm)</b>	5psu	50	2,48±0,280 <sup>a</sup>	25	3,04±0,304 <sup>ab</sup>	10	4,11±0,674 <sup>a</sup>
	20psu	57	2,54±0,294 <sup>a</sup>	42	2,82±0,329 <sup>b</sup>	18	3,53±0,559 <sup>b</sup>
	35psu	47	2,71±0,336 <sup>a</sup>	31	3,12±0,408 <sup>a</sup>	16	3,86±0,516 <sup>ab</sup>
<b>Comprimento Padrão (cm)</b>	5psu	50	1,92±0,280 <sup>a</sup>	25	2,304±0,154 <sup>ab</sup>	10	3,26±0,558 <sup>a</sup>
	20psu	57	1,98±0,256 <sup>a</sup>	42	2,23±0,311 <sup>b</sup>	18	2,77±0,483 <sup>b</sup>
	35psu	47	2,11±0,339 <sup>a</sup>	31	2,47±0,340 <sup>a</sup>	16	3,02±0,443 <sup>ab</sup>

A média ( $\pm$ SD) de peso e comprimentos do *C. parallelus* nas salinidades de 5, 20, 35psu, no tempo inicial (t0) e após 30 dias (t30) e 60 dias (t60) do início do experimento. Houve diferença significativa entre os grupos com letras sobrescritas diferentes ( $p < 0,05$ ).

Quando comparamos as médias biométricas em cada grupo ao longo dos tempos, observamos que todos obtiveram aumento significativo em t(30) e t(60).

Contudo, a taxa de crescimento específico do robalo-peva não diferiu significativamente entre os tratamentos (FIGURA 5).

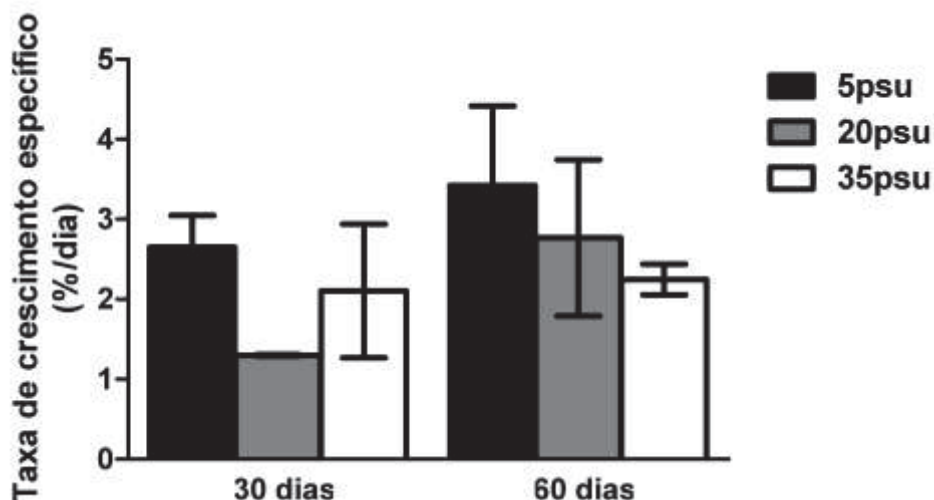


FIGURA 5- TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO. Média de valores ( $\pm$ SEM) da taxa de crescimento específico do peixe *C.parallelus* após 30 e 60 dias experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A taxa de sobrevivência também não foi afetada pela salinidade. A curva de sobrevivência dos indivíduos de robalo-peva (FIGURA 6) mostra a menor porcentagem para o grupo 5psu e a maior para o grupo controle ao final do experimento, porém a diferença não foi significativa.

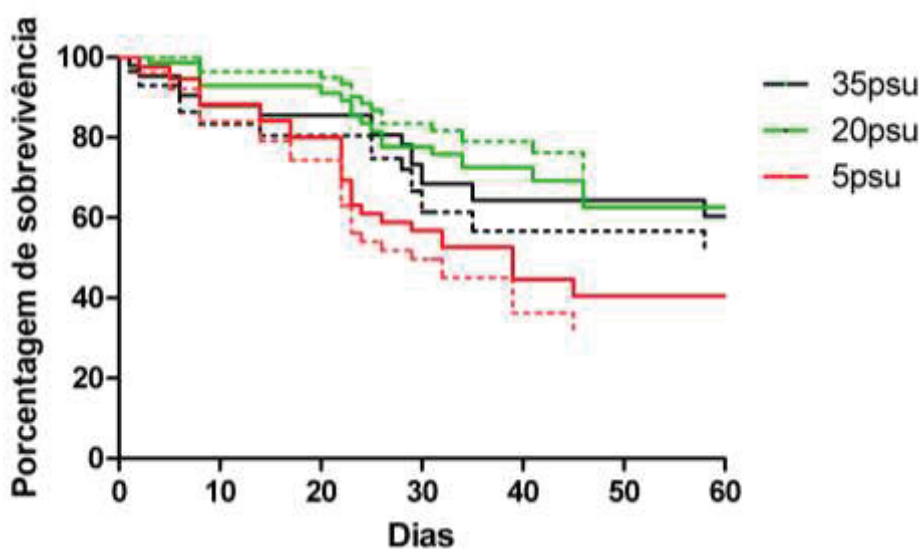
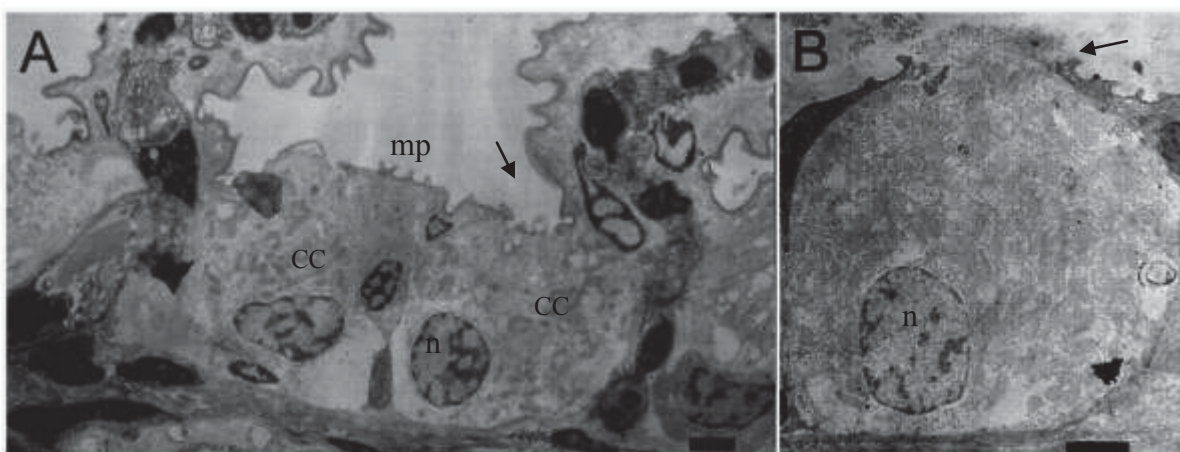


FIGURA 6 - CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE *C.parallelus*. Porcentagem de sobrevivência dos grupos em 5, 20 e 35psu representada pelas linhas contínuas. Linha pontilhada mostra o erro padrão ( $\pm$ SE). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

As células de cloreto podem ser facilmente reconhecidas pela grande quantidade de mitocôndrias na análise de microscopia eletrônica de transmissão. (FIGURA 7). Após 24 horas em 5psu, o número e tamanho de células de cloreto aumentaram visivelmente na região interlamelar (FIGURA 7a). A exposição da membrana apical ao meio externo aumentou, e em alguns casos estava projetada acima do nível das células pavimentosas. Após 96 horas foi possível observar células de cloreto na lamela secundária, e com a membrana apical convexa (FIGURA 7b), onde permaneceram até o último dia experimental. Durante todo o experimento, os peixes em 20psu mostraram poucas células de cloreto, e que estavam restritas à região interlamelar (FIGURA 7c). A membrana apical apresentava-se invaginada, formando uma cripta com abertura menor do que das células de cloreto branquiais dos peixes expostos em 5psu (FIGURA 7d). A quantidade de células de cloreto aumentou levemente após 96 horas nos peixes expostos a 35psu, mas em 60 dias o número era notavelmente superior (FIGURA 7e). Desde as amostras iniciais, a membrana apical apresentou uma profunda cripta e, muitas vezes, aparecia associada à célula acessória (FIGURA 7f).





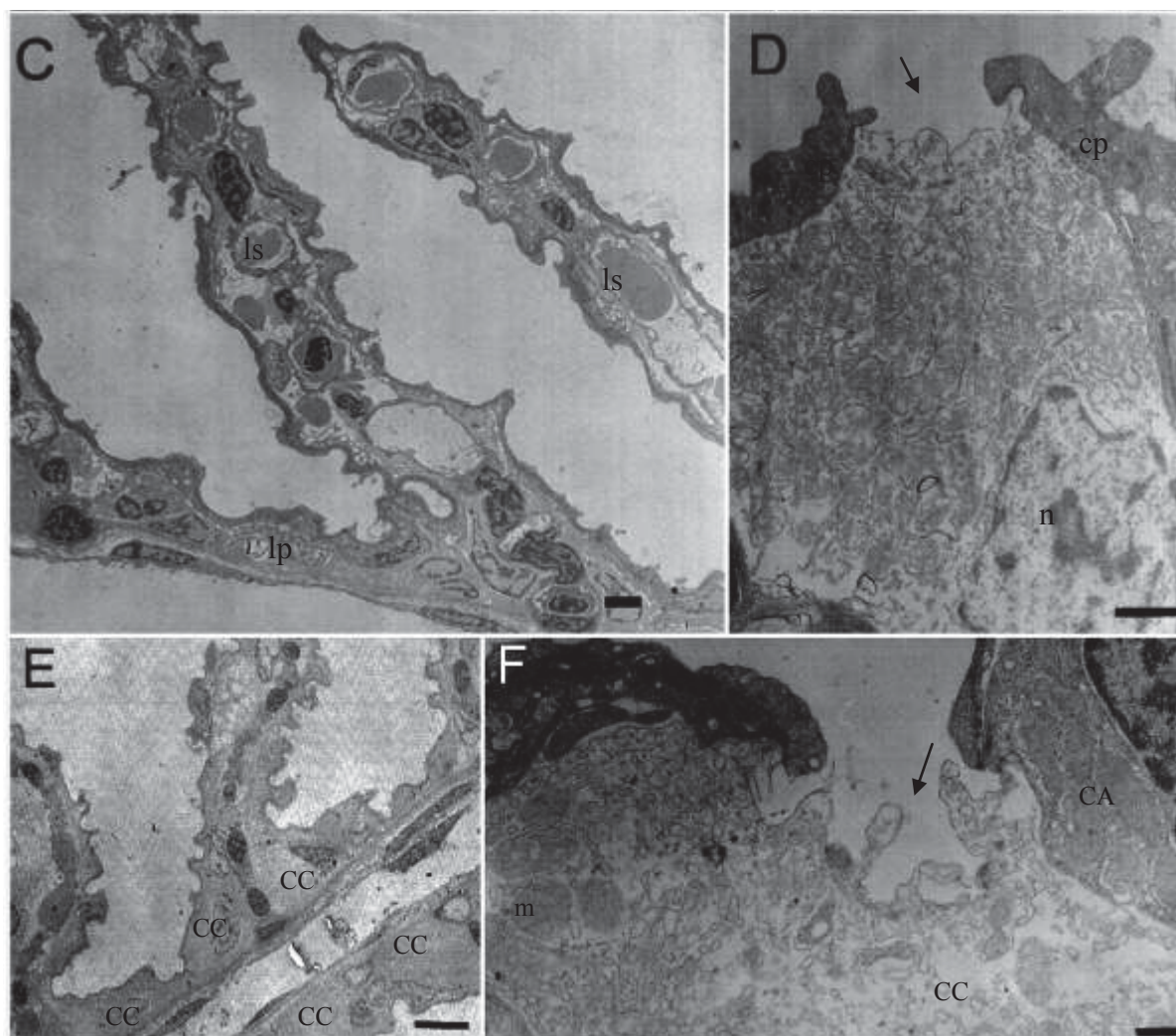


FIGURA 7 – ELETROMICROGRAFIAS DE CÉLULAS DE CLORETO BRANQUIAIS DE *C.parallelus*. Salinidade de 5psu (A-B), 20psu (C-D) e 35psu (E-F). (A) Após 24 horas o número de células de cloreto (CC) aumentou no espaço entre as lamelas secundárias. Observe a extensa abertura apical. Núcleo(n). Micropregas (mp). (B) Escala = 2µm. (B) Uma grande quantidade de células de cloreto com a membrana apical convexa foi observada na lamela secundária após 96 horas. Núcleo (n). Escala = 2 µm. (C) Após 60 dias, a quantidade de células de cloreto manteve-se relativamente constante. Lamela primária.(lp). Lamela secundária (ls). Células pavimentosas (cp).Escala = 2µm. (D) As poucas células de cloreto, que estavam na região interlamelar, apresentavam uma cripta apical pouco profunda (↑). Núcleo (n).Escala = 1µm. (E) Notoriamente, é possível observar o aumento expressivo do número das células de cloreto (CC) em 60 dias de exposição à água marinha. As células se restringiam ao espaço interlamelar. Escala = 5µm. (F) Detalhe da profunda cripta apical com projeções (↑) acompanhada de uma célula acessório (CA) após 24 horas. Mitocôndria (m). Escala = 0.5 µm.

A salinidade influenciou a atividade da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$  ATPase de *C.parallelus* ao longo dos 60 dias (FIGURA 8). Os peixes sob 5psu mostraram aumento significativo em 96 horas. Contudo, em 30 dias retornou ao nível inicial (FIGURA 8a). O grupo controle, 20psu, não obteve diferença significativa durante todo o período experimental (FIGURA 8b).

A alta salinidade sobre os indivíduos em 35psu provocou um aumento gradativo da atividade, diferenciando significativamente em 60 dias (FIGURA 8c). Entre os grupos não foi observada diferença significativa da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase (FIGURA 8).

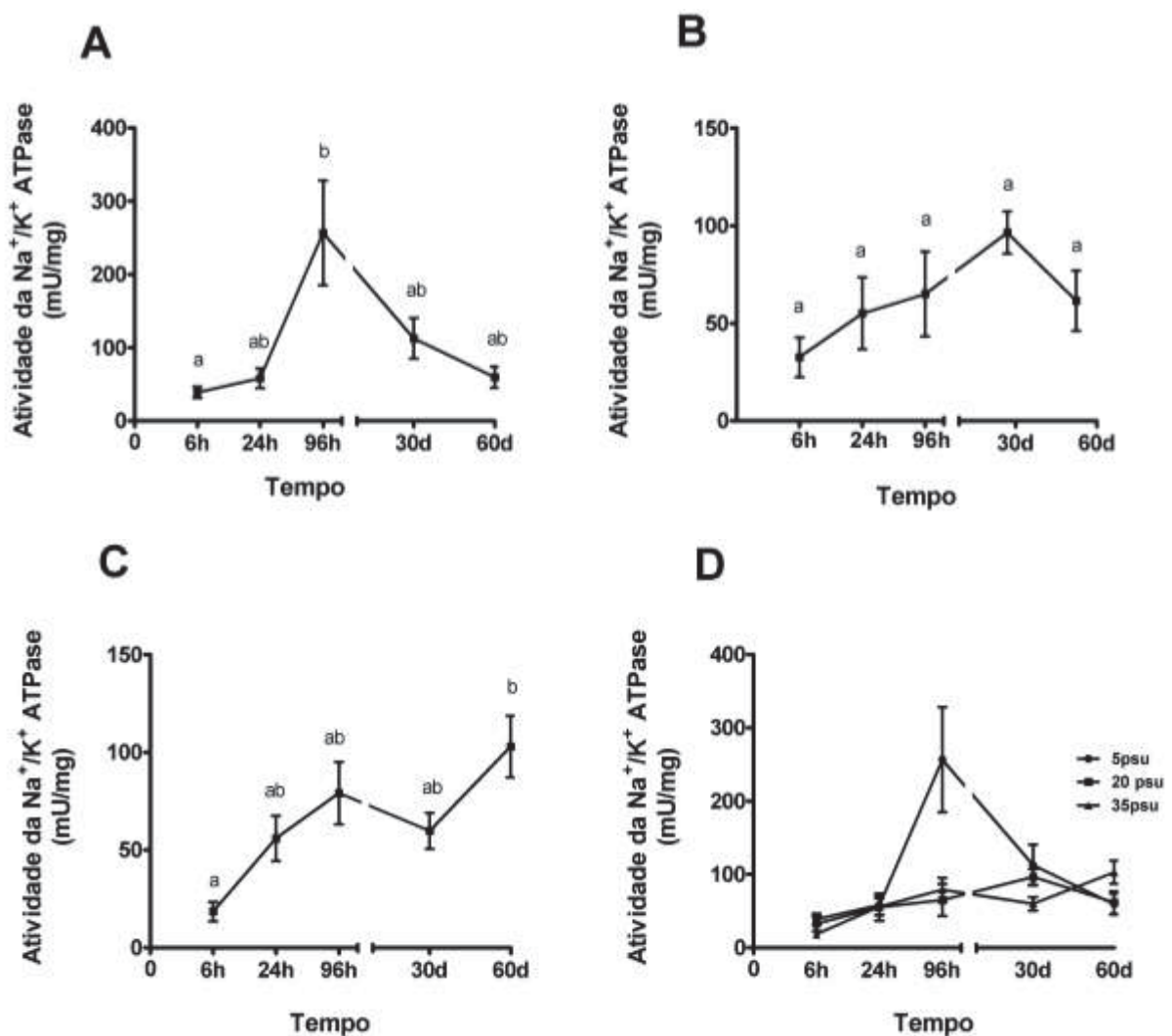


FIGURA 8- ATIVIDADE DA  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase. Média da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase ( $\pm$ SE) dos juvenis de *C. parallelus* durante os 60 dias sob 5psu (A), 20psu (B) e 35psu (C). Por último, (D) mostra todos os grupos sob mesmo gráfico. Não houve diferença nos tratamentos com mesmas letras sobrescritas e entre os grupos em todos os períodos testados ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A curva de sobrevivência mostrou a baixa porcentagem alcançada pelos grupos após 60 dias (FIGURA 6), mas isso se deve, em parte, a filtragem estatística realizada. Na comparação entre os grupos foi necessário avaliar os peixes sacrificados para a análise bioquímica com um tratamento distinto daqueles que supostamente morriam ao longo do experimento devido a salinidade. Dessa maneira, com o número de peixes total menor à medida que alguns indivíduos eram retirados (FIGURA 9), mais influenciada era a curva de sobrevivência. Mesmo assim a comparação foi possível, e após 60 dias a salinidade não apresentou efeitos significativos sobre a taxa de sobrevivência de juvenis de robalo-peva. Contudo a mudança brusca deve ser evitada, visto que a transferência direta de alevinos de 35psu para 0psu mostrou maior mortalidade do que aqueles transferidos para 5, 15 e 35psu (TSUZUKI et al., 2007a).

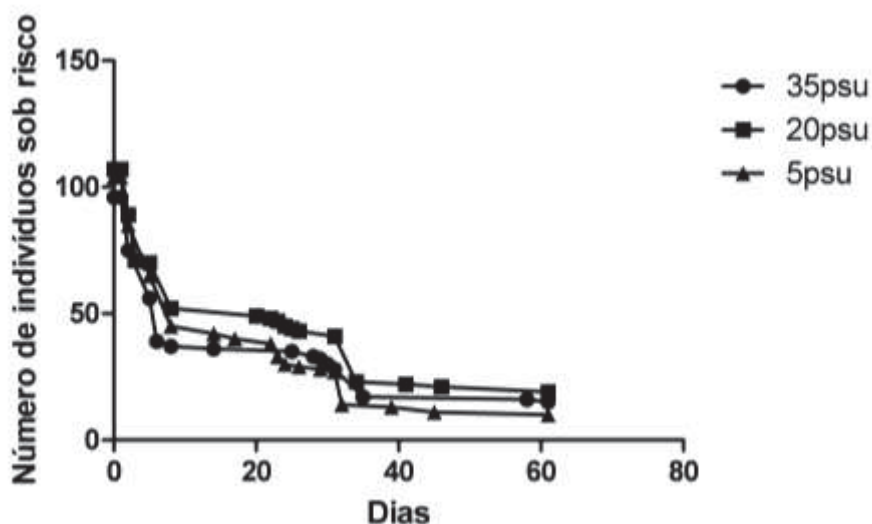


FIGURA 9- NÚMERO DE INDIVÍDUOS TOTAIS DE *C.parallelus* AO LONGO DO TEMPO. Cada ponto mostra a remoção de peixes do experimento, por morte ou sacrifício para as análises bioquímicas.

O crescimento dos peixes pode ser expresso como as mudanças de peso ou tamanho ao longo do tempo. O efeito da salinidade sobre o crescimento dos peixes

teleósteos não é de fácil comparação, pois muitas espécies que apresentam mesmo habitat mostram resultados opostos (QUADRO 2). Até experimentos com as mesmas espécies apontam respostas distintas, e para dificultar ainda mais, muitos estudos desenvolvem esquemas experimentais diferentes (SAOUD et al., 2007).

AUTOR	ESPÉCIE	HABITAT	SALINIDADE (psu)	TEMPO (Dias)
Likongwe et al. (1996)	<i>Oreochromis niloticus</i>	DS	<b>0;8;12;16</b>	56
Sampaio; Bianchini (2002)	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	SM	<b>0;30</b>	90
Peterson et al. (1999)	<i>Micropogonias undulatus</i>	SM	<b>5;20</b>	21
Saoud et al. (2007)	<i>Siganus rivulatus</i>	SM	<b>10;15;20;25;30;35;40</b>	21
Imsland (2001)	<i>Scophthalmus maximus</i>	SM	<b>15;25;33,5</b>	90
Woo;Kelly (1995)	<i>Sparus sarba</i>	SM	<b>7;15;35</b>	60
Laiz-Carrión et al. (2005)	<i>Sparus aurata</i>	SM	<b>6;12;38</b>	100
Resley et al. (2005)	<i>Rachycentron canadum</i> ,	SM	<b>5;15;30</b>	56
Peterson-Curtis (1997)	<i>Trinectes maculatus fasciatus</i>	DSM	0;7;15	60
Rocha et al. (2005)	<i>Centropomus parallelus</i>	DSM	<b>5;20;30</b>	30
Rubio et al. (2005)	<i>Dicentrarchus labrax L.</i>	DSM	0;7;25	114
Alava, (1998)	<i>Chanos chanos</i>	DSM	<b>0;16;34</b>	30
Duston et al. (2007)	<i>Salvelinus alpinus</i>	DSM	<b>0;10;20;30</b>	130
Wuenschel et al. (2004)	<i>Lutjanus griseus</i>	DSM	5;15;25;35;45	12
Wada et al. (2004)	<i>Verasper variegatus</i>	M	<b>1;4;8;16;32</b>	20

#### QUADRO 2 – ESPÉCIES DE PEIXES COM DIFERENTES DESENVOLVIMENTOS

Espécies de peixes com nichos semelhantes, mas com melhor crescimento em salinidades diferentes. O habitat natural pode ser (D) água doce, (S) água salobra e (M) água marinha. A coluna da salinidade mostra as concentrações testadas e em negrito a que proporcionou o melhor crescimento. Quando não destacada a salinidade, a diferença não foi significativa. Coluna do tempo mostra duração de cada experimento.

Embora a comparação entre espécies seja pouco praticável, a maioria dos juvenis de peixes teleósteos apresenta melhor desenvolvimento nas salinidades mais próximas ao meio osmótico interno, entre 8psu e 16psu (BOEUF; PAYAN, 2001; ROCHA et al., 2006). Muitos pesquisadores acreditam que essa salinidade oferece o menor gasto osmorregulatório, permitindo que a energia economizada seja direcionada ao crescimento (BOEUF; PAYAN, 2001, LAIZ-CARRIÓN et al., 2005; TSUZUKI et al. 2007b). Concordando com a maioria das espécies, os indivíduos de *C. parallelus* do presente estudo apontaram melhor desenvolvimento

na salinidade próxima ao meio isosmótico, 5psu. Rocha et al. (2005) e Tsuzuki et al. (2007b) também apontaram essa faixa de salinidade como a mais favorável para o cultivo de robalo-peva.

A taxa de crescimento específico dos espécimes testados no presente trabalho não diferenciou significativamente, mas o grupo em 5psu obteve média de peso e comprimento final maior que os peixes em 20psu. Talvez, uma exposição de tempo maior nessas salinidades promova a distinção significativa entre 5psu e 35psu, visto que muitos estudos (KELLY et al., 1999; ROCHA et al., 2005; DUSTON et al., 2007) somente a constataram em períodos mais prolongados.

O grupo sob 35psu, em 30 dias, obteve média de peso e comprimento maior que o grupo controle (Figura 5), contudo, em 60 dias a diferença já não era mais significativa. Talvez, a mudança de salinidade tenha provocado o melhor desenvolvimento nos primeiros dias do grupo sob água marinha. Peterson-curtis (1999) também observou que a variação de salinidade aumentou o crescimento de *Micropogonias undulatus*. Alguns hormônios podem ser os responsáveis pelo melhor resultado inicial na adaptação à água marinha, como por exemplo, o eixo somatotrópico GH/IGF-I. Esse é apontado pela adaptação de muitas espécies de teleósteos transferidos para ambientes hiperosmóticos, e conseqüentemente, no maior crescimento dessas (BOEUF; PAYAN, 2001; SAKAMOTO; McCORMICK, 2006). Portanto, existe a possibilidade desses hormônios estarem atuando na adaptação e no maior crescimento inicial dos peixes transferidos para 35psu, porém estudos dessa natureza com *C. parallelus* precisam ainda ser realizados.

Além da influência hormonal, o maior crescimento dos peixes teleósteos em algumas salinidades pode ser fruto da menor taxa metabólica padrão, maior ingestão de alimentos e melhor conversão alimentar (BOEUF; PAYAN, 2001). Estudos anteriores com *C. parallelus* mostraram que a salinidade intermediária propiciou melhor desenvolvimento, em parte, devido à melhor digestibilidade, melhor absorção de nutrientes (TSUZUKI et al., 2007b) e maior ingestão de alimentos (ROCHA et al., 2005). Contudo, a relação entre os componentes osmoregulatórios

branquiais, atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase e células de cloreto, com o crescimento de robalo-peva em diferentes salinidades não tinham sido avaliadas ainda.

Dependendo da salinidade ambiental, as células de cloreto branquiais podem assumir diferentes morfologias nos peixes teleósteos. Geralmente, as células de cloreto com a membrana apical formando uma profunda cripta são associadas ao meio hiperosmótico e aquelas que apresentam uma ampla região exposta, são relacionadas a águas hiposmóticas (SAKAMOTO; McCORMICK 2006). Existem evidências que correlacionam esses dois subtipos de células de cloreto a diferentes funções osmoregulatórias, sendo o primeiro mencionado acima envolvido na secreção de sal e o segundo na captação de sal (HWANG; LEE 2007). As células de cloreto branquiais do robalo-peva responderam à salinidade de acordo com a maioria dos peixes teleósteos. Foi possível observar células de cloreto típicas do meio hiposmótico nas brânquias do robalo-peva depois de 24 horas de exposição em 5psu (Fig 3b). Após 96 horas, foram encontradas na base da lamela secundária, assim como foram observadas em diversas espécies de teleósteos transferidas para água doce (PERRY, 1998). O meio hiperosmótico, 20 e 35psu, não promoveu esse subtipo de célula de cloreto nas brânquias do robalo-peva. Esse resultado sugere que as células de cloreto localizadas na lamela secundária com grande abertura apical estão envolvidas na absorção de sal. Além do mais, Fernandes e Perna-Martins (2002) apontaram a maior exposição da membrana apical ao meio externo como uma resposta adaptativa ao meio hiposmótico para o aumento da capacidade de absorver ions.

O grupo controle mostrou durante todo experimento um número estável de células de cloreto com características típicas dos peixes teleósteos no meio hiperosmótico. Contudo, o aumento da salinidade para 35psu provocou notavelmente a proliferação das células de cloreto no espaço interlamelar após 60 dias. A transferência de baixa para altas salinidades também promoveu o aumento das células de cloreto em outras espécies, como na *Anguilla japonica* (WONG et al., 1999), *Fundulus heteroclitus* (LIMA; KÜLTZ, 2004) e *Acipenser naccarii*

(MARTÍNEZ-ÁLVARES et al., 2005). Possivelmente, a adaptação do robalo-peva em longo prazo em águas marinhas requerem um aumento no transporte de íons e, portanto, um aumento da população de células de cloreto branquiais e no custo osmoregulatório.

No presente trabalho, contrários ao grupo controle, os que sofreram mudanças na salinidade tiveram aumento significativo na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase durante o período experimental. O brusco aumento da atividade dos peixes sob 5psu em 96 horas (FIGURA 7a) indicam que a sua função é necessária somente na aclimatação inicial. McCormick and Bradshaw (2006) apontam que algumas alterações na permeabilidade de membrana e transporte iônico podem ocorrer depois de longos períodos em ambientes hiposmóticos, mediada pelo hormônio da prolactina. Possivelmente, a permeabilidade branquial do robalo-peva tenha sido alterada, permitindo a diminuição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase. Assumindo que a atividade dessa enzima seja responsável, pelo menos, a metade dos custos da troca dos íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  em baixas salinidades (KIRSCHNER, 2004), a energia economizada depois de 30 dias em 5psu pode ter ajudado no maior crescimento obtido por esse grupo. Essa hipótese concorda com o trabalho realizado anteriormente pelo grupo Rocha et al. (2005), no qual mostra uma diminuição no consumo de oxigênio após 30 dias em 5psu. Diferentemente, a alta salinidade provocou um contínuo aumento na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase até o último dia experimental. Embora esse aumento não tenha diferenciado significativamente a atividade enzimática entre os grupos, o custo do transporte de íons em 35psu após 60 dias foi significativamente maior do que em 6 horas. Além do mais, Rocha et al. (2005) apontaram a alta salinidade como inapropriada para o cultivo de *C. parallelus* em longos períodos, por causa da alta taxa de O:N desenvolvida por essa espécie em 30psu. Na mesma direção, o robalo-flecha, uma espécie do mesmo gênero, consumiu um substrato energeticamente maior em salinidades mais altas (GRACIA-LÓPEZ et al., 2006).

Em 96 horas, a salinidade de 5psu gerou a maior atividade e consumo de

energia por parte da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase branquial dos juvenis de robalo-peva. Porém, após 30 dias não havia mais diferença significativa. Portanto, o tempo de exposição deve ser levado em consideração na interpretação da atividade da bomba de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  frente à osmorregulação. O tempo também foi levado em consideração por Morgan et al. (1997). Em 96 horas, a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase branquial de *Oreochromis mossambicus* em água marinha foi maior, além de 20% a mais no gasto energético. Contudo, ele observou que as tilápias adaptadas em longo prazo nesse meio podem ter o custo metabólico menor, devido ao antagônico resultado obtido por Ron et al. (1995).

A grande maioria dos recentes estudos que verificam a resposta da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase de peixes em diferentes salinidades observa apenas um ponto temporal (SAMPAIO; BIANCHINI, 2002; ALAM; FRANKEL, 2006; WONG et al., 2006; LEE et al., 2006; INOKUCHI et al., 2008; PARTRIDGE; LYMBERY, 2008). Os poucos estudos publicados que monitoraram o desenvolvimento da resposta em mais de um tempo, focam apenas tempos agudos (MORGAN et al., 1997; HOWLAND et al., 2001; NIU et al., 2008; TIPSMARK et al., 2008) ou crônicos (SAOUD et al., 2007). No caso da espécie *C. parallelus* do presente estudo foram verificados cinco pontos ao longo dos 60 dias. Apenas no último dia experimental a atividade obtida pelos grupos em 5psu e 35psu trocou de posição, e se a tendência de cada grupo continuar, o resultado provavelmente diferenciará significativamente (FIGURA 7d). Deste modo, análises pontuais ou de curta duração sobre a bomba de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  podem levar a errôneas interpretações. Portanto, em longo prazo, a salinidade de 35psu para *C. parallelus* parece ser a menos adequada do ponto de vista osmorregulatório.

Além do tempo experimental, a estrutura do bioensaio também pode interferir no resultado da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase. Morgan et al. (1997), observou a importância do histórico fisiológico de *Oreochromis mossambicus* na adaptação à água doce. Somente quando os indivíduos já possuíam passagem pela água doce, conseguiam suportar a direta transferência do meio hiper para o hiposmótico. Essa



passagem na água doce anterior ao período experimental pode ter ocasionado de alguma forma uma “memorização celular” na tilápia. Estudo recente evidenciando essa idéia ocorreu em Inokuchi et al. (2008). Quando elevada a salinidade da tilápia *O. mossambicus* aclimatada em água doce, foi verificada a presença de células de cloreto hiper e hiposmorregulatórias ao mesmo tempo. Segundo os autores, a configuração celular para ambientes hiposmóticos havia sido preservada para o possível retorno ao ambiente dulcícola. Portanto, o estresse indicado pela elevação da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase em 96 horas pelo *C. parallelus* em 5psu também poderia ter sido evitado com a passagem anterior no ambiente dulcícola.

## 6 CONCLUSÃO

Após 60 dias experimentais, foram constatadas correlações positivas entre a atividade e gasto osmoregulatório da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase e o crescimento de *Centropomus parallelus* do presente estudo. Os indivíduos em 5psu sofreram estímulos que proporcionaram as maiores médias biométricas, podendo a economia da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase em longo prazo ter influenciado no maior crescimento. O aumento contínuo da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase em 35 psu pode ter ocasionado a queda do crescimento em longo prazo. Os animais em 20psu mantiveram a atividade enzimática constante ao longo do experimento, mas a média de peso final foi significativamente menor do que os indivíduos em 5psu. Portanto, com base nos resultados do presente trabalho, os juvenis de *C.parallelus* apresentaram melhor desenvolvimento na salinidade de 5psu.

## REFERÊNCIAS

ALAM, M.; FRANKEL, T.L. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): Effects of environmental salt and ammonia. **Aquaculture**, v. 251, p. 118–133, 2006.

ALAVA, V.R. Effect of salinity, dietary lipid source and level on growth of milkfish (*Chanos chanos*) fry. **Aquaculture**, v. 167, p.229–236, 1998.

ALVES, Jr, T.T.; CERQUEIRA V.R.; Brown, J.A. Early weaning of fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1864) larvae. **Aquaculture**, v. 253, p. 334– 342, 2006.

ARAÚJO, J. de; CERQUEIRA, V.R. Influência da salinidade na incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) **Acta Scientiarum**. Biological Sciences Maringá, v. 27, n. 1, p. 85-89, 2005.

ARTIGAS P.; GADSBY, D.C. Ouabain affinity determining residues lie close to the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump ion pathway. **PNAS**, v.103, p.12613-12618, 2006.

BARROSO, M. V. ; CASTRO, J.C. ; AOKI, P.C.M. ; HELMER, J.L. Valor Nutritivo de Alguns Ingredientes para o Robalo (*Centropomus parallelus*). **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.6, p.2157-2164, 2002.

BJÖRNSSON, T.B.; STEFANSSON, G.V.; BERGE, A.I.; HANSEN, T. STEFANSSON, S.O. Circulating growth hormone levels in Atlantic salmon smolts following seawater transfer: effects of photoperiod regime, salinity, duration of exposure and season. **Aquaculture**, v. 168, p.121-137, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

**BRASIL**, Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da República, 18 de , mar. de 2005.

BROWN, J. A.; COBB, C.S.; FRANKLING, S.C.; Rankin, J.C. Activation of the newly discovered cyclostome renin–angiotensin system in the river lamprey *Lampetra fluviatilis*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 208,p. 223-232, 2005.

BOEUF,G.; PAYAN,P. How should salinity influence fish growth?**Comparative Biochemistry and Physiology Part C**,v. 130, p. 411-423, 2001.

CARVALHO FILHO,A. **Peixes da costa brasileira**. 3ed. São Paulo:Ed. Melru, 1999.

CERQUEIRA, V.R.; BRÜGGER , A.M. Effect of Light Intensity on Initial Survival of Fat Snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) Larvae. **Brazilian archieves of biology and technology**, v. 44, n.4, p. 343 - 349, 2001.

CERQUEIRA, V.R. **Cultivo do Robalo:aspectos da reprodução, larvicultura e engorda**. Florianópolis,2002.

CERQUEIRA, V. R. ; TSUZUKI, M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus* **Fish Physiol Biochem**, v. 35, p.17-28, 2009.

CHAVES,P.T.; BOUCHEREAU,J.L. **Síntese de estudos sobre a pesca artesanal no litoral sul do Paraná e norte de Santa Catarina**. Curitiba: Eletrônica e Impressão, 2006.

CLARKE, W.C.; SAUNDERS, R.L.; McCORMICK, S.D. Smolt Production In: Principles of Salmonid Culture. Barton.**W. Pennel and B.A.** p. 517-567,1996.

COTTON, C.F.; WALKER, R.L.; RECICAR,T.C. Effects of Temperature and Salinity on Growth of Juvenile Black Sea Bass, with Implications for Aquaculture.North American **Journal of Aquaculture**,v. 65,n. 4, p. 330-338, 2003.

DUSTON, J.; ASTATKIE, T.; MURRAY, S.B. Effect of salinity at constant 10°C on grow-out of anadromous *Arctic charr* from Labrador. **Aquaculture** ,v. 273, p. 679–686, 2007.

EL-SAYED,A.F.M.; MANSOUR,C.R.; EZZAT,A.A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 248, p. 187– 196, 2005.

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. **Physiol. Rev.** v. 85, p. 97–177, 2005.

EVANS, D.H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Physiol.** , v. 295, p. 704-713, 2008.

FALLER, L.D. Mechanistic studies of sodium pump. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.476, p.12–21, 2008.

FANTA, E. Behaviour and circadian rhythm of the fish *Bathygobius soporator Valenciennes* (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. **Revta bras. Zool.**, v. 14, n.1, p.221-224, 1997.

FAO, **The states of food insecurity in the world 2006**. Italia, 2006.

FAO, National aquaculture sector overview –Brazil. Disponível em: <[http://www.fao.org/fi/website/SwapLang.do?language=en&page=%2FFIRetrieveAction.do%3Fdom%3Dcountrysector%26xml%3Dnaso\\_brazil.xml#tcN100192](http://www.fao.org/fi/website/SwapLang.do?language=en&page=%2FFIRetrieveAction.do%3Fdom%3Dcountrysector%26xml%3Dnaso_brazil.xml#tcN100192)> Acesso em: 23 mar. 2007.

FERNANDES, M.N., PERNA-MARTINS, S.A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). **Acta Zool.** (Stockholm), v. 83, p. 321–328, 2002.

FROESE, R. ; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: <[www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)> Acesso em : 23 mar. 2007.

GRACIA-LÓPEZ, V., ROSAS-VÁZQUEZ C., BRITO-PÉREZ, R. Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. **Comp. Biochem. Physiol., Part A**, v. 145, p. 340–345, 2006.

GRIFFIN, F.J.; PILLAI, M.C.; VINES, C. A. Effects of salinity on sperm motility, fertilization, and development in the Pacific herring, *Clupea pallasii*. **The Biological Bulletin**, v. 194, p. 25-35, 1998.

GROS, N.; CAMÕES, M.F.; OLIVEIRA, C.; SILVA, M.C.R. Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other water quality parameters. **Journal of Chromatography A**, 2008.

GUNASEKERA,R.M.; DE SILVA,S.S. The amino acid profiles of estuary perch, *Macquaria colonorum*, during early development at different salinities. **Aquatic-Living-Resources**, v.13,n.3,p. 153-162, 2000.

HANDELAND, S.O.; BERGEA, A.; BJORNSSON, B.Th.; STEFANSSON, S.O. Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, smolts in seawater. **Aquaculture**, v.168, p.289–302,1998

HORISBERGER, J.D ; DOUCET, A. Renal Ion-translocating ATPases: The P-type family. In: SELDIN, D.W; GIEBISCH, G. (Ed). **The Kidney: Physiology and Pathophysiology**. 3ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.139-70.

HUTCHINGS, J.A. Collapse and recovery of marine fishes. **Nature**, v. 406, p.882-885,2000.

HOWLAND, K.L.; TONN, W.M.; GOSS,G. Contrasts in the hypo-osmoregulatory abilities of a freshwater and an anadromous population of inconnu. **Journal of Fish Biology**,v. 59, 916–927, 2001.

HWANG,P.P; LEE,T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, n.148 p. 479–497, 2007.

IMSLAND,A.K.; FOSS,A.; GUNNARSSON,S.; BERNTSSEN,M.H.G; FITZGERALD,R.; BONGA,S.W.; HAM,E.; NVDAL, G.; STEFANSSON,S.O. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) **Aquaculture**, v. 198,.p. 353–367,2001.

INOKUCHI,M.; HIROI,J.; WATANABLE,S.;LEE.K.M.; KANEKO,T. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, p. 151–158, 2008.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London,Chapman & Hall, 1994.

JOBLING, M. **Enviromental biology of fishes**. London: Chapaman & Hall, 1995.

KELLY, S.P.; CHOW, I.N.K.; WOO, N.Y.S. Haloplasticity of black seabream (*Mylio macrocephalus*): hypersaline to freshwater acclimation. **J. Exp. Zool.**, v. 283, p. 226–241, 1999.

KIRSCHNER, L.B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **The Journal of Experimental Biology**, n. 207, p.1439-1452, 2004.

KURBEL, S. Are extracellular osmolality and sodium concentration determined by Donnan effects of intracellular protein charges and of pumped sodium? **Journal of Theoretical Biology**, v. 252, p. 769–772, 2008.

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J.M.; RÍO, M.P.M.; SOENGAS, J.L.; MANCERA, J.M. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: implications for osmoregulation and energy metabolism, **Aquaculture**, n.250, p. 849– 861, 2005.

LEE, K.M.; KANEKO, T.; KATOH, F.; AIDA, K. Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment. **General and Comparative Endocrinology**, v.149, p. 285–293, 2006.

LIKONGWE, J.S.; STECKO, T.D.; STAUFFER, J.R.Jr.; CARLINE, R.F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture**, v. 146, p. 37-46, 1996.

LIMA, R.N., KÜLTZ, D. Laser scanning cytometry and tissue microarray analysis of salinity effects on killifish chloride cells. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p.1729-1739, 2004.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. New York: 1987.

MACIEL, J.C. Efeito da salinidade na sobrevivência e no crescimento de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus*. Florianópolis, 2005. 28f. **Dissertação** (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

MARSHALL, W. S.; BRYSON, S. E. Transport Mechanisms of Seawater Teleost Chloride Cells: An Inclusive Model of a Multifunctional Cell. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119(A), n.1, p. 97–106, 1998.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., SANZ, A., GARCIA-GALLEGO, M., DOMEZAIN, A., DOMEZAIN, J., CARMONA, R., OSTOS-GARRIDO, M. DEL VALLE, MORALES, A.E. Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.**v. 141,p. 183 – 190, 2005.

McCORMICK,S.D. Methodos for nonlethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase activity. **Can. j. Fish Aquat. Sci.**, v.50, p.656-658, 1993.

\_\_\_\_\_. Hormonal control of guill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase and chloride cell function. **Fish physiology:Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**, v.14 (Wood,C.M. &Shuttleworth, T. J. eds) , p.285-315. San Diego, Acad.Press.1995.

\_\_\_\_\_. Effects of Growth Hormone and Insulin-like GrowthFactor I on Salinity Tolerance and Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Interaction with Cortisol. **General and Comparative Endocrinology** ,v. 101, p. 3–11,1996.

McCORMICK, S.D; SUNDELL, K.; BJÖRNSSON, B.T., BROWN, C.L.; HIROI, J. Influence of salinity on the localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). **The Journal of Experimental Biology**, v.206, p.4575-4583, 2003.

McCORMICK,S.D.; BRADSHAW,D. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 3-8, 2006.

MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.E. GRAU, G.; IWAMA, GEORGE K. Physiological and Respiratory Responses of the Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to Salinity Acclimation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117A, n. 3, p. 391–398, 1997.

MILLERO,F.; FEISTEL,R.; WRIGHT,D.;McDOUGALL,T. The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale Deep-Sea **Research I**, v. 55, p.50–72, 2008.

NAYLOR,R.L.; GOLDBURG, R.J.; PRIMAVERA, J.H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M.C.M.; CLAY, J.; FOLKE,C.; LUBCHENCO, J.I.; MOONEY, H.; TROELL,M. Effect of aquaculture on world fish supplies.**Nature**, v.405, p. 1017-1024, 2000.

NIGGLI, V.; SIGEL,E. Anticipating antiport in P-type ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**,v. 33,n. 4, 2008.



NIU, C.J.; RUMMER, J.L.; BRAUNER, C.J.; SCHULTE, P.M. Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 2008.

PARKS, S.K.; TRESGUERRES, M.; GOSS, G.G. Theoretical considerations underlying Na<sup>+</sup> uptake mechanisms in freshwater fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 2008.

PARTRIDGE, G.J.; LYMBERY, A.J. The effect of salinity on the requirement for potassium by barramundi (*Lates calcarifer*) in saline groundwater. **Aquaculture**, v. 278, p. 164–170, 2008.

PAULY, D. CHRISTENSEN, V.; DALSGAARD, J.; FROESE, R.; TORRES Jr. F. Fishing Down Marine Food Webs. **Science**, v. 279, February, 1998.

PAULY, D. CHRISTENSEN, V.; GUÉNETTE, S.; PITCHER, T.J.; SUMAILA, U. R.; WALTERS, C. J.; WATSON, R.; ZELLER, D. Towards sustainability in world fisheries. **Nature**, v. 418, p.689-695, 2002.

PAULY, D.; WATSON, R.; ALDER, J. Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, p. 5–12, 2005.

PERRY, S.F. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, v. 119, p. 9–16, 2008.

PETERSON-CURTIS, T.L. Effects of salinity on survival, growth, metabolism, and behavior in juvenile hogchokers, *Trinectes maculatus fasciatus* (Achiridae) **Environmental Biology of Fishes**, v. 49, p. 323–331, 1997.

PITCHER, T. J. Fisheries managed to rebuild ecosystems? Reconstructing the past to salvage the future. **Ecological Applications**, v.11, n. 2, p. 601–617, 2001.

RANDALL, D.J.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: Mecanismos e adaptações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RANKIN, J.C. & JENSEN F.B. **Fish ecophysiology**. London: Chapman & hall, 1993.

REIS, M.A.; CERQUEIRA, V.R. Indução de desova do robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey 1860, com diferentes doses de LHRHa. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 53-59, 2003.

RESLEY, M.J.; WEBB Jr., K.A.; HOLT, G.J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system **Aquaculture**, 2005.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 3 ed. GuanabaraKoogan, 470p, 1996.

RIVAS, L.R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, v.3, p. 579-611, 1986.

ROCHA, A.J.da S.; GOMES, V.; NGAN, P.V.; PASSOS, M.J.de A.C.R.; FURIA, R.R. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 316, p. 157–165, 2005.

RON, B.; SHIMODA, S.K.; IWAMA, G.K.; GRAU, E.G. Relationships among ration, salinity, 17-ethyltestosterone and growth in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture**, v. 135, p. 185–193, 1995.

RUBIO, V.C. SA´NCHEZ-VA´ZQUEZ, F.J. Madrid J.A. Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. **Physiology & Behaviour**, v.85, p. 333-339, 2005.

SAKAMOTO T.; McCORMICK S.D. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 24-30, 2006.

SAMPAIO, L.A.; ARAÚJO, F.G.; OLIVEIRA, I.R.; VERANI, J.R.; DIAS, J.F. MOURA-BRITTO, M. 2001. Piscicultura – mesa redonda. p. 60-67. In: CHAVES, P.T.; VENDEL, A.L. **Reunião técnica sobre ictiologia em estuários**. Curitiba: Cnpq e Fundação Araucária.

SAMPAIO, L. A.; BIANCHINI, A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.269, p.187–196, 2002.

SAOUD, P.; KREYDIYYEH, S.; CHALFOUN, A.; FAKIH, M. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.348, p. 183–190, 2007.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: Adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Ed. Livraria Santos, 600 p, 1996.

SCHMIEGELOW, J.M.M. **O planeta azul: uma introdução às ciências marinhas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

SCOTT, G.R.; SCHULTE, P.M.; WOOD, C.M. Plasticity of osmoregulatory function in the killifish intestine: drinking rates, salt and water transport, and gene expression after freshwater transfer. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 4040–4050, 2006.

SHEPHERD, B.S.; DRENNON, K.; JOHNSON, J.; NICHOLS, J. W.; PLAYLE, R.C.; SINGER, T. D.; VIJAYAN, M.M. Salinity acclimation affects the somatotropic axis in *rainbow trout*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, p.1385–1395, 2005.

SEIFFERT, M.E.B.; CERQUEIRA, V.R.; MADUREIRA, L.A.S. Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during first feeding. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. n. 34, p.645-651, 2001.

TEMPLE, S., CERQUEIRA, V.R., BROWN, J.A. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* poey(1860)). **Aquaculture**, v.233,p.205–217, 2004.

TIPSMARK, C.K; LUCKENBACH, J.A.; MADSEN, S.S., KIILERICH, P. BORSKI, R.J. Osmoregulation and expression of ion transport proteins and putative claudins in the gill of Southern Flounder (*Paralichthys lethostigma*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, n.150, p. 265–273, 2008.

TRESGUERRES, M.; KATOH, F.; SCOTT E. O.; PARKS K.; GOSS, G.G. Chloride Uptake and Base Secretion in Freshwater Fish: A Transepithelial Ion-Transport Metabolon? **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 6, p.981–996, 2006.

TSUZUKI, M.Y.; SUGAI, JK; MACIEL, J.C.; FRANCISCO, C.J.; CERQUEIRA, V.R. Effect of salinity on survival of juveniles of the fat snook, *Centropomus parallelus*

(POEY). : In **I conferencia Latino Americana sobre Cultivo de peces nativos y III Conferencia Mexicana sobre o cultivo de peces Nativos**, 2006. México

TSUZUKI, M.Y.; CERQUEIRA, V.R.; TELES, A.; DONEDA, S. Salinity tolerance of laboratory reared juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n.1, p.1-5, 2007a.

TSUZUKI, M.; SUGAI, J.K.; MACIEL, J.C.; FRANCISCO, CLAIRE, J.; CERQUEIRA, V.R. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. **Aquaculture**, v. 271, n.1-4, p. 319-325, 2007b.

WADA, T.; ARITAKI, M.; TANAKA, M. Effects of low-salinity on the growth and development of spotted halibut *Verasper variegates* in the larva-juvenile transformation period with reference to pituitary prolactin and gill chloride cells responses. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.308, p.113–126, 2004.

WONG, C.K.C., CHAN, D.K.O. Chloride cell subtypes in the gill epithelium of Japanese eel *Anguilla japonica*. **Am. J. Physiol. Regulatory Integr. Comp. Physiol.** V. 277, p. 517-522, 1999.

WONG, M.K.S.; TAKEI, Y.; WOO, N.Y.S. Differential status of the renin–angiotensin system of silver sea bream (*Sparus sarba*) in different salinities. **General and Comparative Endocrinology**, v.149, p.81–89, 2006.

WOO, N.Y.S.; KELLY, S. P. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. **Aquaculture**, v. 135, p. 229-238, 1995.

WUENSCHERL, M.J.; JUGOVICH, A.R.; HARE, J.A. Effect of temperature and salinity on the energetics of juvenile gray snapper (*Lutjanus griseus*): implications for nursery habitat value. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.312, p. 333 – 347, 2004.

YATIME, L.; BUCH-PEDERSEN, MORTEN, J.; MUSGAARD, M.; MORTH, J.P.; WINTHER, A.M.L.; PEDERSEN, B.P.; OLESEN, C.; ANDERSEN, J.P.; VILSEN, B.; SCHIOTT, B.; PALMGREN, M.G.; MOLLER, J.V.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1787, p. 207–220, 2009.