

**SILVIA MARIA MILLAN GUTIERRE**

**FERRAMENTAS FISIOLÓGICAS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
INVASOR DE PEIXES DULCÍCOLAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Área de Concentração em Ecologia e Conservação, do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

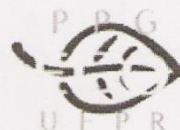
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Viviane Prodocimo

**CURITIBA**

**2011**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



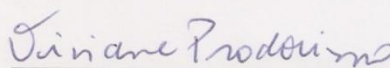
## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Silvia Maria Millan Gutierre** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

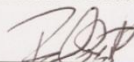
Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 17 de fevereiro de 2011.

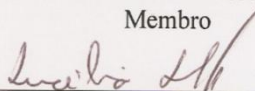
BANCA EXAMINADORA:



Profª. Dra. Viviane Prodocimo  
Orientador e Presidente

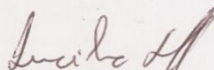


Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto  
Membro



Profª. Dra. Lucélia Donatti  
Membro

Visto:



Profª. Dra. Lucélia Donatti  
Coordenadora do PPG-ECO

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Viviane Prodocimo, por me acolher mesmo sem me conhecer, por me iniciar na fisiologia, na osmorregulação, na ictiologia, nos géis, e tantos outros, possibilitando um crescimento pessoal e um aumento significativo de conhecimentos. Pela paciência, pela dedicação, pelo incentivo e pela confiança!

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Freire por compartilhar o espaço e o conhecimento, e por ter co-orientado direta e indiretamente, todo o trabalho.

Ao Jean por compartilhar o projeto e fazer o serviço sujo. Não haveria trabalho se não fosse sua dedicação aos peixes!

Ao programa de pós graduação em Ecologia, pela oportunidade, formação, pelos colegas e ensinamentos.

À Fundação Boticário, CNPq e CAPES pelo financiamento e pela bolsa.

Aos amigos do LFCO que me acolheram e se tornaram uma família ao longo desses 2 anos. Sem palavras para descrever a sorte de ter entrado nesse laboratório com pessoas fantásticas.

À minha família pela paciência, apoio e confiança!

Aos meus amigos de longa e curta data, pela força, companheirismo e compreensão. Sem eles eu não conseguiria.

A você, por tudo!

*“É surpreendente que as pessoas suponham que não há imaginação em ciência. É um tipo de imaginação muito interessante, diferente da do artista. A grande dificuldade reside em tentar imaginar algo que nunca se viu, que seja consistente em todos os pormenores com o que já se observou e ao mesmo tempo em que seja diferente do que até aí se pensava; mais, terá de ser uma afirmação bem definida, e não apenas uma proposição vaga. É, na verdade, difícil.”* (Richard P. Feynman)

*“Without imagination, even after all these centuries, we’d have learned nothing. Science is imagination.”* (Phil Plait)

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	v
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Osmorregulação .....	12
1.2 Proteínas de Estresse Térmico (HSP) .....	14
1.3 Espécies.....	15
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1 Experimentos de laboratório .....	24
3.2 Expressão de HSP70 por Western Blotting .....	25
3.3 Atividade da Enzima Anidrase Carbônica (AAC).....	26
3.4 Osmolalidade Plasmática .....	26
3.5 Teor Hídrico.....	26
3.6 Análises de dados.....	27
4. RESULTADOS .....	28
4.1 Proteínas de Estresse Térmico (HSP70) .....	28
4.2 Atividade de Anidrase Carbônica (AAC) .....	30
4.3 Osmolalidade .....	33
4.4 Teor Hídrico.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37
5.1 HSP70 .....	37
5.2 Atividade de Anidrase Carbônica (AAC) .....	40
5.3 Osmolalidade e Teor Hídrico .....	43
5.4 Ecofisiologia e Ocupação de Habitats .....	47
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS .....	51

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1 - Filtros Biogeográficos que limitam o movimento de espécies aquáticas.....	11
Figura 2 - Filtros abióticos que interferem no estabelecimento de espécies invasoras.....	11
Figura 3 – Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i> .....	17
Figura 4 – Exemplar de <i>Clarias gariepinus</i> .....	18
Figura 5 – Exemplar de <i>Ictalurus punctatus</i> .....	18
Figura 6 – Exemplar de <i>Geophagus brasiliensis</i> .....	20
Figura 7 – Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	20
Figura 8 – Exemplar de <i>Cyprinus carpio</i> .....	22
Figura 9 – Expressão de HSP70.....	29
Figura 10 – Atividade da enzima Anidrase Carbônica em Brânquias .....	31
Figura 11 – Atividade da enzima Anidrase Carbônica em Rins .....	32
Figura 12 – Osmolalidade do plasma .....	34
Figura 13 – Teor hídrico muscular .....	36
Tabela 1 – Resposta alteração nos níveis de HSP frente a estresse salino.....	41

## RESUMO

Para compreender a resposta dos animais frente a variações ambientais, estudos ecofisiológicos abordam as estratégias de sobrevivência dos organismos, suas tolerâncias a variações físico-químicas e suas adaptações a alterações no meio. Determinando o grau de eurihalidade e a plasticidade fisiológica através da expressão de HSP70 muscular, da atividade da anidrase carbônica (AAC) branquial e renal, da medida da osmolalidade plasmática e do teor hídrico muscular, buscou-se responder como as espécies de os teleósteos dulcícolas nativos *Rhamdia quelen* e *Geophagus brasiliensis* e os invasores *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio* e *Oreochromis niloticus* respondem a aumentos de salinidade de 15‰ e 30‰. Após exposição de 6 horas a essas salinidades verificou-se o potencial invasor das espécies para utilizar os estuários como pontes de dispersão. A salinidade de 30‰ foi letal para as espécies entre 1,5 e 3 horas de exposição, com exceção de *O. niloticus*. As espécies nativas e a invasora *C. gariepinus* aumentaram a expressão de HSP70 com o aumento da salinidade. *I. punctatus*, *O. niloticus* e *C. carpio* mantiveram os níveis de HSP70 constantes. Não houve um padrão na resposta por HSP70, o que demonstra a ação espécie-específica da expressão dessa proteína. A AAC branquial aumentou apenas em 30‰ em *R. quelen*, *C. gariepinus*, *G. brasiliensis* e *C. carpio*, apresentou elevação em 15‰ e 30‰ em *O. niloticus* e se manteve constante em *I. punctatus*. A AAC renal foi elevada apenas em 30‰ para *R. quelen* e *O. niloticus*, em 15‰ e 30‰ para *I. punctatus* e se manteve constante em *C. gariepinus* e *C. carpio*. O aumento da AAC pode ser em função da manutenção osmorregulatória ou do equilíbrio ácido-base. A osmolalidade e o teor hídrico apresentaram um padrão de variação inversamente proporcional entre si na maioria das espécies, com exceção de *G. brasiliensis* e *C. carpio*, indicando uma perda na capacidade regulatória do meio intra e extracelular frente ao aumento na salinidade, acarretando na morte dos animais em salinidade 30‰. De acordo com os resultados, as espécies dulcícolas poderiam utilizar estuários como pontes de dispersão para outros corpos d'água continentais, desde que a salinidade nesses locais não excedesse 15‰. As espécies invasoras demonstraram resistência fisiológica similar ao das espécies nativas, todas apresentando certo grau de eurihalidade.

## ABSTRACT

To understand the response of animals against environmental variations, ecophysiological studies address the survival strategies of organisms, tolerances to physicochemical variations and adaptations to changes in the environment. Determining eurihalinity degree, physiological plasticity through muscle's expression of HSP70, gills and renal activity of carbonic anhydrase (CAA), plasma osmolality and muscle water content, we attempted to answer how the native freshwater teleosts *Rhamdia quelen* and *Geophagus brasiliensis* and the invasive *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* responds to increases in salinity to 15‰ and 30‰. After 6 hours of salinity exposition was verified invasive potential of the species by using estuaries as bridges for dispersal. The salinity of 30‰ (between 1.5 – 3 hours of exposition) was lethal for all species, except *O. niloticus*. The natives species and invasive *C. gariepinus* increased their expression of HSP70 following the salinity increase. *I. punctatus*, *O. niloticus* and *C. carpio* presented constant levels of HSP70. There was no standard response in HSP70, which shows that the action of this protein is species-specific. The gill CAA increased only at 30‰ in *R. quelen*, *C. gariepinus*, *G. brasiliensis* and *C. carpio*, and increased at 15‰ and 30‰ in *O. niloticus* and remained constant in *I. punctatus*. The renal CAA was elevated only at 30 ‰ for *R. quelen* and *O. niloticus*, increased at 15‰ and 30‰ for *I. punctatus* and remained constant in *C. gariepinus* and *C. carpio*. The increase in CAA may be due to the maintenance osmoregulation or acid-base balance. Osmolality and water content showed an inverse pattern of variation to each other in most species, except for *G. brasiliensis* and *C. carpio*, which indicates a loss of the regulatory capacity of the intra and extracellular mediums due to increase in salinity, not surviving at 30‰. According to the results, the freshwater species could use estuaries as scatter bridges to other continental waters, since the salinity at these places did not exceed 15‰. Invasive species showed similar physiological resistance to native species, all showing some degree of eurihalinity.



## 1. INTRODUÇÃO

Estudos ecofisiológicos visam compreender a resposta dos animais frente a variações ambientais, incluindo suas estratégias de sobrevivência, sua tolerância a variações físico-químicas e suas adaptações a alterações no meio (Willmer *et al.* 2005; Schofield e Loftus 2010). A fisiologia, por sua vez, estuda mecanismos a nível celular, tecidual e de órgãos, e esses estudos ajudam a entender o funcionamento do animal como um todo, fazendo inferências como, por exemplo, a sua sobrevivência, crescimento, reprodução, distribuição e alimentação. Abordagens ecofisiológicas integram fisiologia, evolução, ecologia e comportamento, gerando resultados que auxiliam na compreensão de populações, comunidades e ecossistemas, visando responder questões relacionadas à sobrevivência e ao sucesso na ocupação dos habitats (Ricklefes 2003; Willmer *et al.* 2005, Begon *et al.* 2007, Schofield e Loftus 2010).

A distribuição de uma espécie depende fundamentalmente da sua ecologia fisiológica (Willmer *et al.* 2005; Begon *et al.* 2007). Conhecendo locais onde as condições e recursos são ideais para a espécie, podem-se desenvolver estratégias de manejo que ajudam a prever onde uma espécie pode ou não ocorrer, auxiliar em restaurações de ambientes degradados, prever invasão de espécies introduzidas, instruir a conservação de espécies em novas reservas (Begon *et al.* 2007), esclarecer aspectos evolutivos e ajudar a explicar a história de vida do animal (Willmer *et al.* 2005). Os organismos possuem intervalos de condições ambientais (uma faixa ótima) nos quais eles são melhores adaptados e que estão relacionados ao desempenho de suas propriedades fisiológicas e ecológicas (Ricklefes 2003; Begon *et al.* 2007).

Alguns animais, entretanto, conseguem adaptar-se a alterações no ambiente que não condizem exatamente com sua faixa ótima; são organismos que vivem em ambientes muito instáveis, como estuários e costões rochosos que sofrem ação diária das marés, ou locais onde há períodos de frio ou calor muito intensos, dentre outras variações ambientais (Ricklefes 2003; Willmer *et al.* 2005; Begon *et al.* 2007). Manter-se em locais onde as condições abióticas estão dentro da faixa ideal para sobrevivência significa atingir um ponto ótimo de funcionamento das atividades biológicas, promovendo maior eficácia metabólica, reprodutiva e imunológica. Quaisquer alterações nessas condições que se aproximem ou ultrapassem os

limites de tolerância afetam drasticamente a subsistência do animal (Schmidt-Nielsen 2002; Begon *et al.* 2007; Pough *et al.* 2008).

Uma das principais abordagens dos estudos ecológicos, quando se fala em distribuição de espécies, é a questão das bioinvasões, considerada a segunda maior causa de perda de biodiversidade do planeta (Neville e Murphy 2001) e um dos principais problemas para a conservação de peixes de água doce, especialmente em países como o Brasil cuja piscicultura, pesca esportiva e recreativa são baseadas em espécies introduzidas (Cowx 2002; Casal 2006; Agostinho *et al.* 2007; Vitule 2008; Vitule *et al.* 2009).

Os impactos causados pelas espécies invasoras podem ser econômicos, ambientais e sociais. Nas comunidades de peixes, as espécies invasoras podem causar colapsos ecológicos e comerciais, devido à predação e à competição, o que diminui as populações de espécies nativas, causando diminuição na produção ou até mesmo, em casos extremos, o extermínio de espécies. Geralmente as espécies introduzidas não possuem predadores naturais na área invadida, por isso suas chances de prevalência no ambiente são grandes (Fuller *et al.* 1999; Elvira 2001; Jackson e Mandrak 2002; Espínola e Júlio 2007). Além disso, juntamente com as espécies exóticas podem vir parasitas que dizimam as populações locais que não estavam adaptadas às doenças trazidas de outro ambiente. Outro impacto das espécies invasoras é a alteração dos habitats, mudando os padrões da cadeia do local, afetando diretamente as espécies nativas. A hibridização também afeta negativamente o ecossistema invadido, causando homogeneização biótica e até extinção de espécies (Ruiz *et al.* 1997; Fuller *et al.* 1999; Mack *et al.* 2000; Elvira 2001; Lee e Chapman 2001; Rahel 2002; Espínola e Júlio 2007).

Para uma espécie ser bem sucedida na invasão de um novo habitat ela depende de alguns fatores, tais como as características do novo ambiente e uma plasticidade ecofisiológica que possibilite a sobrevivência em um meio diferente do seu nativo (Espínola e Júlio 2007). Conhecer a história de vida do organismo, a exemplo de sua capacidade de rápida reprodução e sua integração com demais espécies, oferece ferramentas que auxiliam na compreensão do sucesso das espécies invasoras (Wootton 1998; Kolar e Lodge 2000). Características genéticas também podem ser responsáveis por uma grande plasticidade fenotípica (Sakai *et al.* 2001), e atributos ecológicos agem como facilitadores para uma flexibilidade que garante êxito na conquista de novos ambientes (Espínola e Júlio 2007). As adaptações consequentes da filogenia, da biologia e da fisiologia dos organismos explicam as amplas tolerâncias a variações bióticas e abióticas das espécies com grande potencial de

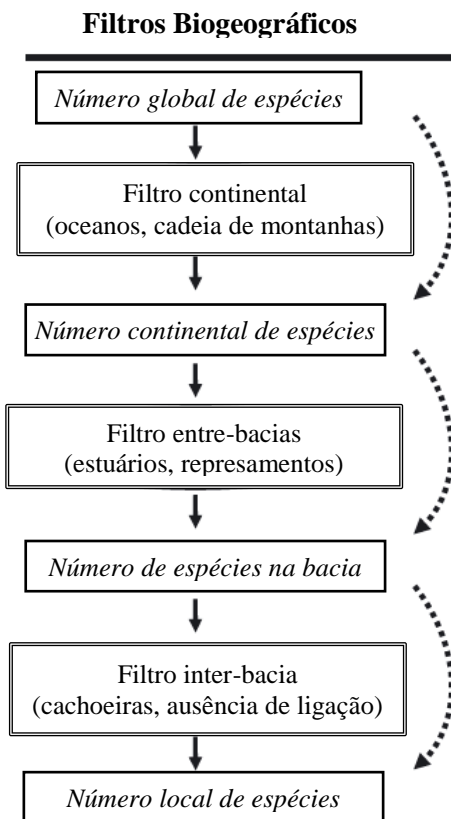
invasibilidade (Baltz e Moyle 1993; Rejmánek e Richardson 1996; Kolar e Lodge 2002; Thompson e Townsend 2006; Townsend 2007).

Quando há uma introdução, geralmente pouco se sabe sobre a biologia e a ecologia da espécie em questão. Estudos ecofisiológicos, por sua vez, podem determinar as tolerâncias ambientais do organismo a fim de detectar seu potencial de dispersão, avaliando se as barreiras naturais podem ou não servir como limitantes de uma invasão biológica (Schofield e Loftus 2010). Essas barreiras, ou “filtros ecológicos”, podem ser tanto limitações biogeográficas (Rahel 2007), quanto parâmetros físico-químicos do ambiente (Rahel e Olden 2008).

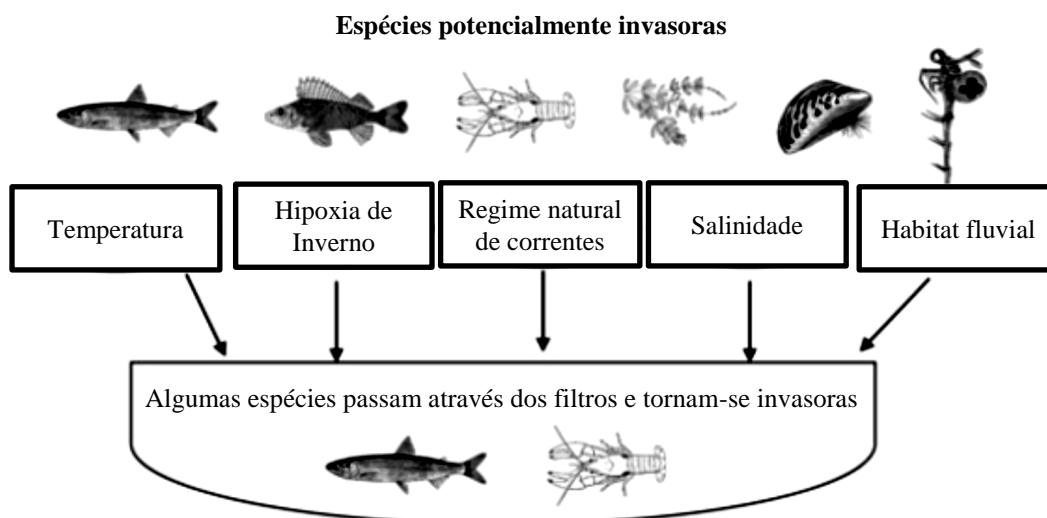
As barreiras biogeográficas indicam onde o animal consegue colonizar, e se tratando do ambiente aquático, podem ser de escala continental (oceanos), entre-bacias e inter-bacias (Fig. 1) (Rahel 2007). A nível entre-bacias, os peixes de água doce podem se movimentar através da água salgada ao longo do litoral por meio de estuários e colonizar bacias adjacentes. Esses estuários funcionariam como pontes para novas invasões, visto que a comunicação dos rios com o ambiente marinho/estuarino proporciona uma via potencial para dispersão e invasão entre bacias hidrográficas litorâneas adjacentes (Rahel 2007, Vitule 2008).

Os filtros abióticos são parâmetros físico-químicos tais como salinidade, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, regime de correntes, pH, entre outros, que determinam as características de certo um ambiente e servem como barreiras contra a invasão por espécies introduzidas (Rahel e Olden 2008). Essas variáveis podem ser limitantes para invasões funcionando como filtros, porém podem ser favoráveis para seleção de espécies invasoras fisiologicamente mais robustas (Fig. 2).

Estudos da fisiologia das espécies, com a finalidade de determinar a tolerância à salinidade e a capacidade de aclimação a diferentes ambientes, auxiliam na compreensão da dispersão de peixes dulcícolas via água salgada, através da superação de barreiras geográficas, como é o caso de estuários, podem se tornar uma abordagem importante no contexto das invasões biológicas, partindo da compreensão da função dos filtros ecológicos na conquista de novos ambientes (Brown *et al.* 2007, Rahel e Olden 2008).



**Figura 1** - Filtros Biogeográficos que limitam o movimento de espécies aquáticas. Em maior escala, oceanos e cadeias montanhosas previnem o movimento das espécies entre os continentes. Em escala regional, o movimento entre-bacias é limitado por estuários e pelo represamento dos rios. Dentro da bacia a dispersão dos organismos é limitada por cachoeiras e a não conexão entre lagos e lagoas. (Modificado de Rahel 2007).



**Figura 2** - Filtros abióticos que interferem no estabelecimento de espécies invasoras. (Modificado de Rahel e Olden 2008).

## 1.1 Osmorregulação

Para manter a concentração osmótica e iônica dos fluidos corporais independentemente do meio externo a fim de garantir a homeostase, os animais utilizam mecanismos fisiológicos de osmorregulação ou regulação osmo-iônica, processo esse essencial para sobrevivência espécie (Schmidt-Nielsen 2002; Marshall e Grosell 2005; Evans e Claiborne 2009).

Em diferentes ambientes os mecanismos de regulação osmótica são condizentes com as necessidades do animal. No meio aquático há ambientes com concentrações diferenciadas de sais dissolvidos (água doce, salgada ou salobra), e a influência do ambiente reflete nas diferentes respostas adaptativas dos animais (Schmidt-Nielsen 2002; Willmer *et al.* 2005). De acordo com a osmolalidade dos fluidos corporais em comparação com o ambiente, os animais podem ser classificados como osmoconformadores ou osmorreguladores. Os conformadores tem a concentração osmótica do seu líquido extracelular (LEC) alterada de acordo com a variação de osmolalidade do ambiente, mantendo-se isosmóticos em relação ao meio. Os animais reguladores mantém a concentração osmótica do LEC praticamente constante, independentemente das variações do ambiente, regulando a osmolalidade através de processos com gasto de energia (Schmidt-Nielsen 2002; Bradley 2009; Evans e Claiborne 2009).

Os peixes teleósteos mantêm sua concentração osmótica em torno de 1/4 a 1/3 da concentração da água do mar. As espécies dulcícolas são osmorreguladoras hiper-osmóticas, apresentando osmolalidade do LEC maior que a do ambiente (230-330 mOsm/kg.H<sub>2</sub>O). As espécies marinhas por sua vez, são osmorreguladoras hipo-osmóticas, apresentando a osmolalidade do LEC (370-480 mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) menor que a do ambiente (água do mar), que possui osmolalidade de ~1000 mOsm/kg.H<sub>2</sub>O. As espécies de peixes estuarinos têm capacidade osmorregulatória variável, hiper ou hipo-regulando as concentrações osmóticas do plasma de acordo com as variações diárias de salinidade, possibilitando sua sobrevivência em ambientes tanto mais salinos, quanto mais diluídos que seu meio interno (Jobling 1995; Evans *et al.* 1999; Schmidt-Nielsen 2002; Marshall e Grosell 2005; Bradley 2009; Evans e Claiborne 2009).

Para regular as concentrações de sal do meio interno, peixes de água doce precisam de mecanismos que evitem a entrada excessiva de água e maximizem a captação de íons. Apesar de não possuírem uma superfície corpórea muito permeável, o que auxilia a prevenção da entrada de água, as brânquias dos teleósteos são permeáveis à água, aos íons, ao oxigênio e ao dióxido de carbono, sendo assim, grande parte das trocas iônicas ocorrem na superfície

branquial. O excesso de água é eliminado através da formação de urina hipo-osmótica bem diluída e os sais também são obtidos através da alimentação e pela captação por células branquiais chamadas de células de cloreto ou células ricas em mitocôndrias, que fazem o transporte ativo de íons (Schmidt-Nielsen 2002; Bradley 2009; Evans e Claiborne 2009).

Peixes marinhos também possuem a superfície corporal quase impermeável, então os movimentos iônicos ocorrem essencialmente pelas brânquias. Esses animais precisam evitar a perda de água e a captação excessiva de íons do meio mais concentrado; para tal formam uma urina isosmótica, bebem água do mar para absorção da água, e o excesso de sal é secretado ativamente pelas células de cloreto nas brânquias (Willmer *et al.* 2005; Bradley 2009; Evans e Claiborne 2009).

As concentrações osmóticas do plasma indicam a capacidade de regular e manter estável a osmolalidade do meio extracelular (Jobling 1995; Prodocimo e Freire 2001, 2004, 2006; Prodocimo *et al.* 2007; Evans e Claiborne 2009). Concomitante às concentrações iônicas e osmóticas plasmáticas, um forte indicador do estresse osmótico imposto às células e tecidos de teleósteos eurihalinos marinhos ou dulcícolas é o conteúdo de água nos tecidos musculares quando as espécies são submetidas a ambientes hiper-osmóticos ou hipo-osmóticos. O conteúdo de água apresenta-se inversamente relacionado com a osmolalidade dos líquidos corporais, refletindo a resposta osmótica do plasma à variação de salinidade do ambiente (Jensen *et al.* 1998; Kelly e Woo 1999; Claireaux e Audet 2000; Sakamoto *et al.* 2001; Prodocimo e Freire 2006; Freire *et al.* 2008; Prodocimo *et al.* 2008).

A enzima anidrase carbônica tem papel essencial no equilíbrio ácido-básico e nos mecanismos osmorregulatórios por realizar catálise da reação de hidratação do CO<sub>2</sub> ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) (Lionetto *et al.* 1998; Evans *et al.* 2005; Swenson 2003; Souza-Bastos e Freire 2009). É também uma enzima essencial para absorção de sal em ambientes dulcícolas ou estuarinos, contribuindo para a regulação osmo-iônica de peixes. Nas brânquias, os íons gerados pela hidratação do CO<sub>2</sub> catalisada pela enzima são utilizados para geração de gradiente eletroquímico, então H<sup>+</sup> e o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> são trocados por Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, através da bomba de H<sup>+</sup> e do trocador Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Perry e Laurent 1990; Henry e Swenson 2000; Evans *et al.* 2005; Georgalis *et al.* 2006). Nos rins, têm papel na regulação ácido-base, auxiliando na reabsorção do HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Perry *et al.* 2003).

A atividade e a expressão dessa proteína podem ser controladas por fatores ambientais como, por exemplo, a variação na salinidade do ambiente. Para uma espécie de teleósteo poder ocupar determinado ambiente (água doce, estuário ou água do mar) precisa ativar seus

mecanismos fisiológicos para manutenção da homeostase e garantir sua sobrevivência (Willmer *et al.* 2005). Estudos sobre osmorregulação e avaliação dos processos fisiológicos em geral são importantes para compreender aspectos filogenéticos, biológicos e ecológicos, auxiliando na inferência sobre a distribuição das espécies, na predição da invasão de novos habitats, na análise de risco da conquista de ambientes através de estuários e na definição do nicho ocupado pelas espécies (Willmer *et al.* 2005, Begon *et al.* 2007).

### **1.2 Proteínas de Estresse Térmico (HSP)**

A nível celular, uma variedade de estressores resulta na expressão da classe de proteínas altamente conservadas conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein) (Fink 1999; Smith *et al.* 1999; Dahlhoff 2004; Stewart 2005). As proteínas de choque térmico desempenham um papel importante na manutenção da homeostase (Ackerman *et al.* 2000).

A função da maioria das HSPs está envolvida no dobramento e união de proteínas celulares nativas. Sob condições de estresse, as HSP atuam de forma a impedir a desnaturação ou agregação das proteínas citoplasmáticas (Fink 1999; Place e Hofmann 2001; Dahlhoff 2004; Hofmann 2005), além de migrarem até o núcleo da célula reparando e protegendo as proteínas nucleares, minimizando sua agregação e prevenindo danos genéticos (Bensaude *et al.* 1990; Ohtsuka e Hata 2000). Embora as HSPs possuam uma meia vida relativamente curta, o aumento nos níveis celulares no momento do estresse, e a manutenção da expressão mesmo após um longo tempo que o estressor já tenha sido removido, possui finalidade de proteger os organismos frente a estresses subsequentes (Ciavarrá e Simeone 1990; Hightower 1991; Basu *et al.* 2002).

O fato das HSPs serem induzidas por diversos tipos de estressores, como alterações na temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e metais contaminantes (Feder e Hofmann 1999; Hightower 1991; Iwama *et al.* 1999; Iwama *et al.* 2004), e de serem as proteínas de defesa mais comumente induzida em respostas a condições fisiológicas sub-ótimas, fez com que o nome “Proteínas de Choque Térmico” fosse substituído por “Proteína de Estresse”, como termo mais geral que abrange melhor sua amplitude de ação (Ackerman *et al.* 2000).

Dentre as famílias de HSPs, divididas de acordo com o peso molecular, a das HSP70 (70 kDa) é a mais comumente utilizada como biomarcador devido ao seu aumento rápido e significativo frente uma gama de estressores (Jonsson *et al.* 2006). Muitos estudos confirmam que a família das HSP70 está envolvida com a adaptação de animais aquáticos a condições

adversas (Schlesinger 1990; Sanders 1993; Feder e Hofmann 1999; Deane *et al.* 2002; Heredia-Middleton 2008; Wang *et al.* 2007; Yang *et al.* 2009).

A resposta ao choque térmico (HSR ou Heat-Shock Response) medida através da atividade ou expressão de HSPs contribui para determinação dos limites de tolerância dos organismos (Tomanek 2008). A indução dos genes de HSP é influenciada pela história das condições ambientais do local, pelos ciclos sazonais, por zonação vertical e pela biogeografia (Basu *et al.* 2002; Nakano e Iwama 2002; Somero 2002; Hofmann 2005). Estudos indicam que a expressão e indução de HSPs dependem de variáveis como a duração do estresse (Efremova *et al.* 2002) e do tipo de tecido utilizado (Cara *et al.* 2005; Wang *et al.* 2007).

A atuação das HSPs em mecanismos de osmorregulação está ligada à proteção contra o efeito desnaturante em proteínas, frente ao aumento da salinidade/força-iônica dos líquidos biológicos (Willmer *et al.* 2005). Poucos trabalhos sobre HSP focam o efeito das alterações de salinidade em peixes. Alguns desses estudos, por exemplo, demonstraram que não há alterações na expressão de HSP frente a choque hiper e hipo-salino nas espécies *Gillichthys mirabilis* (Kültz 1996), *Sparus sarba* (Deane e Woo 2004) e *Oreochromis mossambicus* (Tang 2009), entretanto, outros demonstram a elevação da expressão frente ao estresse salino hiper-osmótico em *Cyprinus carpio* (De Wachter *et al.* 1998), *Salmo solar* (Smith *et al.* 1999), *Oncorhynchus tshawytscha* (Palmisano *et al.* 2000), *Mylio macrocephalus* (Deane *et al.* 2002).

Os estudos indicam que a expressão das HSPs parece ser espécie-específica, não havendo um padrão definido para os peixes ou demais organismos. Porém o emprego da análise dessas proteínas é bastante relevante na compreensão dos limites de tolerância, da distribuição e das respostas ao estresse nos organismos, avaliando suas respostas a ambientes instáveis, a alterações antrópicas, ou a alterações abióticas drásticas.

### 1.3 Espécies

Espécies peixes invasoras como *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio* tem sido frequentemente pescadas e relacionadas como causadoras de impactos ecológicos na região do Rio Guaraguaçu, em Paranaguá (PR), e que espécies nativas como *Rhamdia quelen* e *Geophagus brasiliensis* estão apresentando abundância gradativamente reduzida, tendo seu nicho alterado (Vitule 2008; Vitule *et al.* 2006, 2008). Com base nessas informações, viu-se a necessidade de estudar a fisiologia



dessas espécies para determinar a plasticidade fisiológica das mesmas, visando à determinação da capacidade de bioinvasão nesse ecossistema.

As espécies citadas acima foram utilizadas neste trabalho. Pertencem a três ordens de peixes teleósteos: Siluriformes, Perciformes e Cypriniformes, cada uma possuindo características ecológicas e fisiológicas distintas.

Os peixes da ordem Siluriformes estão distribuídos por quase todos os continentes (Nelson 2006). As características que definem o grupo são a presença de uma bexiga natatória achatada, ausência de escamas, dentes geralmente em placas dentigeras, presença de acúleos nas nadadeiras dorsal e peitoral (Britski *et al.* 1999), ausência dos ossos simpletico, subopercular e intermuscular (Froese e Pauly 2010). Alguns exemplares da ordem apresentam barbilhões característicos na cabeça (Froese e Pauly 2010). A ordem Siluriformes é monofilética, devido a complexas sinapomorfias anatômicas (Fink e Fink 1981), são de origem primária em água doce (Carroll 1988, Freire *et al.* 2008), e atualmente apenas indivíduos de duas famílias, ou cerca de 117 espécies, são considerados marinhos, todas as mais de 2.750 outras espécies são de água doce ou salobra (Nelson 2006). As espécies da ordem Siluriformes estudadas neste trabalho foram *Rhamdia quelen* (nativa), *Clarias gariepinus* e *Ictalurus punctatus* (introduzidas e invasoras).

*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824) (Siluriformes: Heptapteridae), ou jundiá (Fig. 3), tem distribuição do sudeste do México até a região sul da Argentina (Bockmann e Guazzeli 2003). Suporta bem os climas subtropical e temperado (Borges *et al.* 2005), possui hábitos noturnos, vivendo principalmente em fundos e locais calmos. Possui porte médio, atingindo cerca de 50 cm de comprimento e podendo chegar a 3 kg. Alimentam-se de crustáceos, insetos, gramíneas (Carneiro e Mikos 2005) e atingem a maturidade sexual no primeiro ano de vida (Borges *et al.* 2005). Essa espécie é de água doce, podendo ocorrer ocasionalmente em regiões estuarinas, como os estuários de rios dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, onde a salinidade varia entre de 5‰ e 13‰ (Loebmann e Vieira 2006; Milani e Fontoura 2007; Vargas e Bessonart 2007; Vitule 2007). Quando submetida a estresse salino, a espécie pode suportar salinidades de 5‰, 15‰ e 25‰ durante uma hora, porém registraram-se alterações funcionais e fisiológicas durante o tempo de exposição, implicando na redução da capacidade de manutenção da homeostase (Souza-Bastos e Freire 2009).

No Brasil é uma espécie de interesse econômico, utilizada em viveiros de piscicultura, por se adaptar a diversos habitats e dietas, possuir fácil manejo e criação, pela alta taxa de fertilização e crescimento e por ter uma carne bem aceita no mercado (Camargo *et al.* 2005;

Borges *et al.* 2005; Vieira *et al.* 2006). Sendo uma espécie nativa da região sul do Brasil, tem sido divulgada como alternativa para a substituição das culturas de espécies exóticas como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Schulz e Leuchtenberger 2006).



**Figura 3** – Exemplar de *Rhamdia quelen* (foto: Leo Nico 2011)

*Clarias gariepinus* (Burchel 1822) (Siluriformes: Clariidae), conhecida como bagre-africano (Fig. 4), tem distribuição natural no continente africano e partes da Ásia (Teugels 1986; De Graaf e Janssen 1996). Indivíduos dessa espécie têm uma alimentação bem variada, desde plâncton, artrópodes, moluscos, vegetais, até vertebrados como peixes, répteis e anfíbios (Yalçin *et al.* 2001). A espécie tem grande resistência a doenças e é importante comercialmente em pesca artesanal e criadouros (De Graaf e Janssen 1996; Orsi e Agostinho 1999; Vitule *et al.* 2006). Espécie de água doce, que apresenta capacidade de se portar como anfíbio, possuindo pseudopulmões que permitem a espécie percorrer longos trajetos fora d'água (Donnelly 1973) e por isso possui certas vantagens adaptativas (Kruitwagen 2007) como, por exemplo, maior acesso a recursos alimentares, inacessíveis a espécies nativas da região estudada (Vitule 2008). Além disso, outra vantagem em relação a espécies nativas é seu porte robusto, podendo alcançar até 1,70 metros de comprimento total, sendo considerado um predador de topo de cadeia (Vitule *et al.* 2008; Froese e Pauly 2010).

Sua introdução no Brasil ocorreu aproximadamente em 1986 (Agostinho *et al.* 2007). No Paraná, devido a pouca aceitação da carne, a alternativa de lucro foi à utilização em “pesque-pagues”, de onde a falta de aparatos de contenção e manutenção irregular levaram à contaminação ambiental, causando sérios danos às espécies nativas e ao ecossistema das áreas invadidas. Por ter sido constatada como a primeira espécie introduzida na bacia do rio Guaraguaçu, foi foco de muitos trabalhos sobre invasões na região (Vitule *et al.* 2006, 2008).



**Figura 4** – Exemplar de *Clarias gariepinus* (foto: Balaram Mahalder)

*Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818) (Siluriformes: Ictaluridae) espécie nativa dos Estados Unidos, sul do Canadá e norte do México, conhecido como bagre-do-canal ou “catfish”. Habita rios e estuários, sendo cultivada comercialmente para fins de aquicultura. Os indivíduos apresentam porte elevado em relação a espécies nativas dos rios da Floresta Atlântica, com até 1,30 metros e 26 kg, além de ser considerada uma espécie onívora e muito voraz (Froese e Pauly 2010). Colonizam ambientes de água doce, como trechos da bacia do rio Guaraguaçu, predominando nos setores intermediários, mais lânticos e menos conservados (Vitule 2008). Possui amplo registro de ocorrências em estuários e rios litorâneos de regiões temperadas e subtropicais (Townsend e Winterbourn 1992; Fuller *et al.* 1999; Froese e Pauly 2010). Estudos citam seu limite de tolerância à salinidade variando de 0 a 15‰ (Allen e Avault 1971; Stickney e Simco 1971; Perry 1973)

Relatos de aumento nas capturas ressaltam o potencial invasor da espécie, por possuir uma rápida dispersão. Sua invasão tem como consequência a predação e a competição com espécies nativas, podendo causar extinção das mesmas e perda de biodiversidade nos locais invadidos (Fuller *et al.* 1999; Moyle *et al.* 2003; Moyle e Marchetti 2006; Vitule 2008). É uma espécie já considerada como uma contaminação ambiental no Rio Guaraguaçu, tendendo a se tornar extremamente danosa ao local, assim como já acontece com *C. gariepinus* (Vitule 2008).



**Figura 5** – Exemplar de *Ictalurus punctatus* (Foto: <http://www.midatlanticstocking.com>)

A ordem Perciformes é considerada a maior entre os vertebrados, com exemplares presentes em quase todos os ambientes aquáticos (marinhos, estuarinos e de água doce) em todo o mundo (Nelson 2006). Essa ordem é caracterizada pela presença de nadadeiras dorsal e anal divididas, sendo a parte anterior espinhosa e a posterior levemente raiada, podendo ser parcialmente ou totalmente separadas (Froese e Pauly 2010). A ordem Perciformes é considerada parafilética, visto que muitas famílias não possuem características derivadas comuns e que outras ordens dividem o mesmo ancestral comum dos Perciformes (Nelson 2006). A primeira aparição data do fim do Cretáceo (Froese e Pauly 2010), período no qual a maioria dos actinoptérgios começaram a ocupar os ambientes de água doce (Cavin *et al.* 2006). Ao contrário dos Siluriformes, a origem dessa ordem é considerada primariamente marinha, com posterior ocupação de ambientes dulcícolas (Nelson 2006; Freire *et al.* 2008). Famílias como a dos ciclídeos são Perciformes que retornaram a água doce, e são considerados invasores recentes deste ambiente (Chakrabarty 2004; Sparks e Smith 2004; Freire *et al.* 2008). Atualmente, a ordem possui aproximadamente 10.033 espécies, a maioria marinha, porém cerca de 2.040 são quase que exclusivamente de água doce e quase 2.335 ocorrem na água doce pelo menos em uma parte das suas vidas (Nelson 2006). Os Perciformes utilizados no trabalho foram *Geophagus brasiliensis* (nativa) e *Oreochromis niloticus* (introduzida e invasora).

*Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Perciformes: Cichlidae), também conhecida como cará, é uma espécie nativa da região Neotropical, ocorrendo em riachos e rios das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Habita comumente riachos litorâneos e regiões jusantes próximas a estuários. Seu porte é pequeno, alcançando no máximo 30 cm de comprimento. O hábito alimentar é generalista. A espécie é de interesse comercial, sendo bastante utilizada na aquariofilia (Froese e Pauly 2010). É considerada uma espécie com elevado grau de eurihalidade, com relatos suportando águas com aproximadamente 15‰ de salinidade durante 7 horas de exposição, controlando sua osmolalidade e mantendo o conteúdo de água do músculo, o que ressalta sua capacidade de hiper-regular o meio interno frente a um choque hiper-osmótico (Freire *et al.* 2008).

Essa espécie possui várias características morfológicas e fisiológicas semelhantes a da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Furtado 1995), por isso pode ser considerada relevante na substituição da tilápia exótica, como alternativa na piscicultura, necessitando de mais trabalhos e esforços para compreender sua biologia e técnicas de criação.



**Figura 6** – Exemplar de *Geophagus brasiliensis* (foto: Ernst van Genne)

*Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) (Perciformes: Cichlidae) espécie nativa da África, encontrada principalmente no rio Nilo e em drenagens costeiras de Israel, é também conhecida como tilápia do Nilo. Habita riachos, rios, lagos, planícies alagadas e canais de irrigação, sendo mundialmente utilizada na aquicultura, e considerada uma das espécies de peixes de água doce com maior importância comercial. Sua alimentação é baseada em fitoplâncton e algas bentônicas. Pode alcançar de 8 a 28 cm de comprimentos e pesar até 4,5 kg (Froese e Pauly 2010). A espécie possui grande tolerância a variações ambientais como de temperatura e salinidade, podendo inclusive ser encontrada em águas salobras (Philippart e Ruwet 1982; Froese e Pauly 2010; Schofield *et al.* 2010). Estudos mostram que indivíduos de *O. niloticus* podem tolerar salinidades de até 40‰ (Popper e Lichatowich, 1975; Villegas 1990; Kamal 2005), ou seja, são bastante resistentes a variações salinas.

Devido a sua grande comercialização, acabou se tornando uma espécie exótica invasora em diversos países, causando muitos impactos ecológicos, sendo taxada como peste em potencial. Os impactos relatados são de danos às comunidades nativas, através de predação, competição e alteração do habitat, visto que a tilápia do Nilo possui padrões reprodutivos que permitem a formação de densas populações, além de ampla tolerância a variações ambientais que possibilita vantagens em habitats degradados (Welcomme 1988; Fuller *et al.* 1999; Mckenzie *et al.* 2003; Peterson *et al.* 2005; Attayde *et al.* 2007; Froese e Pauly 2010).



**Figura 7** – Exemplar de *Oreochromis niloticus* (foto: Pam Fuller)

A ordem Cypriniformes é representada pelas carpas, e é caracterizada por possuir apenas uma nadadeira dorsal, ossos parietal, subopercular, simpletico e intercalar, pela ausência de espinha peitoral e por possuir ossos intermusculares (Nelson 2006). A ordem é representada por mais de 3.400 espécies quase que exclusivamente de água doce, algumas espécies são encontradas em águas salobras e pouquíssimas no mar, e, quando marinhas, são sempre anádromas, nadando rio acima para desova (Nelson 2006; Saitoh *et al.* 2006; Froese e Pauly 2010). Essa ordem possui ampla distribuição na Ásia, sendo considerada ausente na Oceania e na América do Sul, porém pode ser encontrada em todos os lugares do mundo devido ao seu grande valor na aquariofilia (Berra 2001; Nelson 2006). Morfologicamente apresenta relação filogenética com Siluriformes, sendo também de origem primariamente de água doce (Fink e Fink 1981). O Cypriniformes utilizado no trabalho foi a espécie introduzida e invasora *Cyprinus carpio*.

*Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) (Cypriniformes: Cyprinidae), popularmente conhecida como carpa comum, é uma espécie nativa da Europa e sudeste da Ásia, vive em ambientes bentopelágicos de rios e lagos fundos, barrentos, arenosos ou com bastante vegetação, e de pouca correnteza, podendo ser encontrada também em águas salobras (Riede, 2004; Froese e Pauly 2010). Os indivíduos atingem geralmente de 30 a 60 cm e pesam em média 4 kg. Sua característica principal é a espinha dorsal serrilhada, com escamas grandes e grossas, e um par de barbilhos nos cantos da boca (Froese e Pauly 2010). É considerada bastante tolerante a variações de temperatura (Billard 2001). Trabalhos citam sua tolerância à salinidade variando de água doce a 15‰ (Crivelli 1981; Wang *et al.* 1997; De Boeck 2000; Cardona *et al.* 2008)

As carpas são consideradas invasoras no Brasil, trazidas por interesse comercial na aquicultura, pesca esportiva e “pesque-pague” (Orsi e Agostinho 1999). Segundo a IUCN (2010) *C. carpio* é uma das 100 piores espécies invasoras do mundo. Seus impactos são predação e competição com as espécies nativas, e por serem peixes com hábito de se misturar aos sedimentos de fundo, possuem a tendência de revirar esse sedimento e destruir a vegetação, aumentando a turbidez da água e dificultando assim a vida das espécies nativas, que acabam ficando mais vulneráveis à predação, levando desvantagem na competição por recursos e perdendo a fonte vegetal de alimentação (Bain 1993; Drenner *et al.* 1997; Baldry 2000; Xie e Chen 2001; ). Além disso, é conhecido que, associado à carpa, foi introduzido em águas brasileiras seu parasita *Lernaea cyprinacea*. Tal parasita pode causar uma doença chamada Lerniose em diversas espécies de peixes, gerando impactos ambientais e



econômicos, afetando diretamente a piscicultura e danificando o ecossistema, visto que o tratamento é difícil e tóxico (Fortes *et al.* 1998; Querol *et al.* 2005).



**Figura 8** – Exemplar de *Cyprinus carpio* (foto: George Chernilevsky)

#### **1.4 Justificativa e Hipótese**

Através da análise das proteínas de estresse e da capacidade de osmorregulação, o presente estudo pretende responder as seguintes perguntas: As espécies invasoras possuem maior grau de eurihalidade (tolerância a aumento de salinidade) que as espécies nativas? A resposta fisiológica ao estresse salino é mais efetiva em espécies invasoras do que nas nativas? As espécies com maior tolerância ao estresse salino podem utilizar estuários como ponte dispersora no processo de invasão de corpos d'água continentais?

Assim, serão testadas as hipóteses de que as espécies invasoras na bacia hidrográfica do rio Guaraguaçu, Paranaguá (PR), apresentam grande plasticidade fisiológica, sendo capazes de suportar maiores variações ambientais (em especial aumento de salinidade) e tendo maior probabilidade de se espalhar para outras bacias hidrográficas e corpos d'água adjacentes, através da permanência temporária em estuários.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a tolerância ao aumento de salinidade para espécies de peixes dulcícolas nativas *R. quelen* e *G. brasiliensis*, e invasoras *C. gariepinus*, *I. punctatus*, *O. niloticus* e *C. carpio*, através de ferramentas fisiológicas, fazendo inferências ao potencial invasor das espécies e à possível utilização dos estuários como ponte dispersora de espécies.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão da proteína de estresse HSP70 no músculo, a atividade da enzima anidrase carbônica nas brânquias e nos rins, a osmolalidade plasmática e o teor hídrico muscular das espécies de peixes dulcícolas nativas e invasoras frente à exposição às salinidades 15‰ e 30‰;
- Avaliar de forma comparativa as respostas fisiológicas entre as espécies nativas e invasoras para explicar o alto potencial invasor das espécies invasoras, e determinar a plasticidade fisiológica das espécies frente a alterações da salinidade ambiental;
- Fazer inferências à utilização dos estuários como pontes de dispersão entre rios com desembocadura no oceano baseando-se nas características fisiológicas das espécies.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados animais de seis espécies de peixes dulcícolas, duas nativas e quatro invasoras, sendo elas respectivamente: *Rhamdia quelen* (n=6-7, Comprimento total ou CT=18-53cm), *Geophagus brasiliensis* (n=6, CT=6-20cm), *Clarias gariepinus* (n=11-12, CT=21-29cm), *Ictalurus punctatus* (n=10-12, CT=6-14cm), *Oreochromis niloticus* (n=10-11, CT=8-24cm) e *Cyprinus carpio* (n=10-12, CT=13-25cm). Os animais foram adquiridos de pisciculturas locais, com exceção de *G. brasiliensis* que foi coleta no rio Piraquara, Paraná e em seguida transportados em galões de 30 litros com aeração constante para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da UFPR.

#### 3.1 Experimentos de laboratório

Em laboratório os animais foram submetidos à aclimatação em tanques de 250 litros durante cinco dias, com aeração constante, alimentação diária com ração comercial, temperatura de ~20°C, em água doce. Após esse período, foram realizados testes de tolerância à variação de salinidade, utilizando aquários de 20 litros com aeração constante e temperatura ambiente. Os animais controle foram mantidos em água doce e os experimentais foram transferidos diretamente do aquário estoque para água do mar diluída a 15‰ ou 30‰, com tempo de exposição de 6 horas a cada condição, a fim de determinar comparativamente o grau de eurihalidade das espécies. Os experimentos foram realizados em triplicata com 2-3 indivíduos por aquário.

Após 6 horas, os indivíduos foram anestesiados com benzocaína (80 mg/L), e amostras de sangue e tecidos foram coletadas para posterior análise. Os animais das espécies *R. quelen*, *G. brasiliensis*, *C. gariepinus*, *I. punctatus* e *C. carpio* submetidos a salinidade de 30‰ não sobreviveram 6 horas de exposição e foram retirados do experimento antes de detectada a morte, quando houve ausência de respostas a estímulos mecânicos. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal utilizando-se seringas heparinizadas, centrifugadas por 10 min (2,100 xg) e as amostras de plasma foram imediatamente congeladas a -20°C até a realização dos ensaios para a determinação da osmolalidade. Uma amostra de fragmentos de músculos foi retirada da região dorsal do corpo dos animais e congelada em freezer -80°C para análise da expressão da proteína de estresse HSP70 e para determinação do conteúdo total de água no tecido (teor hídrico). Amostras de rim e brânquias foram coletadas e congeladas a -80°C para análise da atividade da enzima anidrase carbônica.

### 3.2 Expressão de HSP70 por Western Blotting

Pedaços de músculos dos experimentos foram homogeneizados durante 5 minutos, com tampão de homogeneização (HEPES 20mM, NaCl 15mM, Triton X-100 1%, NP-40 1%) e inibidores de protease (Benzamidina 20mM, EDTA 10mM, Iodocetamida 10mM, Pepstatina 5µg/mL, 1,10 Fenantrolina 5mM, PMSF 2mM), utilizando o homogenizador Tecnal TE-103 em gelo. Após a homogeneização o material foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi congelado a -80°C. A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi dosada utilizando o protocolo descrito por Bradford (1976), com leitura em microplacas no leitor de Elisa a 595nm. A detecção da expressão da enzima HSP70 foi feita a partir do ensaio imunológico por Western Blotting.

As proteínas extraídas dos fragmentos de músculos dos animais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma alíquota do extrato de proteínas (contendo 200 mg de proteína total) foi diluída em tampão de amostra redutor, e submetida a um gel de corrida (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150mM contendo SDS 1mM (pH 8,8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50mM contendo SDS 1mM (pH 6,8). A corrida, na qual se utilizou tampão Tris-Glicina contendo SDS (Tris-Base 250mM, SDS 35mM e Glicina 2M) (pH 8,3), ocorreu por aproximadamente 4 horas com corrente constante de 20 mAmp. Imediatamente após a corrida os peptídios do gel foram transferidos para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blot contendo Tampão de Transferência (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 10% e Metanol 20%). A transferência foi realizada em corrente de 120mAmp e 25 mV, durante aproximadamente 16 horas. A membrana foi então retirada e corada com Ponceau-S (Ácido Acético Glacial 3% e Ponceau S 0,2%) por 10 minutos, em seguida foi seca sobre papel toalha. A faixa com o marcador de peso molecular foi cortada, e o restante da membrana contendo as proteínas foi incubada com tampão TBST (NaCl 120mM, TRIS-HCl 20mM pH 7,4 e Tween-20 0,05%) contendo leite em pó comercial Molico, por 60 minutos para bloqueio de sítios não específicos. Após, o material foi incubado por duas horas na presença do anticorpo primário (anti-HSP70 marca BD diluído 1:1000 em TBST + leite Molico 5% ~ 5mL). Em seguida foi lavado cinco vezes, por cinco minutos, com tampão TBST e incubado com o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina, marca Sigma-Aldrich diluído 1:1000 em TBST + leite Molico 5% ~ 5mL) por duas horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes com tampão TBST por cinco minutos e em seguida o material foi coberto com cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP/NBT, marca Sigma-Aldrich

(~5mL), permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas de marcação das proteínas. Após o aparecimento das bandas, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água destilada para parar a reação.

A membrana com as bandas foi digitalizada e a expressão das proteínas foi quantificada através da análise da intensidade relativa de cinza das bandas, utilizando o programa Image J.

### **3.3 Atividade da Enzima Anidrase Carbônica (AAC)**

A partir das amostras de rim e brânquias, foi determinada a atividade da enzima Anidrase Carbônica (AC), utilizando o protocolo estabelecido por Vitale *et al.* (1999). As amostras foram pesadas e homogeneizadas em 10% P/V (peso/volume) tampão manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4, e centrifugadas a 5000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado para análise da atividade da enzima. O método consistiu na utilização de 7,5 mL do mesmo tampão, acrescido de 0,05 mL do sobrenadante do homogeneizado e 1 mL de água deionizada saturada com CO<sub>2</sub>, a 2,5°C, para geração de uma reta de regressão linear. Essa reta foi obtida através da medição da queda do pH da amostra logo após o acréscimo de água saturada com CO<sub>2</sub>, em intervalos de 4 segundos, durante 20 segundos, utilizando pHmetro de bancada (inoLAB pH Level 1 da WTW®, Alemanha). O gráfico da reta de regressão linear gerado forneceu o dado da inclinação da reta, que corresponde a Taxa de reação Catalisada (TC). Além desses dados, obteve-se a Taxa de reação Não-Catalizada (TNC), através da substituição da amostra homogeneizada por 0,05 mL do tampão. A partir dessas duas medidas, a Atividade da Anidrase Carbônica (AAC) foi calculada utilizando a fórmula:

$$AAC = [TC/TNC-1] / \text{mg proteína total.}$$

A concentração de proteínas totais (mg de proteína total) das amostras foi obtida através da quantificação por método de Bradford (1976).

### **3.4 Osmolalidade Plasmática**

A osmolalidade das amostras de plasma foi determinada utilizando o micro-osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor, USA), em amostras não diluídas.

### **3.5 Teor Hídrico**

Amostras de tecido muscular foram utilizadas para determinação do teor hídrico, ou porcentagem do conteúdo total de água no tecido. Os músculos que se encontravam

congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram deixados em temperatura ambiente por aproximadamente uma hora para que descongelassem. Os microtubos foram pesados (Pt), e os fragmentos de músculo foram colocados dentro desses tubos, que foram pesados novamente, obtendo-se assim peso úmido do fragmento (Pu + Pt). Esses tubos com as amostras foram colocados abertos na estufa e deixados a  $60^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, foram pesados novamente os fragmentos dentro dos tubos, obtendo-se o peso seco (Ps +Pt). Foi descontado os valores do peso dos tubos (Ps – Pt e Pu – Pt) , e o teor de hidratação do tecido foi calculado através da fórmula:

$$\text{Th (\%)} = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$$

### 3.6 Análises de dados

Os resultados de todos os experimentos foram expressos na forma de média±erro padrão da média. As espécies foram agrupadas de acordo com sua Ordem para facilitar a comparação dos dados: Siluriformes, com uma espécie nativa (*Rhamdia quelen*) e duas invasoras (*Clarias gariepinus* e *Ictalurus punctatus*), e Perciformes e Cypriniformes, também com duas invasoras (*Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) e uma nativa (*Geophagus brasiliensis*)

Os dados foram analisados utilizando o programa SigmaStat 3.5, sempre com  $P < 0,05$ . Para identificar possíveis diferenças na expressão de HSP70, na atividade da enzima anidrase carbônica, na osmolalidade e no teor hídrico foi utilizada a análise de variância de duas vias Two Way ANOVA para os fatores espécie (separadamente para os Siluriformes: *Rhamdia quelen*, *Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*; e para os Perciformes e Cypriniformes: *Geophagus brasiliensis*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) e salinidade (Água doce, 15‰ e 30‰). Antes de cada ANOVA, era realizado o teste de normalidade e de homogeneidade das variâncias. A análise foi seguida por teste *post hoc* de Tukey, com avaliação de todas as comparações pareadas possíveis, para identificação das diferenças dentro dos fatores testados pela ANOVA.

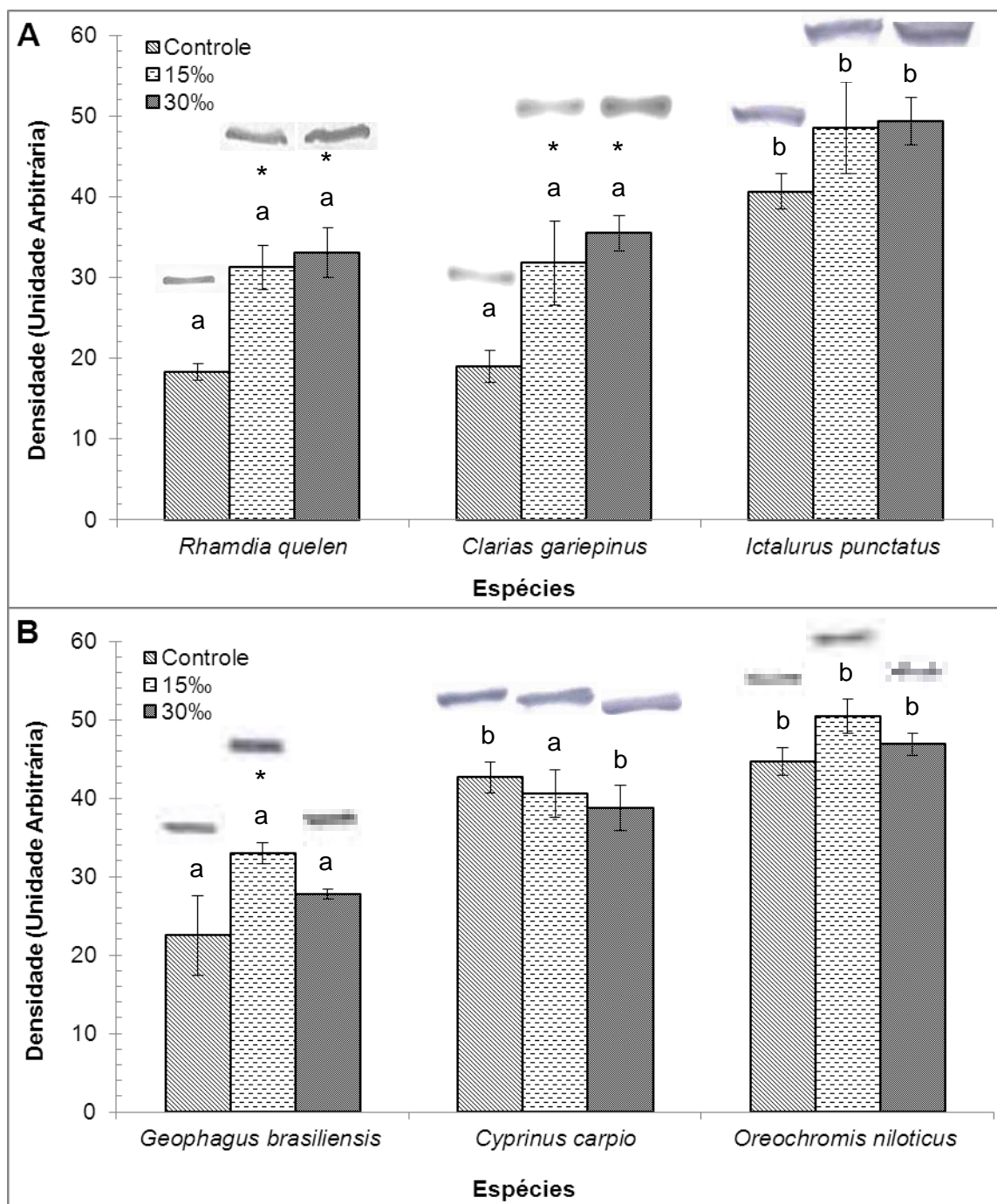
## 4. RESULTADOS

Os exemplares da maioria das espécies, com exceção de *O. niloticus*, não sobreviveram por 6 horas quando expostos à salinidade 30‰. Os indivíduos de *R. quelen* mantiveram-se vivos nessa salinidade apenas por aproximadamente uma hora e 30 minutos. Para *C. gariepinus* o tempo limite de sobrevivência à 30‰ foi de 3 horas. Os indivíduos de *I. punctatus* morreram entre uma e duas horas de exposição. Para *G. brasiliensis*, indivíduos maiores suportaram o choque de 30‰ por 6 horas, porém os menores sobreviveram no máximo duas horas nessa salinidade. Em *C. carpio* os exemplares morreram aproximadamente após duas horas de exposição à 30‰.

### 4.1 Proteínas de Estresse Térmico (HSP70)

Para as espécies da ordem Siluriformes, *R. quelen* não apresentou diferença na expressão de HSP70 (controle:  $18,3 \pm 0,99$ ; 15‰:  $31,2 \pm 2,70$  e 30‰:  $33,1 \pm 3,09$  unidade arbitrária) quando comparada a *C. gariepinus* (controle:  $18,9 \pm 1,92$ ; 15‰:  $31,8 \pm 5,20$  e 30‰:  $35,5 \pm 2,15$  unidade arbitrária). Ambas as espécies apresentaram aumento significativo da expressão de HSP70 nas salinidades 15‰ e 30‰ quando comparadas ao controle em água doce. *I. punctatus* apresentou a expressão de HSP70 mais elevada dentre os Siluriformes em todas as condições experimentais (controle:  $40,6 \pm 2,17$ ; 15‰:  $48,6 \pm 5,67$  e 30‰:  $49,3 \pm 2,92$  unidade arbitrária), e esta foi mantida constante frente a elevação da salinidade (Fig. 9A).

Nas espécies das ordens Perciformes e Cypriniformes, *G. brasiliensis* apresentou valores menores de expressão da proteína de estresse térmico nos animais controle ( $22,5 \pm 5,08$  unidade arbitrária) e nos animais expostos a 30‰ ( $27,8 \pm 0,62$  unidade arbitrária) quando comparado a *C. carpio* e *O. niloticus*. *G. brasiliensis* expostos a 15‰ ( $32,0 \pm 1,33$  unidade arbitrária) apresentaram elevação da expressão de HSP70 quando comparados ao controle e aos animais expostos a 30‰. *C. carpio* (controle:  $42,6 \pm 1,98$ ; 15‰:  $40,6 \pm 3,02$  e 30‰:  $38,7 \pm 2,83$  unidade arbitrária) e *O. niloticus* (controle:  $44,6 \pm 1,79$ ; 15‰:  $50,4 \pm 2,15$  e 30‰:  $46,8 \pm 1,43$  unidade arbitrária) não apresentaram alteração da expressão de HSP70 frente a elevação da salinidade; comparando as duas espécies apenas a salinidade 15‰ foi diferente entre elas (Fig. 9B).



**Figura 9** – Expressão de HSP70 (média±erro padrão, unidade arbitrária) em músculos de peixes expostos por 6 horas ao controle em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=5), *C. gariepinus* (n= 5-6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécies da ordem Perciformes *G. brasiliensis* (n=4-5) e *O. niloticus* (n=4-5) e da ordem Cypriniformes *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

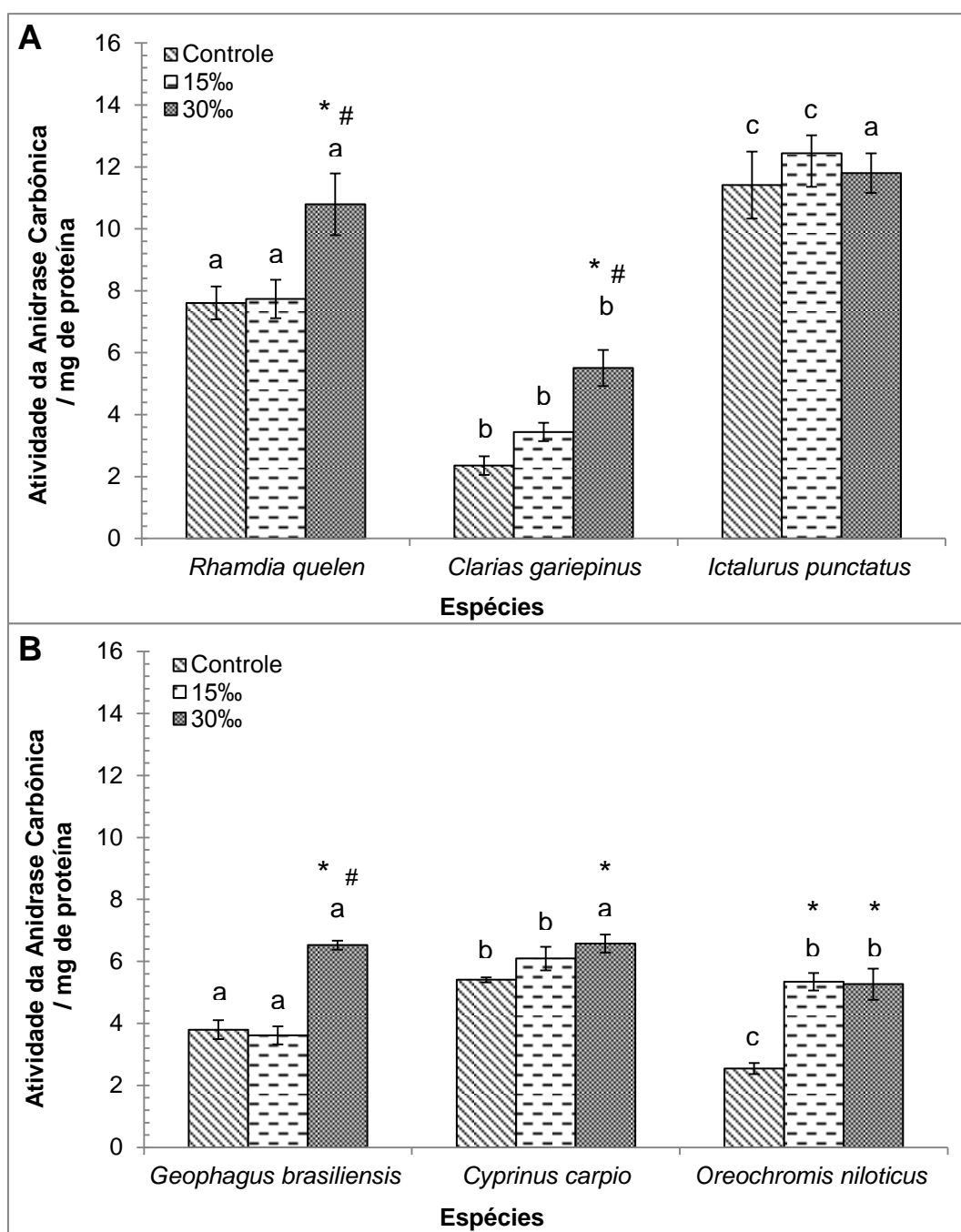
#### 4.2 Atividade de Anidrase Carbônica (AAC)

A AAC branquial foi diferente nas três espécies de Siluriformes, havendo valores semelhantes somente na salinidade 30‰ das espécies *R. quelen* e *I. punctatus*. A atividade branquial de *R. quelen* apresentou elevação em 30‰ ( $10,8 \pm 0,99$  /mg de proteína) quando comparada a atividade dos animais controle ( $7,6 \pm 0,53$  /mg de proteína) e expostos a 15‰ ( $7,7 \pm 0,62$ /mg de proteína). *C. gariepinus* apresentou o mesmo padrão de atividade que *R. quelen*, apresentando elevação da AAC em 30‰ ( $5,5 \pm 0,58$ /mg de proteína) quando comparado ao animais controle ( $2,3 \pm 0,29$ /mg de proteína) e 15‰ ( $3,4 \pm 1,01$ /mg de proteína) *I. punctatus* não apresentou diferença na AAC branquial entre os tratamentos (Fig. 10A).

Para os Perciformes e Cypriniformes, todas as espécies apresentaram AAC branquial diferente na condição controle. *G. brasiliensis* apresentou menor AAC branquial em 15‰ quando comparado a *C. carpio* e *O. niloticus*, a tilápia *O. niloticus* apresentou redução da menor AAC branquial em 30‰ quando comparada as demais espécies. A espécie *G. brasiliensis* apresentou maior AAC apenas em 30‰, em relação ao controle e a 15‰ (controle:  $3,7 \pm 0,30$ ; 15‰:  $3,6 \pm 0,29$  e 30‰:  $6,5 \pm 0,14$  /mg de proteína). Para *C. carpio*, a AAC em 30‰ foi maior que a AAC branquial dos animais controle (controle:  $5,4 \pm 0,07$ ; 15‰:  $6,0 \pm 0,38$ ; 30‰:  $6,6 \pm 0,29$ /mg de proteína). *O. niloticus* a AAC foi elevada em 15‰ e 30‰, quando comparadas ao controle (controle  $2,5 \pm 0,18$ ; 15‰:  $5,3 \pm 0,28$  e 30‰:  $5,3 \pm 0,50$ /mg de proteína) (Fig. 10B).

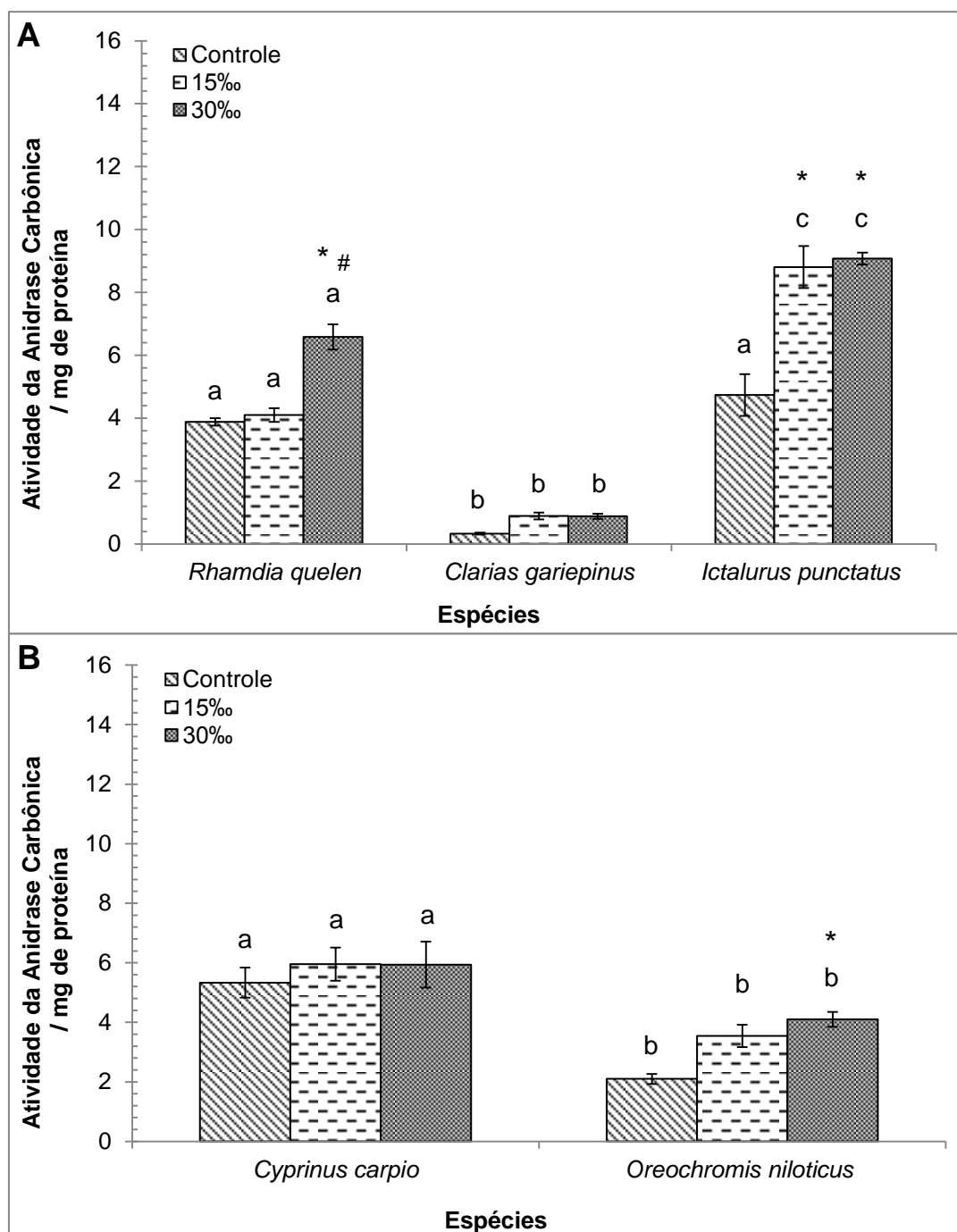
A AAC renal de *C. gariepinus* foi reduzida quando comparada as demais espécies de Siluriformes (controle:  $0,3 \pm 0,03$ ; 15‰:  $0,8 \pm 0,10$  e 30‰:  $0,8 \pm 0,08$  /mg de proteínas). *I. punctatus* apresentou maior AAC nas salinidades 15‰ e 30‰ em relação as mesmas condições para *R. quelen*. *R. quelen* elevou AAC na salinidade 30‰, quando comparado ao controle e 15‰ (controle:  $3,8 \pm 0,11$ ; 15‰:  $4,1 \pm 0,21$  e 30‰:  $6,5 \pm 0,40$  /mg de proteína). A AAC renal em *C. gariepinus* não sofreu alteração frente ao estresse salino. *I. punctatus* apresentou elevação na AAC em 15‰ e 30‰, quando comparado ao controle (controle:  $4,7 \pm 0,66$ ; 15‰:  $8,8 \pm 0,67$  e 30‰:  $9,1 \pm 0,19$  /mg de proteína) (Fig. 11A).

Em *O. niloticus* a AAC renal foi menor quando comparada a AAC de *C. carpio* em todas as condições experimentais. *C. carpio* não apresentou diferença na atividade da AAC entre os tratamentos e *O. niloticus* apresentou atividade elevada apenas na salinidade 30‰ quando comparados ao controle (controle:  $2,1 \pm 0,17$ ; 15‰:  $3,5 \pm 0,37$  30‰:  $4,1 \pm 0,25$ /mg de proteína) (Fig. 11B). Os rins de *G. brasiliensis* não foram analisados devido a impossibilidade de coleta dos mesmos, visto que os exemplares de peixes eram muito pequenos.



**Figura 10** – Atividade da enzima Anidrase Carbônica em Brânquias (média±erro padrão, AAC/mg de proteína) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=5-6), *C. gariepinus* (n=6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=4-5) e *O. niloticus* (n=5) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .



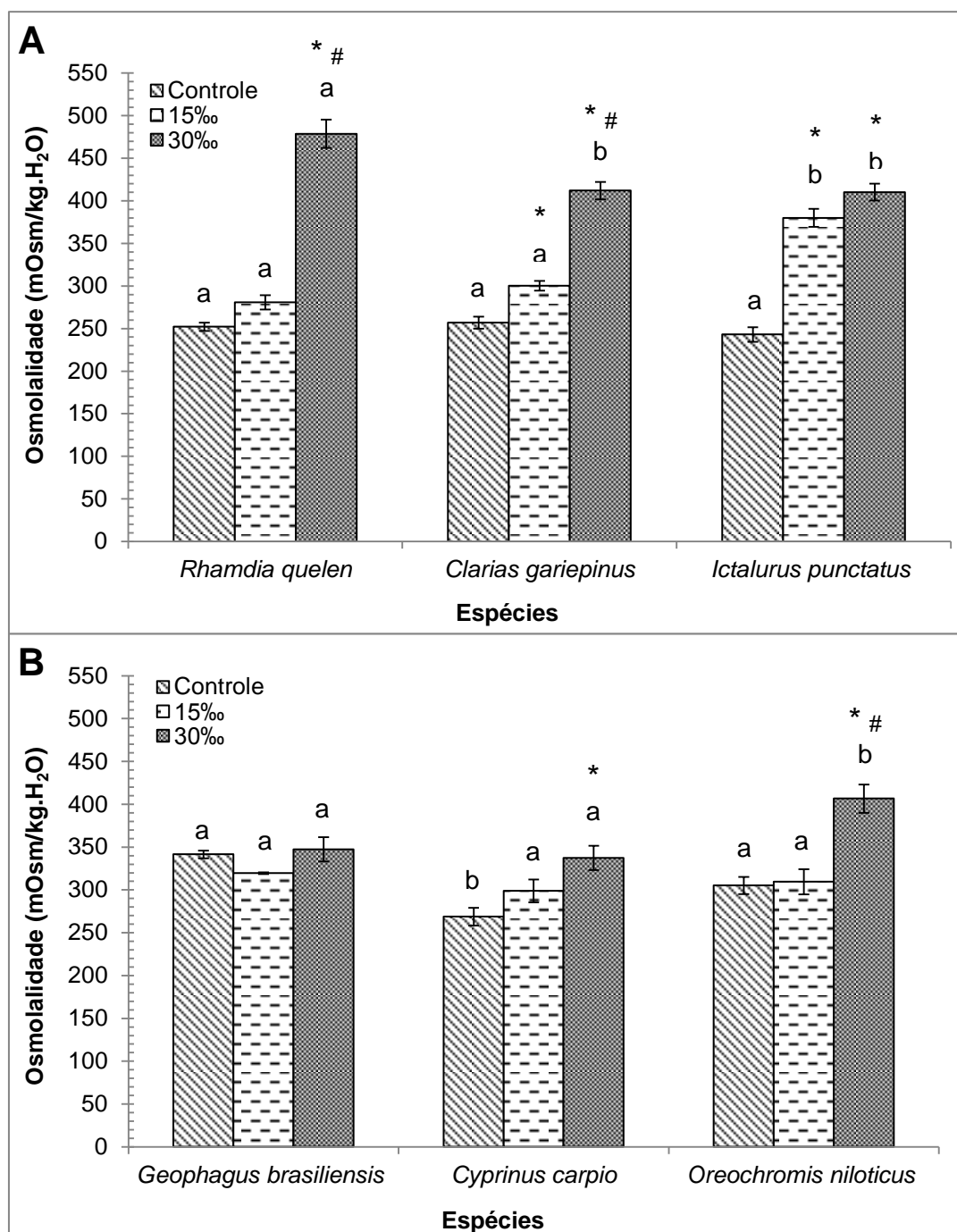


**Figura 11** – Atividade da enzima Anidrase Carbônica em Rins (média±erro padrão, AAC/mg de proteína) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades experimentais de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=8), *C. gariepinus* (n= 5-6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécie da ordem Perciformes: *O. niloticus* (n=5) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

### 4.3 Osmolalidade

A osmolalidade do plasma nas espécies de Siluriformes apresentou elevação acompanhando o aumento da salinidade. Não houve diferença entre os controles para todas as espécies, porém *I. punctatus* apresentou elevação da osmolalidade em 15‰ quando comparado a *R. quelen* e *C. gariepinus* na mesma condição e *R. quelen* exposto a 30‰ apresentou elevação da osmolalidade quando comparado as demais espécies de Siluriformes. *R. quelen* a osmolalidade foi maior em 30‰, quando comparado aos animais controle e 15‰ (controle:  $252,2 \pm 4,83$ ; 15‰:  $280,6 \pm 8,43$  e  $478,7 \pm 16,6$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O). *C. gariepinus* apresentou elevação da osmolalidade nos animais expostos a 30‰ ( $412,0 \pm 10,32$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) quando comparados ao controle ( $256,9 \pm 6,93$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) e aos animais expostos 15‰ ( $300,3 \pm 5,74$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) e elevação da osmolalidade dos animais expostos a 15‰ em relação aos controle em água doce. *I. punctatus* apresentou aumento na osmolalidade em 15‰ e 30‰ em relação ao controle (controle:  $243,00 \pm 8,62$ ; 15‰:  $380,0 \pm 10,60$  e 30‰:  $410,2 \pm 9,35$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) (Fig. 12A).

Nos Perciformes e Cypriniformes, *C. carpio* apresentou redução na osmolalidade na condição controle em relação a *G. brasiliensis* e *O. niloticus*. *O. niloticus* apresentou elevação da osmolalidade em 30‰ quando comparada as demais espécies. *G. brasiliensis* não apresentou diferença nos valores de osmolalidade entre os tratamentos. *C. carpio* elevou a osmolalidade nos animais expostos a 30‰ em relação ao controle (controle:  $268,7 \pm 10,49$ ; 15‰:  $298,8 \pm 13,43$  e 30‰:  $337,2 \pm 12,17$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O). Para *O. niloticus* a osmolalidade foi elevada nos animais expostos a 30‰, quando comparada aos controle e aos expostos a 15‰ (controle:  $305,2 \pm 10,04$ ; 15‰:  $309,4 \pm 14,68$  e 30‰:  $406,6 \pm 16,52$  mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) (Fig. 12B).

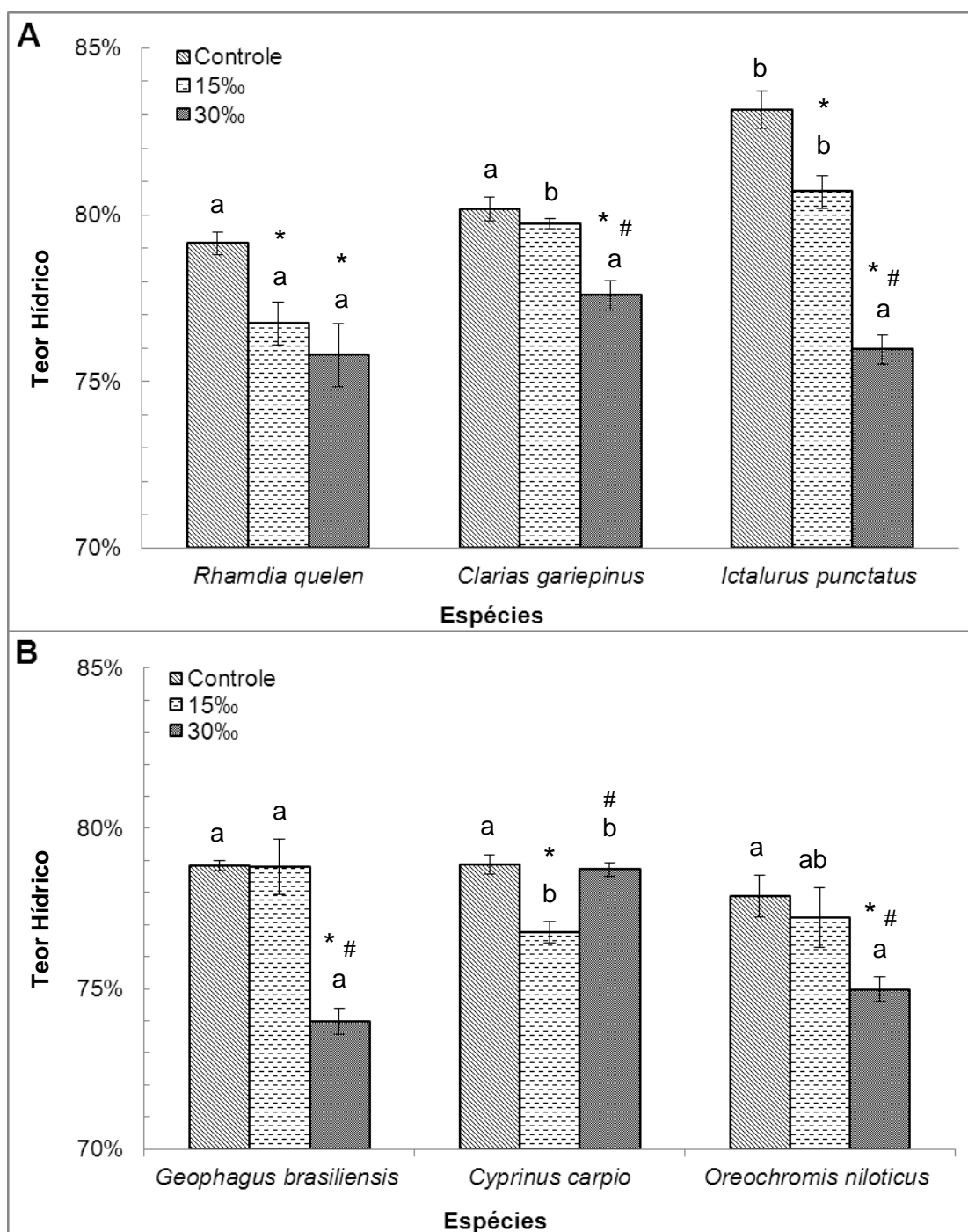


**Figura 12** – Osmolalidade do plasma (média±erro padrão, mOsm/kg.H<sub>2</sub>O) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=6), *C. gariepinus* (n=11-12) e *I. punctatus* (n=5-9). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=2) e *O. niloticus* (n=7-8) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=8-11). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com P<0,05.

#### 4.4 Teor Hídrico

Nas espécies de Siluriformes, ocorreu a diminuição do teor hídrico muscular com o aumento da salinidade do meio. Valores maiores de teor hídrico muscular foram observados em *I. punctatus* na condição controle quando comparado a *R. quelen* e *C. gariepinus*, e menores em *R. quelen* em 15‰ quando comparado a *C. gariepinus* e *I. punctatus*. Em *R. quelen* houve diminuição do teor hídrico muscular em 15‰ e 30‰ comparados ao controle (controle:  $79 \pm 0,3\%$ ; 15‰:  $76 \pm 0,6\%$  e 30‰:  $75 \pm 0,9\%$ ). *C. gariepinus* apresentou redução do teor hídrico nos animais expostos a 30‰ quando comparados aos animais controle e aos expostos a 15 ‰ (controle  $80 \pm 0,3\%$ ; 15‰:  $79 \pm 0,1\%$  e 30‰:  $77 \pm 0,4\%$ ). Para *I. punctatus* houve diferença entre os três tratamentos, com diminuições do controle em relação a 15‰, e em 30‰ comparado ao controle e a 15‰ (controle:  $83 \pm 0,5\%$ ; 15‰:  $80,6 \pm 0,5\%$  e 30‰:  $76 \pm 0,4\%$ ) (Fig.13A).

Entre os Perciformes e Cypriniformes, as espécies apresentaram valores semelhantes de teor hídrico no controle. *C. carpio* apresentou redução do teor hídrico muscular em 15‰ quando comparado a *G. brasiliensis* e elevação em 30‰ quando comparado a *G. brasiliensis* e *O. niloticus*. *G. brasiliensis* apresentou redução do teor hídrico em 30‰ quando comparado aos valores dos animais controles e expostos a 15‰ (controle:  $78 \pm 0,1\%$ ; 15‰:  $78 \pm 0,8\%$  e 30‰:  $73 \pm 0,4\%$ ). Para *C. carpio* em 15‰ houve uma diminuição do teor hídrico em relação ao controle e 30‰ (controle:  $78 \pm 0,2\%$ ; 15‰ e 30‰:  $76 \pm 0,3\%$ ). Em *O. niloticus* ocorreu diminuição do valor de teor hídrico em 30‰, comparado ao controle e a 15‰ (controle:  $77 \pm 0,6\%$ ; 15‰:  $77 \pm 0,9\%$  e 30‰:  $74 \pm 0,3\%$ ) (Fig. 13B).



**Figura 13** – Teor hídrico muscular (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=6), *C. gariepinus* (n=6) e *I. punctatus* (n=6-9). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=4-6) e *O. niloticus* (n=5-6) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=6). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Uma vez submetidos a estresse salino, os peixes de água doce precisam ativar mecanismos fisiológicos que possibilitem a manutenção da homeostase frente a uma condição hiper-osmótica do meio. As espécies de peixes dulcícolas nativas e invasoras utilizadas nesse estudo pertencentes à ordem Siluriformes (*R. quelen*, *C. gariepinus* e *I. punctatus*), Perciformes (*G. brasiliensis* e *O. niloticus*) e o Cypriniformes (*C. carpio*) apresentaram respostas fisiológicas diferenciadas frente ao estresse salino.

### 5.1 HSP70

Nas espécies *R. quelen* e *C. gariepinus*, da ordem Siluriformes, tanto a nativa quanto a invasora apresentaram expressão da proteína de estresse HSP70 elevada em resposta ao aumento da salinidade (choque hiper-osmótico de 15‰ e 30‰). A espécie *I. punctatus* não sofreu alteração da expressão de HSP70 frente ao estresse salino, porém os valores obtidos para essa espécie foram maiores que os encontrados para *R. quelen* e *C. gariepinus*. Comparativamente, as três espécies de Siluriformes conseguiram responder ao aumento de salinidade ativando a expressão das proteínas de estresse, ou mantendo os níveis basais suficientes, sem necessidade de alteração na expressão, como no caso de *I. punctatus*.

Para Siluriformes trabalhos sobre resposta de HSP frente a estresse salino são ausentes, apenas outros estressores foram estudados, como por exemplo a temperatura. Para este parâmetro foram descritas alterações nos níveis de HSP70 em indivíduos de *I. punctatus* (Koban *et al.* 1987; Abukhalaf *et al.* 1994; Luft *et al.* 1996; Weber e Bosworth 2005) e *Ictalurus natalis* (Fader *et al.* 1999), representantes desta ordem.

Dentre as espécies de Perciformes e Cypriniformes, *G. brasiliensis* apresentou expressão de HSP70 em 15‰ e 30‰ e também valores menores que as espécies *O. niloticus* e *C. carpio*, as quais mantiveram constantes os níveis de proteína. A maior expressão de HSP70 pelas espécies invasoras ressalta a plasticidade fisiológica dessas espécies (Espínola e Júlio 2007; Mata *et al.* 2010).

Alguns parâmetros devem ser considerados na análise das HSPs, pois influenciam a resposta obtida frente ao estresse. Fatores como tempo de exposição, tipo e severidade do estressor; o tecido analisado e a espécie em questão podem ser determinantes para o momento da ativação, para o tempo de duração e para a intensidade da indução das proteínas (DiDomenico *et al.* 1982; Basu *et al.* 2002; Nakano e Iwama 2002; Delaney e Klesius 2004; Cara *et al.* 2005). Geralmente variações da isoforma e da intensidade da expressão de HSP

refletem tanto a história evolutiva da espécie quanto a aclimação recente às condições enfrentadas pelo organismo (White *et al.* 1994; Hofmann e Somero 1995; Tomanek e Somero 2002; Tomanek 2008). No presente trabalho foi utilizado tempo de exposição de 6 horas e choque hiper-osmótico de 15‰ e 30‰, com o objetivo de simular o tempo e variação de salinidade enfrentada pelos organismos em ambientes estuarinos. A isoforma HSP70 foi utilizada por ser comprovadamente ativada em animais aquáticos frente a variações de salinidade (Deane *et al.* 2002; Wang *et al.* 2007; Yang *et al.* 2009).

Um fator relevante na expressão de HSP70 é o tempo de exposição ao estresse (Smith *et al.*, 1999). Os genes de HSP não possuem íntrons, logo o mRNA é traduzido em novas proteínas minutos após a exposição ao estresse (Basu *et al.* 2002). No entanto, a expressão da HSP70 é custosa para o organismo, consumindo a energia que poderia ser gasta em crescimento, desenvolvimento e longevidade. Sendo assim, a expressão pode ser reduzida quando a resposta ao choque já não é mais necessária (Heredia-Middleton 2008). Um tempo de exposição de 6 horas a salinidade 15‰ e de 1,5 a 3 horas a salinidade 30‰, como o testado neste trabalho, provou-se suficiente para detecção da resposta de HSP70 muscular ao estresse hiper-salino para espécies dulcícolas de Siluriformes *R. quelen* e *C. gariepinus* e para o Perciformes *G. brasiliensis*. Respostas semelhantes foram observadas na expressão de HSP70 e HSP90 cerebral para o Perciformes dulcícola *Oreochromis mossambicus* após exposição por 1, 2, 4, 8 e 24 horas a salinidade de 25‰, havendo alterações logo após 1 hora de exposição (Yang *et al.* 2009), no entanto, a expressão de HSP70 muscular não se alterou após 6 horas de exposição a 30‰ para espécie *Oreochromis niloticus* utilizada no presente trabalho. Também foram observadas elevações na expressão de HSP60 e HSP70 no fígado para o Perciformes marinho *Mylio macrocephalus* exposto por 2 horas a choque hipo e hiper-salino (Deane *et al.* 2002) e na expressão de HSP90 para o Salmoniformes dulcícola *Oncorhynchus tshawytscha* após 24 horas de transferência de água doce para a água do mar (Palmisano *et al.* 2000) (Tab. 1).

Ausência de alteração nos níveis de HSP70 após estresse salino foram observados em *I. punctatus*, *C. carpio* e *O. niloticus*, corroborando repostas observadas para teleósteos marinhos e dulcícolas. Os níveis de HSP70 foram constantes nas espécies marinhas de Perciformes *Gillichthys mirabilis* exposta por 4 e 5 horas a choque hipo (~11‰ para ~6‰) e hiper-salino (~11‰ para ~22‰) (Kültz 1996) e *Sparus sarba* expostos à salinidades de 6‰, 12‰, 33‰ e 50‰ durante um mês (Deane e Woo 2004). Um resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, para a tilápia *O. niloticus*, foi descrito para a tilápia do

mesmo gênero *Oreochromis mossambicus* aclimatada em água doce, 15‰ e 35‰, que também não sofreu alteração nos níveis de HSP90 renal após duas semanas de exposição (Tang *et al.* 2009). Para *C. carpio*, o resultado corroborou com outro trabalho (De Watcher *et al.* 1998) segundo o qual também não houve alteração nos níveis de HSP70 no tecido muscular após 28 dias de exposição à salinidade de 10‰ (Tab. 1). Para Siluriformes não foram encontrados trabalhos que relacionem expressão de HSP a variações de salinidade.

A ausência de alteração nos níveis de HSP frente ao estresse osmótico/salino pode ser explicado devido à utilização dos níveis basais dessa proteína para proteção celular (Wang *et al.* 2007). Em células não estressadas há uma produção constitutiva de proteínas de estresse que são úteis em diversos mecanismos do metabolismo a fim de manter a homeostase (Fink e Goto 1998). Altas quantidades de HSP70 constitutiva garantem ao peixe uma alta capacidade de reparar proteínas celulares que poderiam ser danificadas frente a um estresse (Wang *et al.* 2007; Tang *et al.* 2009). Quando não há alteração nos níveis constitutivos da proteína, mesmo após a exposição a uma condição estressante, possivelmente outros mecanismos estão sendo utilizados para manutenção da capacidade osmorregulatória (Deane e Woo 2004), como por exemplo, alterações na atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica (Roy *et al.* 2007). Aumentos nos níveis de HSP podem indicar não só uma pré-adaptação ao estresse, como também podem demonstrar que houve um dano significativo nas proteínas do tecido, tendo uma realocação dos recursos celulares para a síntese de HSP (Wang *et al.* 2007).

Estudos com HSP também focam a variação dos níveis da proteína em diferentes tecidos (Smith *et al.* 1999; Rabergh *et al.* 2000). O tempo de recuperação de um choque com concomitante redução na expressão de HSP pode ser específico de cada tecido, ou seja, órgãos metabolicamente ativos, como brânquias e fígado, por exemplo, tendem a recuperar seus estados basais rapidamente (Deane *et al.* 2002). Como neste trabalho foi utilizado apenas o tecido muscular, não é possível fazer inferências sobre os demais tecidos, porém os resultados demonstram que houve uma resposta efetiva nesse tecido frente ao estresse salino, ressaltando sua importância no estudo da resposta fisiológica através das HSPs. Indivíduos de *C. carpio* expostos à salinidade de 10‰ durante 28 dias apresentaram níveis elevados de HSP70 no fígado, porém não houve alteração no cérebro, brânquias e no músculo (De Watcher *et al.* 1998), este último tecido corroborando com o resultado encontrado no presente trabalho.

Todas essas condições que influenciam na expressão de HSP acabam dificultando a identificação de um padrão na resposta fisiológica dessas proteínas, ressaltando a



especificidade dessa resposta. Com os resultados obtidos nesse trabalho, e a comparação com demais estudos, pode-se dizer que em determinados tecidos a expressão da HSP pode ocorrer de forma mais acentuada que em outros, dependendo do nível e da duração do estresse, e que os níveis constitutivos de HSP70 podem ser suficientes para suportar choques salinos, não necessitando do aumento da expressão da proteína. Visto que a expressão de proteínas de estresse é uma ferramenta essencial do organismo para responder a variações ambientais, e que a compreensão de sua atividade frente ao estresse é um forte indicativo da plasticidade do animal, trabalhos como este ajudam a determinar potenciais invasores, possíveis conquistas de novos habitats, e inferir sobre a ecofisiologia da espécie.

## 5.2 Atividade de Anidrase Carbônica (AAC)

Com exceção do Siluriformes *I. punctatus*, a AAC nas brânquias dos peixes aumentou após exposição ao choque hiper-salino. Os Siluriformes *R. quelen* (após 1,5 horas de exposição) e *C. gariepinus* (após 3 horas de exposição) apresentaram AAC elevada na salinidade de 30‰, assim como as espécies de *G. brasiliensis* (após 2-6 horas de exposição) e *C. carpio* (após 2 horas de exposição). A espécie *O. niloticus* apresentou aumento na AAC branquial em 15‰ e 30‰ após 6 horas de exposição quando comparada à atividade dos controles em água doce.

O papel da AC nos processos de osmorregulação foram demonstrados através da inibição da AC branquial por drogas como a acetazolamida ou a etoxizolamida que levaram a redução no influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em teleósteos dulcícolas como por exemplo nas espécies *Carassius auratus* e *Danio rerio* (Maetz e Garcia- Romeu 1964; Boisen *et al.* 2003) e na tilápia *O. mossambicus* (Chang e Hwang 2004), reforçando que a enzima pode participar tanto na captação quanto na excreção de íons em organismos aquáticos devido as trocas  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  e  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (Claiborne *et al.* 2002; Evans *et al.* 2005).

A AC contribui tanto para osmorregulação quanto para a regulação ácido-base em teleósteos de água doce, através da catálise da hidratação do  $\text{CO}_2$ , gerando íons  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , que são utilizados para geração de gradiente quanto para captação ou liberação de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (revisado por Perry e Laurent 1990; Henry e Swenson 2000; Claiborne *et al.* 2002; Evans *et al.* 2005; Gilmour e Perry 2009). Nas espécies *R. quelen* e *C. gariepinus*, a AAC branquial foi elevada em 30‰, corroborando os resultados encontrados para *R. quelen*, exposto por 1 hora à salinidade de 25‰ (Souza-Bastos e Freire 2009). A tilápia *O. niloticus* apresentou aumento na AAC branquial com o aumento da salinidade, e o mesmo padrão foi observado

**Tabela 1** – Alteração nos níveis de HSP em teleósteos frente a estresse salino.

Espécie	Salinidade Controle *	Salinidade Experimental	HSP	Tecido	Tempo de exposição	Resposta	Referência
<i>Gillichthys mirabilis</i> #	AS (11‰)	6‰ e 22‰	Expressão HSP70	Brânquia	4 e 6 horas	Sem alteração	Kültz 1996
<i>Cyprinus carpio</i>	AD	10‰	Expressão HSP70	Cérebro, brânquia, músculo e fígado	28 dias	Aumento na expressão apenas no fígado	De Wachter <i>et al.</i> 1998
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> #	AD	30‰-35‰	HSP90 mRNA	Coração, músculo, cérebro, brânquia, fígado e rim	24 horas	Sem alteração em nenhum tecido	Palmisano <i>et al.</i> 2000
<i>Mylio macrocephalus</i> #	AM (33‰)	6‰, 12‰, 33‰ e 50‰	Expressão HSP60, HSP70 e HSP90	Fígado	8 meses	Menor nível de HSP - 12‰, Maior - 6‰ e 50‰ HSP90 = em 12‰ e 33‰ HSP60 e HSP70 - 12‰ menor que 33‰	Deane <i>et al.</i> 2002
<i>Sparus sarba</i> #	AM (33‰)	6‰, 12‰, 33‰ e 50‰	HSP70 mRNA	Fígado, rim, brânquia	1 mês	Sem alteração em fígado e Rim, porém nas brânquias os níveis foram igualmente baixos em 6‰ e 12‰, altos em 33‰, e maiores em 50‰	Deane e Woo 2004
<i>Oreochromis mossambicus</i> # <i>Tetraodon nigroviridis</i> # <i>Chanos chanos</i> #	AD AS (15‰) AM (35‰)	0‰, 15‰ e 35‰	Expressão HSP90	Rim	2 semanas	Sem variação para nenhuma espécie em nenhuma condição	Tang <i>et al.</i> 2009
<i>Oreochromis mossambicus</i> #	AD	25‰ 35‰	Expressão HSP70 e HSP90	Cérebro	1, 2, 4, 8 e 24 horas 1, 2 e 4 horas	Aumento com o aumento de salinidade e com o tempo de exposição	Yang <i>et al.</i> 2009

\* AD = Água Doce; AS = Água Salobra; AM = Água do Mar.

# = espécie eurihalina

para a tilápia *O. mossambicus* exposta a 10‰, 35‰, 45‰ e 60‰ por 4 semanas (Kültz et al. 1992). O aumento da AAC branquial acompanhando o aumento da salinidade observado para as espécies estudadas no presente estudo foram descritos para outras espécies de peixes dulcícolas expostos à elevação de salinidade, por exemplo, a espécie anádroma de salmão *Oncorhynchus kisutch* (Salmoniformes) expostos a água do mar (30-35‰), que apresentou elevação da AAC branquial e sanguínea quando comparados animais em água doce (Zbanyszek e Smith 1984) e na espécie marinha *Opsanus beta* (Batrachoidiformes) expostos 60‰ por duas semanas (Sattin et al. 2010). A elevação nos níveis de AAC branquial encontrados neste trabalho pode ser explicada como uma resposta à alteração na salinidade do meio, visto que níveis altos da enzima auxiliam na liberação dos íons que tendem a serem absorvidos pelo animal osmoticamente menos concentrado que o ambiente e também ajudam a evitar a acidose respiratória (Arashisar et al. 2004; Evans et al. 2005; Gilmour e Perry 2009). A AAC branquial elevada em peixes expostos a estresse salino também pode atuar no aumento na capacidade de hidratação do CO<sub>2</sub>, aumentando a disponibilidade de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup> e garantindo assim uma melhor retenção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pelo transporte através da membrana basolateral e/ou secreção de H<sup>+</sup> através da membrana apical (Sattin et al. 2010).

Entretanto, pode não haver relação entre a AAC e a variação de salinidade, como demonstrado aqui para as espécies *I. punctatus* nas brânquias e *C. gariepinus* e *C. carpio* nos rins, resultados esses que se assemelham aos encontrados para a espécie marinha *Platichthys flesus* aclimatada por duas semanas à água do mar (35‰) e água do mar diluída (5‰) (Mashiter e Morgan 1975; Sender et al. 1999) e para o baiacu marinho *Tetraodon nigroviridis* também adaptados a água doce e água do mar após duas semanas de exposição (Tang e Lee 2007).

A AAC renal de *R. quelen*, *I. punctatus* e *O. niloticus* apresentou aumento com elevação da salinidade, porém *C. gariepinus* e *C. carpio* mantiveram a atividade constante. Trabalhos onde a AC renal foi inibida demonstram que a falta da enzima pode levar a uma acidose metabólica em peixes, pois a AC nesse órgão é responsável pela reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Arashisar et al. 2004).

Como proposto anteriormente (Randall e Brauner 1998, Souza-Bastos e Freire 2009), também foi encontrado nesse trabalho que a atividade nas brânquias foi maior que nos rins. Para os peixes marinhos antárticos *Chionodraco hamatu* e *Trematomus bernacchii* e para o catádromo *Anguilla anguilla*, a AAC constitutiva foi maior nas brânquias quando comparado a AAC renal, sanguínea e intestinal (Maffia et al. 2001). Portanto os níveis maiores

encontrados nas brânquias podem ser explicados pela função mais significativa desse órgão tanto na regulação iônica e na regulação ácido-base, frente à alteração ambiental de salinidade, possivelmente porque a brânquia é o órgão que está diretamente em contato com a água, é metabolicamente mais ativo, e é um dos primeiros a iniciar a resposta fisiológica a alteração salinas (Evans *et al.* 1999; 2005).

Os indivíduos de *C. gariepinus* apresentaram uma AAC muito menor comparada às demais espécies estudadas. Apesar da repetição dos experimentos, e do aumento do número amostral, esse padrão se manteve na brânquia e no rim. Esse fato pode ser explicado por mecanismo de resposta não estudados neste trabalho, ou por ser uma característica particular da espécie.

### 5.3 Osmolalidade e Teor Hídrico

A concentração osmótica plasmática das espécies estudadas foi elevada frente à exposição às salinidades de 15‰ e 30‰. Acompanhando a elevação da osmolalidade, foi observada uma redução no teor hídrico muscular na maioria das espécies, com exceção de *C. carpio*. Geralmente em um meio mais concentrado a tendência osmótica é de que haja maior entrada de íons, acarretando o aumento da concentração iônica do extracelular quando o animal não possui mecanismos eficientes para manutenção dos gradientes com o meio externo. Com uma osmolalidade extracelular mais elevada, o meio intracelular tende a perder água para compensar a diferença de concentrações, ou seja, o plasma fica mais concentrado osmoticamente e o tecido muscular fica menos hidratado (Marshall e Grosell 2005; Evans e Claiborne 2009). Porém, em organismos considerados altamente osmorreguladores a concentração osmótica extracelular varia pouco, mesmo quando há grandes alterações na salinidade do ambiente, e conseqüentemente, o líquido intracelular é pouco alterado (Roy *et al.* 2007). Como as espécies não mantiveram essa característica osmorregulatória, nenhuma delas foi considerada altamente osmorreguladora frente ao estresse salino.

No presente trabalho os valores da osmolalidade dos animais na condição controle foi semelhante ao encontrado para outras espécies de teleósteos dulcícolas (Marshall e Grosell 2005; Evans e Claiborne 2009). Todas as espécies, com exceção de *G. brasiliensis*, apresentaram aumento significativo da concentração osmótica do plasma frente a um estresse salino, principalmente após a exposição a 30‰, e algumas até mesmo em 15‰, como foi o caso de *C. gariepinus* e *I. punctatus*. *R. quelen* apesar de conseguir regular a osmolalidade em 15‰, foi a espécie que apresentou maior aumento deste parâmetro quando em 30‰,

demonstrando que o choque salino foi forte o suficiente para alterar a capacidade osmorregulatória dos animais. *C. gariepinus* e *I. punctatus* sofreram diminuição da função da osmorregulatória já em salinidade 15‰, e a tendência continuou em 30‰. *O. niloticus* e *C. carpio* foram as espécies que apresentaram a menor variação na osmolalidade, apesar de haver um aumento do controle para 30‰, essa diferença foi menor, comparada com as demais espécies.

Quando a capacidade de regulação osmótica é perdida, toda a concentração eletrolítica é alterada, danificando o potencial de membrana; conseqüentemente não há mais excitação celular, as funções são interrompidas e a célula morre (Holmes e Donaldson 1969). Quando há alteração na regulação osmótica, ao serem expostas a variações hipo ou hiper-osmóticas, as células são submetidas à entrada ou saída excessiva de água, o que pode gerar a lise ou o murchamento das mesmas, e esse processo quando irreversível é fatal (Herrera *et al.* 1989; Deaton 1996; Lang *et al.* 1998).

Os mecanismos ativados para que os íons não entrem em excesso, nem que a perda de água seja vital para a célula, é que garantem a sobrevivência do organismo em uma condição estressante. Teleósteos eurihalinos conseguem sobreviver em ambientes com variação na salinidade do meio porque possuem a capacidade de osmorregular seu meio interno, através do controle da composição do fluido extracelular e da manutenção da hidratação tecidual (Freire *et al.* 2008; Tang *et al.* 2009). Com os resultados encontrados, mesmo as espécies estudadas consideradas eurihalinas não conseguiram manter a regulação do meio interno, logo para sobreviverem a aumentos de salinidade como os testados, elas teriam que ativar outros mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse, como expressão de HSP70 ou aumento na atividade de enzimas osmorregulatórias.

*R. quelen* apresentou diminuição da hidratação em 15‰ e 30‰, diferentemente da osmolalidade que ele conseguiu manter em 15‰, mas também perdeu a capacidade regulatória em 30‰. Esse resultado corrobora com autores que mantiveram indivíduos da mesma espécie expostos a salinidades de 25‰ durante uma hora e também encontraram aumento na osmolalidade e diminuição na hidratação muscular (Souza-Bastos e Freire 2008).

*C. gariepinus* conseguiu manter o teor hídrico estável em 15‰, porém em 30‰ apresentou diminuição da hidratação muscular, acompanhando a elevação da osmolalidade. Dentre as espécies de Siluriformes, *I. punctatus* foi a que apresentou maior diminuição na hidratação do músculo, uma diferença de cerca de 7% do controle em relação aos expostos a 30‰, que corroborou com o aumento de 68% na osmolalidade em 30‰. Mesmo

apresentando níveis de HSP70 altos e constantes o choque osmótico levou a danos fisiológicos irreversíveis nas células. Autores encontraram aumento na concentração iônica de *I. punctatus* expostos a 12‰ por 5 dias (Davis e Simco 1976), e também observaram aumento de ~23% na osmolalidade em animais expostos por 6 horas à ~14‰ (Eckert *et al.* 2001), aumento menor do que o encontrado no presente trabalho para 15‰, que foi de ~68%.

Indivíduos de *G. brasiliensis* expostos a 15‰ não variaram a hidratação muscular, corroborando com Freire *et al.* (2008), que também não encontraram variação de hidratação do músculo em indivíduos expostos por 7 horas a 15‰. Houve diminuição da hidratação em 30‰ nesta espécie, e essa salinidade mais elevada não foi testada pelos outros autores. Para a osmolalidade, a constância da osmolalidade nas condições experimentais pode ter ocorrido pelo baixo número de n amostral, visto que o teor hídrico muscular diminuiu significativamente, era esperado que a concentração osmótica aumentasse, como encontrado para indivíduos da mesma espécie que expostos a 15‰, tiveram um aumento de 53% na osmolalidade (Freire *et al.* 2008).

*C. carpio* obteve uma diminuição da hidratação do músculo apenas em 15‰, e em 30‰ manteve-se igual ao controle. Esse resultado é contrastante com o de osmolalidade, no qual os indivíduos mantiveram a concentração osmótica constante em 15‰ e sofreram uma elevação pequena em 30‰. Assim como *G. brasiliensis*, a possibilidade é de que o n amostral tenha sido insuficiente para análise do teor hídrico destes indivíduos, necessitando de mais experimentos para confirmação dos resultados na salinidade 15‰. Apesar da comprovação da tolerância a salinidades menores ou iguais a 15‰ para a espécie (Black 1957; Geddes 1979; Wang *et al.* 1997; De Boeck 2000; Cardona *et al.* 2008), poucos são os trabalhos que relacionam essa variável a parâmetros fisiológicos como osmolalidade e teor hídrico muscular. Dados mais antigos confirmam a osmolalidade em água doce de *C. carpio* sendo de 240 a 285 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O (Black 1957; Geddes 1979) e a manutenção das osmorregulação em indivíduos expostos a até 10,5‰ (concentração interna isosmótica ao meio externo = 300 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O), porém foi detectado que a partir dessa salinidade os indivíduos se tornam osmoconformadores (de 247 para 430 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O), e ao alcançar 15‰, há mortalidade (Geddes 1979). Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo em relação à letalidade em salinidades maiores que 15‰, porém são contrastantes em relação a osmoconformação em 15‰, já que os animais deste estudo mantiveram a osmolalidade nessa salinidade.

*O. niloticus* apresentou uma perda significativa no teor hídrico muscular quando em 30‰, corroborando com a osmolalidade que teve um aumento de 33% aumento nessa mesma condição salina, resultado similar ao encontrado para a tilápia do mesmo gênero, *O. mossambicus*, que obteve aumento de ~34% na osmolalidade após exposição de 6 horas em salinidade 30‰ (Hwang *et al.* 1989), e aumento de ~12% após 6-8 horas em salinidade 25‰ (Kammerer *et al.* 2009). Apesar de *O. niloticus* não ter apresentando aumento da osmolalidade em 15‰ neste trabalho, indivíduos da mesma espécie expostos por 72 horas à 18‰ obtiveram aumento de ~32% na concentração de íons plasmáticos (Karşı e Yildiz 2005). Outros estudos, porém, com a tilápia *O. mossambicus* exposta a estresse hiper-salino de 35‰ por 3, 24 horas (Sardella *et al.* 2004) e duas semanas (Tang *et al.* 2009) não indicaram alteração na osmolalidade nem no teor hídrico muscular, resultados esses que diferem do encontrado.

O controle da hidratação muscular e da osmolalidade indicam que os organismos podem estar aclimatados ao habitat, possuem capacidade osmorregulatória e um grau de eurihalinidade. O grau de eurihalinidade da espécie está diretamente relacionado à como o organismo regula sua concentração osmótica do plasma, e se consegue manter seu conteúdo de água no músculo estável mesmo quando há alterações de salinidade (Prodocimo e Freire 2006; Freire *et al.* 2008; Prodocimo *et al.* 2008). Geralmente espécies de teleósteos mais eurihalinas não alteram drasticamente o conteúdo de água no músculo quando aclimatados a diferentes salinidades (Prodocimo *et al.* 2008; Tang *et al.* 2009).

O fato das espécies não conseguirem regular seu meio interno, principalmente em 30‰, significa que ao serem submetidas a um aumento de salinidade, elas não são capazes de evitar a perda excessiva de água e o ganho de íons decorrente de um ambiente mais concentrado, havendo assim diminuição no teor hídrico muscular, ao passo que a osmolalidade aumentada indica a impossibilidade excretar suficientemente os sais em excesso (Marshall e Grossell 2005; Bradley 2009; Evans e Claiborne 2009).

Visto que a maioria das espécies não conseguiu tolerar 6 horas de exposição à salinidade de 30‰ e não conseguiram osmorregular seu meio interno, essa salinidade seria bastante impactante para os animais, podendo ser inclusive letal. A dificuldade enfrentada para regulação do meio interno seria um fator limitante na ocupação de novos habitats através de estuários, visto que indivíduos mais sensíveis, ou menos saudáveis, ou até mesmo indivíduos mais jovens, possivelmente não sobreviveriam aos períodos de maré onde as águas estão mais salgadas, ou não seriam capazes de invadir águas costeiras com salinidades

maiores. Para as espécies estudadas no trabalho, a invasão de águas com salinidade de 30‰ parece ser bastante custosa osmoticamente, algumas vezes acarretando na morte dos indivíduos.

#### 5.4 Ecofisiologia e Ocupação de Habitats

As espécies estudadas (tanto as invasoras quanto as nativas), com exceção da tilápia *O. niloticus*, apresentaram baixo grau de eurihalidade após exposição por 6 horas a salinidade de 15‰, não suportando exposição a 30‰ por períodos superiores a 3 horas. A elevação de salinidade demonstrou-se osmoticamente impactante, havendo uma perda na capacidade de manutenção da homeostase dos indivíduos, culminando na morte da maioria das espécies. As diferenças na ativação dos mecanismos de resposta podem ser explicadas pela ação espécie-específica de defesa frente ao fator estressante (Willmer et al. 2005).

Neste trabalho foi possível observar que os indivíduos de *R. quelen* conseguiram manter a osmolalidade e a AAC constantes em 15‰, porém houve uma perda de água no músculo e aumento na expressão de HSP70 na mesma salinidade, significando que salinidades iguais ou superiores a 15‰, como aconteceu em 30‰ (sobreviveram apenas ~1,5 horas) afetam sua capacidade osmorregulatória e podem ser letais. Estudos já demonstraram certo grau de eurihalidade em *R. quelen* nas salinidades de 5‰ e 15‰, reforçando que há perda da capacidade de manutenção da homeostase em salinidades de 25‰, corroborando registros de ocorrência esporádica da espécie em regiões estuarinas (Marchioro e Baldisserotto 1999; Souza-Bastos e Freire 2009). Espécies do gênero *Rhamdia* também ocorrem em habitats estuarinos (Loebmann e Vieira 2006; Milani e Fontoura 2007; Vargas e Bessonart 2007; Vitule 2007), o que salienta a plasticidade do grupo e corrobora com a ideia de possível invasão de novos ambientes em água salobras.

*C. gariepinus* da mesma forma que *R. quelen* sofreram aumento na osmolalidade já em 15‰, porém o teor hídrico muscular manteve-se constante na mesma salinidade. A expressão de HSP70 aumentou significativamente apenas em 30‰ (sobreviveram ~3 horas), e a AAC foi bastante baixa comparada às demais espécies, mas não foram respostas suficientes para evitar a perda da capacidade osmorregulatória com o aumento na salinidade.

Como demonstrado na literatura, a tolerância salina de *I. punctatus* seria de até 15‰ (Allen e Avault 1971; Stickney e Simco 1971; Perry 1973), e apesar dos indivíduos da espécie apresentarem altos níveis de expressão de HSP70 e as maiores AAC neste trabalho, mesmo em salinidade 15‰ eles sofreram perda da capacidade osmorregulatória tanto no meio intra



quanto no extracelular portanto essas respostas fisiológicas não foram suficientemente alta para evitar que a regulação osmótica fosse alterada em salinidades maiores que a natural.

Corroborando dados anteriores para a espécie, *G. brasiliensis* apresentou resistência à salinidade de 15‰, mantendo sua capacidade osmorregulatória (Freire *et al.* 2008), auxiliada possivelmente pelo aumento encontrado na expressão de HSP70 nessa salinidade. Porém em 30‰ houve diminuição no teor hídrico muscular, demonstrando uma perda de regulação osmótica, e conseqüentemente, perda da homeostase.

*O. niloticus* também apresentou capacidade osmorregulatória em 15‰, mantendo os níveis de HSP70 constantes, à AAC branquial elevada, porém, em 30‰ tanto a osmolalidade quanto o teor hídrico muscular sofreram alterações, e mesmo com a AAC branquial e renal elevadas, não conseguiu manter a regulação osmótica. Mesmo com estudos demonstrando que esta espécie é resistente à salinidade superior a 30‰ (Popper e Lichatowich 1975; Villegas 1990; Kamal 2005), foi possível identificar alterações fisiológicas que levaram a perda da homeostase e, mesmo havendo sobrevivência dos indivíduos nessa salinidade, sua dispersão por estuários poderia acontecer em água com salinidades próximas a 15‰, ao passo que em 30‰ o custo fisiológico e energético seria alto e limitante.

Para a *C. carpio* a literatura também aponta que a espécie é resistente a salinidades de até 15‰ (Crivelli 1981; Wang *et al.* 1997; De Boeck 2000; Cardona *et al.* 2008), como corroborado no presente trabalho, onde os indivíduos conseguiram manter a osmolalidade na mesma salinidade, sem apresentar alteração na expressão de HSP70 e na AAC branquial e renal. Porém em 30‰, com níveis de AAC branquial altos, houve diminuição da osmolalidade, e conseqüentemente, da capacidade de regulação osmótica.

O sucesso para ocupação de novos ambientes pelas espécies está ligado às características da história de vida do animal e à pré-adaptações ligadas a questões fisiológicas e evolutivas (Shea e Chesson 2002; Schofield e Nico 2009). Espécies geralmente consideradas como de água doce, podem na verdade tolerar variações de salinidade, possuindo uma plasticidade fisiológica ainda não estudada, podendo utilizar estuários tanto para alimentação, quanto para dispersão (Brown *et al.* 2001, 2007). Essa idéia, da ocupação de novos corpos d'água por estuários e águas costeiras, entretanto, é raramente considerada (Brown *et al.* 2001; Bringolf *et al.* 2005), pois esses ambientes são geralmente taxados como barreiras para dispersão (Brown *et al.* 2007).

Estuários são ambientes instáveis e, conseqüentemente, muito estressantes, mas espécies introduzidas geralmente conseguem se estabelecer e prevalecer em ambientes com

tais características por serem mais resistentes a variações ambientais (Elliott e Quintino 2007). Quando há variações na salinidade da água, como ocorre em regiões estuarinas, espécies estenohalinas tem pouca chance de sobrevivência, logo provavelmente acabam mudando para locais com condições mais favoráveis (Ubeda *et al.* 2009). Porém, espécies eurihalinas possuem grande potencial de dispersão por esses ambientes devido a sua plasticidade fisiológica que lhes garante suportar variações de salinidade sem alteração drástica em seus processos vitais (Bringolf *et al.* 2005; Brown *et al.* 2007; Rahel 2007; Rahel e Olden 2008).

Os resultados demonstram que as espécies dulcícolas estudadas possuem capacidade de ativação de mecanismos de resposta fisiológica frente a um estresse salino de até 15‰, que pode ser suficiente para dispersão por estuários. Essa capacidade fisiológica que garante vantagens na distribuição por novos ambientes foi demonstrada tanto para as espécies invasoras, quanto para as espécies nativas, sugerindo que o período de 6 horas seria suficiente para que os indivíduos alcançassem novos corpos d'água próximos aos de origem utilizando os estuários como pontes. A invasão de novos ambientes utilizando locais com salinidade de 30‰ ou superior, seria bastante custosa fisiológica e energeticamente, e possivelmente letal para essas espécies.

Devido à falta de estudos que avaliam os efeitos fisiológicos de parâmetros abióticos nas espécies estudadas, reforça-se a necessidade de pesquisas complementares, afinal trata-se de espécies invasoras, sendo assim, a possibilidade de apresentar plasticidade fisiológica a muitos parâmetros provavelmente é elevada (Espínola e Julio 2007; Savini 2010). Levando em considerações os dados fisiológicos de resposta à alteração salina encontrados nesse trabalho, e possíveis estudos complementares que testem outras variáveis ambientais, tais como pH, temperatura e oxigênio, é possível extrapolar os resultados e considerar que essas espécies, de fato, podem sim utilizar estuários como pontes de dispersão e acentuar a problemática das invasões biológicas.

## 6. CONCLUSÕES

Não houve grandes diferenças de resposta fisiológica entre espécies nativas e invasoras. As espécies nativas *R. quelen* e *G. brasiliensis* e a invasora *C. gariepinus* tenderam a aumentar a expressão HSP70 com o aumento da salinidade. Em geral, não houve um padrão na expressão de HSP70 entre as espécies estudadas, inferindo que a resposta é espécie-

específica, podendo variar de acordo com a intensidade e duração do estresse e com o tipo de tecido.

A anidrase carbônica apresentou um padrão de aumento da atividade branquial e renal decorrente do aumento na salinidade, mas algumas espécies (brânquia de *I. punctatus* e rim de *C. gariepinus* e *C. carpio*) mantiveram a atividade constante apesar da variação salina. A AAC pode ter aumentado tanto em resposta ao aumento de salinidade, quanto para suprir a função de equilíbrio ácido-básico, não sendo possível afirmar a exclusividade na resposta osmorregulatória. A osmolalidade e o teor hídrico apresentaram um padrão de variação inversamente proporcional entre eles na maioria das espécies. Conclui-se que as espécies perderam a capacidade regulatória do meio intra e extracelular frente ao aumento na salinidade.

Os resultados indicaram que as espécies classificadas como de água doce, possuem tolerância a variações salinas, e podem utilizar estuários com salinidades de até 15‰ como pontes de dispersão para outros corpos d'água continentais. Além disso, reforça-se que as espécies estudadas possuem resistência fisiológica ao estresse salino, revelando certo grau de eurihalinidade.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abukhalaf, I.K.; Covington, S.; Zimmerman, E.G.; Dickson, K.L.; Masaracchia, R.A.; Donahue, M.J. (1994). Purification of the 70-kDa heat-shock protein from catfish liver: immunological comparison of the protein in different fish species and its potential use as a stress indicator. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 1251–1257.
- Ackerman, P. A.; Forsyth, R. B.; Mazur, C. F.; Iwama, G. K. (2000). Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23:327 -336.
- Adeyemi, O.; Oginni, O.; Osubor, C.C.; Adeyemi, O.; Oloyede, O.B.; Oladiji, A.T.; Adebayo E.A. (2009). Effect of water contaminated with phthalate, benzene and cyclohexane on *Clarias gariepinus*' cellular system. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 47: 1941-1944.
- Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. (2007). *Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil*. EDUEM, Maringá, 501p.
- Ahmed, M.I.; Ambali, A.G.; Baba, S.S. (2010). Tissue responses of *Clarias gariepinus* (Catfish) to experimental *Eimeria subepithelialis* infection. *Veterinary Parasitology*, 4,171(3-4):181-4.
- Allen, K. O.; Avault, J. W. (1971). Notes on the relative salinity tolerance of channel and blue catfish. *Progressive Fish-Culturist*, 33: 135–137
- Alvarez-Lajonchère, L.; Tsuzuki, M.Y. (2009). A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture. *Latin America Journal of Aquatic Research*. 39 (7):684–700.
- Arashisar, S.; Hisar, O.; Yanik, T.; Aras, S.M. (2004). Inhibitory effects of amonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17: 125-128
- Attayde, J. L.; Okun, N.; Brasil, J.; Menezes, R. F.; Mesquita, P. (2007). Impactos da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos do Bioma Caatinga. *Oecologia Brasiliensis*, 11: 450-461.
- Babitha, G.S.; Peter, M.C.S. (2010). Cortisol promotes and integrates the osmotic competence of the organs in North African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell): Evidence from in vivo and in situ approaches. *General and Comparative Endocrinology*, 168: 14-21.
- Bain, M. B. (1993). Assessing impacts of introduced aquatic species: grass carp in large systems. *Environmental Management*, 17(2): 211-224.

- Baldry, I. (2000). Effect of Common Carp (*Cyprinus carpio*) on Aquatic Restorations. On-line: <http://conservancy.umn.edu/bitstream/60111/1/6.6.Baldry.pdf>. Acessado em 11/2010.
- Baltz, D.M.; Moyle P.B. (1993). Invasion resistance to introduced species by a native assemblage of California stream fishes. *Ecological Applications*, 3: 246-255.
- Basu, N.; Todgham, A. E.; Ackerman, P. A.; Bibeau, M. R.; Nakano, K.; Schulte, P. M.; Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295:173 -183.
- Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. (2007). *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.
- Bensaude, O.; Pinto, M.; Dubois, M. F.; Van Trung, N.; Morange, M. (1990). Protein denaturation during heat shock and related stress. In: M.J. Schlesinger, M.G. Santoro and E. Garaci, Editors, *Stress Proteins: Induction and Function*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 89–99.
- Berra, T. (2001). *Freshwater Fish Distribution*. Academic, London, UK
- Billard, R. (2001). *Carp: Biology and Culture*. New York: Springer-Verlag.
- Black, V.S. (1957). Excretion and osmoregulation. In *The physiology of fishes*. Vol. 1. Metabolism. Edited by M.E. Brown. Academic Press, Inc., New York, pp. 163–205.
- Bockmann, F.A.; Guazzeli G.M. (2003). Heptapteridae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. and Ferraris, C.J. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre. Edipucrs, 406-431.
- Boisen, A. M. Z.; Amstrup, J.; Novak, I.; Grosell, M. (2003). Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1618: 207-218.
- Borges, A.; Siqueira, D.R.; Jurinitz, D.F.; Zanini, R.; Amaral, F.; Grillo, M.L.; Oberst, E.R.; Wassermann, G.F. (2005). Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 45-53.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Bradley, T.J. (2009). *Animal Osmoregulation*. Oxford Univ. Press. 320 p.

- Bringolf, R. J.; Kwak, T. J.; Cope, W. G.; Larimore, M. S. (2005). Salinity tolerance of flathead catfish: Implications for dispersal of introduced populations. *Transactions of the American Fisheries Society*, 134: 927–936.
- Britski, H.A.; Silimon, K.Z.S.; Lopes, B.S. (1999). *Peixes do Pantanal*. Brasília, Embrapa, 184p.
- Brown, J. A.; Scott, D. M.; Wilson, R.W. (2007). Do estuaries act as saline bridges to allow invasion of new freshwater systems by non-indigenous fish species? Chapter 21, 401-414. In: *Biological Invaders in Inland Waters: Profiles, Distribution and Threats. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology Vol 2*. Ed. F. Gherardi. Springer
- Brown, J.A.; Moore, W.M.; Quabius, E.S. (2001). Physiological effects of saline waters on zander. *Journal of Fish Biology*, 59:1544– 1555
- Bruton, M.N. (1978). The habitats and habitat preferences of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in a clear coastal lake (Lake Sibaya, South Africa). *Journal of the Limnological Society of South Africa*, 4: 81- 88.
- Bruton, M.N. (1979). The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (Pisces, clariidae) in Lake Sibaya, South Africa, with a review of breeding species of the subgenus *Clarias* (*Clarias*). *Transactions of the Zoological Society of London*, 35: 1-45.
- Buckley, B. A.; Hofmann, G. E. (2004). Seasonal patterns and in vitro kinetics of HSF1 activation and Hsp70 mRNA production in the goby, *Gillichthys mirabilis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 570–581.
- Camargo, S.O.; Pouey, J.L.; Martins, C. (2005). Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. *Ciência Rural*, 35: 1406-1411.
- Cambray, J.A. (2003). The need for research and monitoring on the impacts of translocated sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*, in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, 28: 191-195.
- Cara, J.B.; Aluru, N.; Moyano, F.J.; Vijayan, M.M. (2005). Food-deprivation induces Hsp70 and HSP90 protein expression in fry gilthead sea bream and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 142: 426–431.
- Cardona, L.; Hereu, B.; Torras, X. (2008). Juvenile bottlenecks and salinity shape grey mullet assemblages in Mediterranean estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77: 623–632.

- Carneiro, P. C. F.; Mikos J. D. (2005). Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, *Ciência Rural*, 35(1): 187-191.
- Carroll, R. L. (1988). *Vertebrate Paleontology and Evolution*. W. H. Freeman and Company, New York, 698pp.
- Casal, C.M.V. (2006). Global documentation of fish introductions: the growing crisis and recommendations for action. *Biological Invasions*, 8: 3-11.
- Cavin, L.; Forey, P. L.; Lecuyer, C. (2006). Correlation between environment and Late Mesozoic ray-finned fish evolution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 245: 353-367
- Cerqueira, V.R.; Tsuzuki, M.Y. (2008). A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1573-5168.
- Cervigón, F.; Cipriani, R.; Fischer, W.; Garibaldi, L.; Hendrickx, M.; Lemus, A.J.; Márquez, R.; Poutiers, J.M.; Robaina, G.; Rodriguez, B. (1992). Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América. FAO, Rome. 513 p.
- Chakrabarty, P. (2004). Cichlid biogeography: comment and review. *Fish and Fisheries*, 5: 97-119.
- Chang, I.C.; Hwang, P.P. (2004).  $\text{Cl}^-$  uptake mechanism in freshwater adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 406-414.
- Choi, C.Y.; An, K.W. (2008). Cloning and expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 149: 91-100.
- Ciavarra, R. P.; Simeone, A. (1990). T lymphocyte stress response. *Cellular Immunology* 129:363.
- Claiborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. (2002). Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 302-319.
- Claireaux, G.; Audet, C. (2000). Seasonal changes in the hypo-osmoregulatory ability of brook charr: the role of environmental factors. *Journal of Fish Biology*, 56: 347-373.
- Clark, M.S.; Fraser, K.P.P.F.; Peck, L.S. (2008). The HSP70 heat shock response in Antarctic marine molluscs. *Cell Stress Chaperones* 13.

- Collares-Pereira, M.J.; Cowx, I.G. (2004). The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. *Fisheries Management and Ecology*, 11: 303–312.
- Copp, G.H.; Garthwaite, R.; Gozlan, R.E. (2005). Risk identification and assessment of non-native freshwater fishes: concepts and perspectives on protocols for the UK. Cefas Science Technical Report N<sup>o</sup>. 129, Cefas, Lowestoft. 32pp.
- Cowx I.G. (2002). Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges, p. 201-220. In: Collares-Pereira, M.J., Cowx, I.G. and Coelho, M.M., (Eds.) *Conservation of Freshwater Fishes: Options for the Future*. Blackwell Science, Oxford, 462p.
- Crivelli A.J. (1981). The biology of the common carp, *Cyprinus carpio* L. in the Camargue, southern France. *Journal of Fish Biology*, 18: 271–290.
- Currie, S.; Tufts, B.L. (1997). Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells, *Journal of Experimental Biology*, 200: 607–614.
- Dahlhoff, E.P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology*, 66: 183-207.
- Davis, K. B.; Simco, B. A. (1976). Salinity effects on plasma electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33: 741–746.
- De Boeck, G.; Smet, H.; Blust, R. (2000). The energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to salt stress: an increase in energy expenditure or effects of starvation? *Physiological and Biochemical Zoology*, 73: 102-11.
- De Graaf, G.; Galemoni, F.; Banzoussi, B. (1995). The artificial reproduction and fingerling production of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in protected and unprotected ponds. *Aquaculture Research*, 26: 233-242.
- De Graaf, G.; Janssen, H. (1996). Artificial reproduction and pond rearing of the African catfish *Clarias gariepinus* in sub-Saharan África – A handbook. N<sup>o</sup> 362. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 73p.
- De Wachter, B.; Scholliers, A.; Blust, R. (1998). Semiquantitative immunoblot detection of 70 kDa stress proteins in the carp *Cyprinus caprio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 37–44.
- Deane, E.E.; Kelly, S.P.; Luk, J.C.Y.; Woo, N.Y.S. (2002). Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulinlike growth factor I expression in black sea bream. *Marine Biotechnology*, 4: 193–205.



- Deane, E.E.; Woo, N.Y. (2004). Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R1054-R1063.
- Deaton, L. E. (1996). Comparative aspects of cellular volume regulation in cardiomyocytes. *Invited Perspectives in Physiological Zoology*. 70: 379 – 390,
- Delaney, M.A.; Klesius, P.H. (2004). Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 236: 633-644.
- DiDomenico B.J.; Bugaisky, G.E.; Lindquist, S. (1982). Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79: 6181–6185.
- Ditrich, H. (2007). The origin of vertebrates: a hypothesis based on kidney development. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 150: 2, 435-441
- Donnelly, B.G. (1973). Aspects of behaviour in the catfish *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) during periods of habitat desiccation. *Arnoldia*, 6: 1-8.
- Drenner, R.W.; Gallo, K. L.; Edwards, C. M.; Rieger, K.E.; Dribble, E. C. (1997). Common carp affect turbidity and angler catch rates of largemouth bass in ponds. *North American Journal of Fisheries Management*, 12: 1010–1013.
- Dyer, S.D.; Dickson, K.L.; Zimmerman, E.G.; Sanders, B.M. (1991). Tissue specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Canadian Journal of Zoology*, 69: 2021–2027.
- Eckert, S. M.; Yada, T.; Shepherd, B.S.; Stetson, M. H.; Hirano, T.; Grau E.G. (2001). Hormonal Control of Osmoregulation in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 122: 270-286.
- Efremova, S.M.; Margulis, B.A.; Guzhova, I.V.; Itskovich, V.B.; Lauenroth, S.; Muller, W.E.G.; Schroder, H.C. (2002). Heat shock protein hsp70 expression and DNA damage in baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from baikalsk pulp and paper plant. *Aquatic Toxicology*, 57: 267–280
- Elliott M.; Quintino V. (2007). The estuarine quality paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 640–645.
- Elvira, B. (2001). Identification of non-native freshwater fishes established in Europe and assessment of their potential threats to the biological diversity. *Convention on the*

- conservation of European wildlife and natural habitats, Council of Europe, working document T-PVS. 6, 35 pp.
- Espínola, L.A.; JULIO, H.F. (2007). Espécies invasoras: conceitos, modelos e atributos. *Interciencia*, 32 (9): 580-585.
- Evans D.H.; Piermarini, P.M.; Potts, W.T.W. (1999). Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, 283: 641–652.
- Evans, D.H. (1993). *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Evans, D.H. and Claiborne, J.B. (2009), Osmotic and ionic regulation in fishes. In: D.H. Evans, Editor, *Osmotic and ionic regulation: cells and animals*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 295–366.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. & Choe, K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.
- Fader, S.C., Yu, Z. and Spotila, J.R. 1999. Seasonal variation in Hsps (Hsp70) in stream fish under natural conditions. *Journal of Thermal Biology*, 19: 335-341.
- Feder, M. E.; Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243-282.
- Ficke, A. A.; Myrick, C. A.; Hansen, L. J. (2005). Potential impacts of global climate change on freshwater fishes. World Wide Fund for Nature, Gland, Switzerland.
- Fink, A. L.; Goto, Y. (1998). *Molecular chaperones in the life cycle of proteins: structure, function, and mode of action*. New York: Marcel Dekker.
- Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79: 425-449.
- Fink, S.V.; Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 72: 297-353.
- Flik, G.; Van Der Velden, J.A.; Dechering, K.J.; Verbost, P.M.; Schoenmakers, T.J.M.; Kolar, Z.; Wendelaar Bonga, S.E. (1993).  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: A Review. *Journal of Experimental Zoology*, 265: 356-365.
- Fortes, E.; Hoffmann, R. P.; Scariot, J. (1998); *Lernaea cyprinacea* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Copepoda) parasitando peixes de água doce da grande Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 20 (2): 64-65, Porto Alegre.
- Freire, C.A.; Amado, E.M.; Souza, L.R.; Veiga, M.P.T.; Vitule, J.R.S.; Souza, M.M.; Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of

- habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 149: 435–446.
- Froese, R.; D. Pauly. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (09/2010).
- Fuller, P.L.; Nico, L.G.; Williams, J.D. (1999). *Nonindigenous Fishes Introduced into Inland Water of the United States*. Bethesda, American Fisheries Society Special Publication, 613p.
- Furtado, J.F.R. (1995). *Piscicultura: Uma Alternativa Rentável*. Guaíba: Agropecuária, 180p.
- Fyhn, H.J.; Finn, R.N.; Reith, M.; Norberg, B. (1999). Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptive evolution of teleost fishes to seawater. *Sarsia*, 84: 451–456.
- Geddes M. C. (1979). Salinity tolerance and osmotic behavior of European carp (*Cyprinus carpio* L.) from River Murray. Australia. *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 103(7): 185-189.
- Georgalis, T.; Perry, S. F.; Gilmour, K. M. (2006). The role of branchial carbonic anhydrase in acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 209: 518 -530.
- Gething, M.J. (1997). *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein - Folding Catalysts*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press
- Gilmour, K.M.; Perry, S.F. (2009). Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212: 1647–1661.
- Goss, G.G.; Perry, S.F.; Fryer, J.N.; Laurent, P. (1998). Gill Morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 119: 107–115.
- Griffith, R.W. (1985). Habitat, phylogeny and the evolution of osmoregulatory strategies in primitive fishes. In: Foreman, R.E., Gorbman, A., Dodd, J.M., Olsson, R. (Eds.), *Evolutionary Biology of Primitive Fishes*. Plenum Press, New York, pp. 69–80.
- Harley, C.G.; Hughes, A.R.; Hultgren, K.M.; Miner, B.G.; Sorte, C.J.B.; Thornber, C.S.; Rodriguez, L.F.; Tomanek, L.; Williams, S.L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9: 228-241.
- Harvey, W.R.; Maddrell, S.H.P.; Telfer, W.H.; Wiczorek, H. (1998). H<sup>+</sup> V-ATPases energize animal plasma membranes for secretion and absorption of ions and fluids. *American Zoology*, 38: 426-441.

- Haswell, M.S.; Raffin, J-P.; LeRay, C. (1983). An investigation of the carbonic anhydrase inhibitor in eel plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 74: 175-177
- Helmuth, B.; Harley, C. D. G.; Halpin, P. M.; O'Donnell, M.; Hofmann, G. E.; Blanchette, C. A. (2002). Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. *Science* 298: 1015–1017.
- Henry, R.P.; Swenson, E.R. (2000). The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Resp. Physiology*, 121: 1–12.
- Heredia, T.R.; Tremblay, G.C.; Bradley, T.M. (1999). Hsp70 and a 54kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology*, 284: 286–298.
- Heredia-middleton, P.; Brunelli, J.; Drew, R. E.; Thorgaard, G. H. (2008). Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 149: 552-556.
- Herrera, F. C.; López, I.; Egea, R.; Zanders, P. (1989). Short-term osmotic responses of cells and tissues of the sea anemone, *Condylactis gigantean*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A*, 92: 377-384.
- Hightower, L. E. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell*, 56: 191-197.
- Hightower, L.E.; Norris, C.E.; DiIorio, P.J.; Fielding, E. (1999). Heat shock response of closely related species of tropical and desert fish. *American Zoologist* 39, pp. 877–888.
- Hoffman, G. E.; Somero, G. N. (1995). Evidence for protein damage at environmental temperature: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and Hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *Journal of Experimental Biology*, 198: 1509-1518.
- Hofmann, G.E. (2005). Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 247-255.
- Hofmann, G.E.; Buckley, B.A.; Airaksinen, S.; Keen, J.E.; Somero, G.N. (2000) The Antarctic fish *Trematomus bernachii* lacks heat inducible heat shock protein synthesis. *Journal of Experimental Biology*, 203: 2331-2339.
- Holmes, W. N.; Donaldson, E. M. (1969). The body compartments and the distribution of electrolytes. In: W. S. Hoar and D. J. Randall (Editors), *Fish Physiology*. Vol. 1. Academic Press, New York, NY, pp. 1-89.

- Hwang, P.P.; Fang, M.J.; Tsai, J.C.; Huang, C.J.; Chen, S.T. (1998). Expression of mRNA and protein of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase a subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 363-373.
- Hwang, P.P.; Sun, C.M.; Wu, S.M. (1989). Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na-K-ATPase activity in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during seawater acclimation. *Marine Biology*, 100: 295-299.
- Imad K. Abukhalaf, Earl G. Zimmerman, Kenneth L. Dickson, Ruthann A. Masaracchia, Manus J. Donahue, Sean Covington
- IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). (2010). A Compilation of Information Sources for Conservation Managers. <http://www.issg.org>. Acessado em 20/12/2010
- Iwama, G.K.; Vijayan, M.M.; Forsyth, R.B.; Ackerman, P.A. (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39: 901-909.
- Iwama, J.K.; Afonso, L.O.B.; Todgham, A.; Ackerman, P.; Nakano, K. (2004). Are hsp suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207: 15-19.
- Iwama, K.G.; Thomas, T.P.; Forsyth, B.R.; Vijayan, M.M. (1998) Heat shock expression in fish. *Reviews of Fish Biology and Fisheries*, 8:35–56.
- Jackson, D. A.; Mandrak, N.E. (2002). Changing fish biodiversity: predicting the loss of cyprinid biodiversity due to global climate change. Pages 89–98 in N. A. McGinn, editor. *Fisheries in a Changing Climate*. Symposium 32. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Jensen, M.K.; Madsen, S.S.; Kristiansen, K. (1998). Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology*, 282: 290-300.
- Jobling, M. (1995). *Environmental Biology of Fishes*. Chapman e Hall, London.
- Jonsson, H.; Schiedek, D.; Goksøyr, A. (2006) Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. *Aquatic Toxicology*: 78S, S42–S48.
- Kamal, A.H.M.M.; Mair, G.C. (2005). Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, 247: 189-201.

- Kammerer, B.A.; Sardella, B. and Kültz, D. (2009). Salinity stress results in rapid changes in cell cycle of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelial cells, *Journal of Experimental Zoology*, 311A: 80–90.
- Karşı, A.; Yavuzcan Yildiz, H. (2005). Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11 (2): 139–141.
- Kelly, S.P.; Woo, N.Y.S. (1999). The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *Journal of Fish Biology*, 55: 732–750.
- Koban, M.; Graham, G.; Prosser, C.L. (1987). Induction of heat shock protein synthesis in teleost hepatocytes: effects of acclimation temperature. *Physiological Zoology*, 60: 290–296.
- Kolar, C.S., Lodge, D.M. (2000). Freshwater nonindigenous species: Interactions with Other Global Changes. In: Mooney HA, Hobbs RJ (2000) *Invasive Species in a Changing World*. Island Press. Washington, DC, EEUU. pp. 3–30.
- Kolar, C.S., Lodge, D.M. (2002). Ecological Predictions and Risk Assessment for Alien Fishes in North America. *Science*, 298: 1233–1236.
- Kottelat, M.; Freyhof, J. (2007). *Handbook of European Freshwater Fishes*. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 646 p.
- Kruitwagen, G.; Nagelkerken, I.; Lugendo, B.R.; Pratap, H.B.; Wendelaar Bonga, S.E. (2007). Influence of morphology and amphibious life-style on the feeding ecology of the mudskipper *Periophthalmus argentilineatus*. *Journal of Fish Biology*, 71:39–52.
- Kültz, D. (1996). Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells. *American Journal of Physiology*. 271: C1181–C1193
- Kültz, D.; Bastrop, R.; Jürss, K.; Siebers, D. (1992). Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. *Comparative Biochemistry Physiology Part B*, 102: 293–301.
- Lang, M. A. (1988). Correlation between osmoregulation and cell volume regulation. *American Physiological Society*, 252 (2): R768–773
- Lee, H. I.; Chapman, J. W. (2001). Nonindigenous species - an emerging issue for the EPA. A landscape in transition: effects of invasive species on ecosystems, human health, and EPA goals. U. S. E. P. Agency. Volume 2.

- Lionetto, M.G.; Maffia, M.; Capello, M.S.; Giordano, M.E.; Storelli, C.; Schettino, T. (1998). Effects of cadmium on carbonic anhydrase and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in ell, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120: 89-91.
- Loebmann, D.; Vieira, J.P. (2006). O impacto da pesca do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante) (Decapoda, Penaeidae) nas assembléias de peixes e siris do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23: 1016–1028.
- Luft, J.C.; Wilson, M.R.; Bly, J.E.; Miller, N.W.; Clem, L.W. (1996). Identification and characterization of a heat shock protein 70 family member in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 113: 169-74.
- Mack, R. N.; Simberloff, D.; Lonsdale, W.M.; Evans, H.; Clout, M.; Bazzaz, F.A. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, 10: 689–710.
- Maetz, J.; Garcia-Romeu, F. (1964). The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fresh-water fish, *Carassius auratus* II. Evidence for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> exchanges. *The Journal of General Physiology*, 47: 1209-1227.
- Maffia, M.; Rizzello, A.; Acierno, R.; Rollo, M.; Chiloiro, R.; Storelli, C. (2001). Carbonic anhydrase activity in tissues of the icefish *Chionodraco hamatus* and of the red-blooded teleosts *Trematomus bernacchii* and *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Biology*, 204: 3983–3992.
- Mancera, J.M.; McCormick, S.D. (1999). Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,30, 5-triiodo-L-thyronine on hypo-osmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 25-33.
- Marceniuk, A.P.; Ferraris Jr., C.J. (2003). Family Ariidae (sea catfishes). In: Reis, R.E.; Ferraris Jr., C.J. & Kullander, S.E. (Eds.). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central América*. Edipucrs, Porto Alegre, p.447-455.
- Marshall, W. S.; Grosell, M. (2005). Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In *Physiology of Fishes*. Vol. 3 (ed. D. Evans and J. B. Claiborne), pp. 177-230. Boca Raton: CRC Press.
- Marshall, W.S.; Bryson, S.E. (1998). Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*, 119: 97-106.

- Mashiter, K.; Morgan, M.R. (1975). Carbonic anhydrase levels in the tissues of flounders adapted to sea water and fresh water. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*, 1: 713–717.
- Mata, R.A.; Tidon, R.; Côrtes, L.G.; De Marco, P.; Diniz-Filho, J.A.F. (2010). Invasive and flexible: niche shift in the drosophilid *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). *Biological Invasions*, 12: 1231-1249.
- Maxime, V.; Pennee, J.P.; Peyraud, C. (1991). Effects of direct transfer from freshwater to seawater on respiratory and circulatory variables and acid–base status in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*, 161: 557–568.
- McCarty, J. P. (2001). Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, 15: 320–331.
- McCormick, S.D. (1995). Hormonal control of gill  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase and chloride cell function. In Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds), *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, vol. 14. Fish Physiology series. Academic Press, San Diego, pp. 285-315.
- McKenzie D.J.; Martinez, R.; Morales, A.; Acosta, J.; Morales, R.; Taylor, E.W.; Steffensen, J. F.; Estrada, M.P. (2003). Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *Journal of Fish Biology*, 63: 398–409.
- Marchioro, M. I.; Baldisserotto, B (1999). Sobrevivência de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural*, 29(2): 315-318
- Meffe, K.G.; Carroll, C.R. (1994). *Principles of Conservation Biology*. Sinauer, Sunderland, 600p.
- Meisner, J. D.; Rosenfeld, J. S.; Regier, H. A. (1988). The role of groundwater in the impact of climate warming on stream salmonines. *Fisheries*, 13(3):2-8.
- Mesa, M.G.; Weiland, L.K.; Wagner, P. (2002). Effects of acute thermal stress on the survival, predator avoidance, and physiology of juvenile fall chinook salmon. *Northwest Science*, 76: 118–128.
- Milani, P.C.C.; Fontoura, N.F. (2007). Diagnóstico da pesca artesanal na Lagoa do Casamento, sistema nordeste da Laguna dos Patos: Uma proposta de manejo. *Biociências*, 15: 82–125.



- Mo, T. (1991). Anatomy, relationships and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny. Theses Zoologicae 17, Koeltz Scientific Books, Koenigstein, vii + 216pp.
- Moyle, P.B.; Crain, P.K.; Whitener, K.; Mount, J.F. (2003). Alien fishes in natural streams: Fish distribution, assemblage structure, and conservation in the Cosumnes River, California, USA. *Environmental Biology of Fishes*, 67: 277–288.
- Moyle, P.B.; Marchetti, M.P. (2006). Predicting invasion success: freshwater fishes in California as a model. *Bioscience*, 56:515-524.
- Nakano, K.; Iwama, G. K. (2002). The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. *Comparative Biochemistry Physiology Part A*, 133: 79-94.
- Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the world*. 4th edition. New York: John Wiley and Sons. 601pp.
- Neville, L.E.; Murphy, S. (2001). Invasive Alien Species: Forging Cooperation to Address a Borderless Issue. *International Association for Ecology (INTECOL) Newsletter*, Spring/Summer, 2001: 3-7.
- Nico, L. (2011). *Rhamdia quelen*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. <http://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?speciesID=839>. Acessado em: 12/2010
- Niu, C.J.; Rummer, C.J.; Brauner, C.J.; Schulte, P.M. (2008). 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.*, 148: 437–444.
- Ohtsuka, K.; Hata, M., (2000). Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40 — a review, *International Journal of Hyperthermia*, 16: 231–245.
- Ojima, N.; Yamashita, M.; Watabe, S. (2005). Comparative expression analysis of two paralogous Hsp70s in rainbow trout cells exposed to heat stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1681: 99–106.
- Orsi, M.L.; Agostinho, A.A. (1999). Introdução de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(2): 557-560.
- Palmisano, A.N.; Winton, J.R.; Dickhoff, W.W. (2000). Tissue specific induction of hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Marine Biotechnology*, 2: 329-338.

- Parmesan, C. (2006). Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 637-669.
- Perry, S. F.; Laurent, P. (1990). The role of carbonic anhydrase in carbon dioxide excretion, acid-base balance and ionic regulation in aquatic gill breathers. In *Animal Nutrition and Transport Processes 2: Transport, Respiration and Excretion: Comparative and Environmental Aspects* (ed. J. P. Truchot and B. Lahlou), pp.39 -57. Basel: Karger.
- Perry, S.F.; Shahsavarani, A.; Georgalis, T.; Bayaa, M.; Furimsky, M.; Thomas, S.L.Y. (2003). Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. *Journal of Experimental Zoology*, 300A: 53–62.
- Perry, W. G. (1973). Notes on the spawning of blue and channel catfish in brackish water ponds. *Progressive Fish-Culturist*. 35, 164–166.
- Philippart, J. C.; Ruwet, J. C., (1982). Ecology and distribution of Tilapias. In: Pullin, R. S. V., and Lowe-McConnell, R. H. (eds): *The Biology and Culture of Tilapias*. pp. 15-60. ICLARM Conf. Proc. 7, ICLARM, Manila, Philippines.
- Place, S.P.; Hofmann, G.E. (2001). Temperature interactions of the molecular chaperone Hsc70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*, 204: 2675-2682.
- Place, S.P.; Hofmann, G.E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in a phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biology*, 28: 261-267.
- Place, S.P.; Zippay, M.L.; Hofmann, G.E. (2004). Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R429-R436.
- Popper, D.; Lichatowich, T. (1975). Preliminary success in predator control of *Tilapia mossambicus*, *Aquaculture*, 5: 213–214.
- Pough, F.H., Janis, C.M.; Heiser, J.B (2008). *A Vida dos Vertebrados*. São Paulo: Editora Atheneu.
- Prodócimo, V.; Freire, C.A. (2001). Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262: 243-253.

- Prodocimo, V.; Freire, C.A. (2004). Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to seawater dilution during ebb tide: a field experiment. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 37: 1-5.
- Prodocimo, V.; Freire, C.A. (2006). The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo- and hyper-regulation of plasma osmolality. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 142: 347-355.
- Prodocimo, V.; Galvez, F.; Freire, C.A.; Wood, C.M. (2007). Unidirectional Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. *Journal of Comparative Physiology B*, 177: 519-528.
- Prodocimo, V.; Souza, C.F.; Pessini, C.; Fernandes, L.C.; Freire, C.A. (2008). Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon shortterm salinity reduction. *Neotropical Ichthyology*, 6(4): 613-620.
- Querol, M.V.M.; Querol, E.; Pessano, E.F.C.; Azevedo, C.L.O. (2005). Ocorrência da carpa húngara, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) e disseminação parasitária, no arroio Felizardo, bacia do Médio Rio Uruguai, Uruguaiana, RS, Brasil. *Biodiversidade Pampeana*, 3:21-23.
- Rabergh, C. M. I.; Airaksinen, S.; Soitamo, A.; Bjorklund, H. V.; Johansson, T.; Nikinmaa, M.; Sistonen, J. (2000). Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *Journal of Experimental Biology*, 203: 1817-1824.
- Rahel, F. J. (2007). Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology*, 52: 696-710.
- Rahel, F. J.; Olden, J. D. (2008). Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species. *Conservation Biology* 22: in press.
- Rahel, F.J. (2002). Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33:291-315.
- Randall, D.J.; Brauner, C. (1998). Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 119: 3-8.
- Reis, E. G. (1993). Classificação das atividades pesqueiras na costa do Rio Grande do Sul e qualidade das estatísticas de desembarque. *Atlântica*, 15: 107-114.

- Reis, R.E. (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 124: 105–168.
- Rejmanek, M.; Richardson, D.M. (1996). What attributes make some plant species more invasive? *Ecology*, 77 (6): 1655-1661.
- Rícan, O.; Kullander, S.O. (2008). The Australoheros (Teleostei: Cichlidae) species of Uruguay and Paraná River drainages. *Zootaxa*, 1724: 1-51.
- Richards, J.G.; Semple, J.W.; Bystriansky, J.S.; Schulte, P.M. (2003). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Experimental Biology*, 206: 4475–4486.
- Ricklefs, R.E. (2003). *A Economia da Natureza*. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Riede, K. (2004). Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.
- Roy, L.A.; Davis, D.A.; Saoud, I.P.; Henry, R. P. (2007). Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 147: 404–411.
- Ruiz, G. M.; Carlton, J.T.; Grosholz, E.D.; Hines, A.H. (1997). Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *American Zoologist*, 37: 619-630.
- Saitoh, K.; Sado, T.; Mayden, R.L.; Hanzawa, N.; Nakamura, K.; Nishida, M.; Miya, M. (2006). Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 63(6): 826-841
- Sakai, A.K.; Weller, S.G.; Allendorf, F.W.; Holt, J.S.; Lodge, D.M.; Molofsky, J.; With, K.A.; Baughman, S.; Cabin, R.J.; Cohen, J.E.; Ellstrand, N.C.; McCauley, D.E.; O'Neil, P.; Parker, I.M.; Thompson, J.N. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305-32.

- Sakamoto, T.; Kozaka, T.; Takahashi, A.; Kawauchi, H.; Ando, M. (2001). Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture*, 193: 347-354.
- Sanders, B.M. (1993). Stress proteins in aquatic organisms – an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 49–75.
- Sardella, B.; Matey, V.; Cooper, J.; Gonzalez, R.J.; Brauner, C.J. (2004). Physiological, biochemical, and morphological indicators of osmoregulatory stress in California Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1399-413
- Sattin, G.; Mager E.M.; Grosell 2010. Cytosolic carbonic anhydrase in the gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 156: 169-175.
- Savini, D.; Occhipinti–Ambrogi, A.; Marchini, A.; Tricarico, E.; Gherardi, F.; Olenin, S.; Gollasch, S. (2010). The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. *Journal of Applied Ichthyology*. Special Issue: Alien Species in Aquaculture and Fisheries, 26(2): 1–7.
- Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins (Minireview). *The Journal of Biological Chemistry*; 265:12111–12114.
- Schmidt-Nielsen, K. (2002). *Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente*. 5.ed. São Paulo: Santos.
- Schofield, P.J.; Loftus, W.F. (2010): Why Ecophysiology Matters: Tools to Assess Invasiveness of Non-Native Aquatic Fauna in the Everglades. GEER 2010 Conference, July 12-16, Naples, FL . Book of Abstracts, pg.270
- Schofield, P.J.; Nico, L.G. (2009). Salinity tolerance of non-native Asian Swamp Eels (Teleostei: Synbranchidae) in Florida, USA: Comparison of three populations and implications for dispersal. *Environmental Biology of Fishes*, 85: 51-59.
- Schofield, P.J.; Peterson, M.S.; Lowe, M.R.; Brown-Peterson, N.J.; Slack, W.T. (2010) Effects of temperature and salinity on survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) established in southern Mississippi, USA. *Biological Invasions*. (In Review).
- Schulz, U.H.; Leuchtenberger, C. (2006). Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Brazilian Journal of Biology*, 66A: 565–574.

- Scott, G. R.; Claiborne, J. B.; Edwards, S. L.; Schulte, P. M.; Wood, C. M. (2005). Gene expression after freshwater transfer in gills and opercular epithelia of killifish: insight into divergent mechanisms of ion transport. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 2719 -2729
- Sender, S.; Bottcher, K.; Cetin, Y.; Gros, G. (1999). Carbonic anhydrase in the gills of seawater and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47: 43–50.
- Shea, K.; Chesson, P.L. (2002). Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 170-176.
- Smith, T.R., Tremblay, G.C., and Bradley, T.M., 1999. Hsp70 and a 54kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology*, 284: 286–298.
- Somero, G.N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 42: 780–789 .
- Souza-Bastos, L.; Freire, C.A. (2009). The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 289: 167–174.
- Spataru, P.; Viveen, W.J.A.R.; Gophen, M. (1987). Food composition of *Clarias gariepinus* (= *C. lazera*), (Cypriniformes, Clariidae) in Lake Kinneret (Israel). *Hydrobiologia*, 144: 77-82.
- Stewart, J.E. (2005). Environmental management and the use of sentinel species. *Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine disruptors, Part II*.
- Stickney, R. R., and Simco, B. A. (1971). Salinity tolerance of catfish hybrids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 100: 790–792.
- Swenson, E.R. (2003). A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 136: 229-241.
- Tang, C. H.; Lee, T.H. (2007). The novel correlation of carbonic anhydrase II and anion exchanger 1 in gills of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. *Journal of Experimental Zoology*, 307A: 411–418.
- Tang, C. H.; Tzeng, C. S.; Hwang, L. Y.; Lee, T. H. (2009). Constant muscle water contents and renal HSP90 expression reflect the osmotic homeostasis in euryhaline teleosts acclimatized to different environmental salinities. *Zoological Studies*, 48: 435-441.

- Taylor, J.N.; Courtenay, Jr.W.R.; McCann, J.A. (1984). Known impacts of exotic fishes in the continental United States, p. 322-373. In: W.R Courtenay Jr. & J.R. Stauffer (Eds.), *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 430 p.
- Teugels, G.G. (1986). A systematic revision of the African species of the genus *Clarias* (Pisces, Clariidae). *Zoologische wetenschappen*, 247: 23-41.
- Thompson, M.R.; Townsend, C.R. (2006). A truce with neutral theory: local deterministic factors, species traits and dispersal limitation together determine patterns of diversity in stream invertebrates. *Journal of Animal Ecology*, 75: 476-484.
- Tomanek, L. (2002). The heat-shock response and patterns of vertical zonation in intertidal *Tegula congensis*. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 797–807.
- Tomanek, L. (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81: 709–717.
- Tomanek, L.; Somero, G. N. (2002). Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology*, 205: 677–685.
- Townsend, C.R. (2003). Individual, population, community, and ecosystem consequences of a fish invader in New Zealand streams. *Conservation Biology*, 6: 273-282.
- Townsend, C.R. (2007). *Ecological applications: toward a sustainable world*. Oxford, Blackwell.
- Townsend, C.R.; Winterbourn, M.J. (1992). Assessment of the environmental risk posed by an exotic fish: The proposed introduction of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to New Zealand. *Conservation Biology*, 17: 38-47.
- Truchot, J.P., 1992. Acid–base changes on transfer between sea- and freshwater in the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Resp. Physiology*, 87: 419–427.
- Ubeda, A.J.; Simpfendorfer, C.A.; Heupel, M.R. (2009). Movements of bonnetheads, *Sphyrna tiburo*, as a response to salinity change in a Florida estuary. *Environmental Biology of Fishes*, 84: 293–303
- Vargas, R.; Bessonart, M. (2007). Lipid body composition of black catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), of two populations adapted to different environmental conditions. *Boletim do Instituto da Pesca* 33, 105.

- Vieira, V.L.P., Neto, J.R., Lopes, P.R.S., Lazzari, R., Fonseca, M.B. & Menezes, C.C., 2006. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. *Ciência Animal*, 7: 49-55.
- Villegas, C.T. (1990). Evaluation of the salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus* and their F1 hybrids, *Aquaculture*, 85: 281–292
- Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez; E.M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 122: 121-129.
- Vitule J.R.S.; Freire, C.A.; Simberloff, D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries*, 10: 98–108.
- Vitule, J.R.S. (2008). Distribuição, Abundância e estrutura populacional de peixes introduzidos no rio Guaraguaçu, Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia da UFPR. Curitiba. 139p.
- Vitule, J.R.S., Umbria, S.C.; Aranha, J.M.R. (2006). Introduction of the African catfish *Clarias gariepinus* (BURCHELL, 1822) into Southern Brazil. *Biological Invasions*, 8: 677-681.
- Vitule, J.R.S.; Umbria, S. C.; Aranha, J. M. R. (2008). Record of native amphibian predation by the alien African catfish in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(2): 105-107
- Wang, J.Q.; LUI, H.; PO, H.; FAN, L. (1997). Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture*, Amsterdam, 148 (2-3): 115-124.
- Wang, Y.; Xu, J.; Sheng, L.; Zheng, Y. (2007), Field and laboratory investigations of the thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*), *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148 (4): 821-827.
- Weber, T.E., Bosworth, G.B. (2005). Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture*, 246: 483 - 492.



- Wee, N. J.; Tang, Y. Y. M.; Lee, S. M. L.; Chew, S. F.; Ip, Y. K. (2007). Ammonia toxicity and tolerance in the brain of the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 82: 204 -213.
- Welcomme, R.L. (1988). International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper 294, FAO, Rome, Italy. 318 p.
- Werner, I.; Nagel, R. (1997). Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipodes exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and flouranthene. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 16: 2393–2403.
- White, C.N.; Hightower, L.E.; Schultz, R.J. (1994). Variation in heat shock proteins among species of desert fishes (Poeciliidai; Poeciliopsis). *Molecular Biology and Evolution*, 11: 106–119.
- Willmer, P.; Stone, G.; Johnston, I. (2005). *Environmental physiology of animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.
- Willoughby, N.G.; Tweddle, D. (1978). The ecology of the catfish *Clarias gariepinus* and *Clarias ngamensis* in the Shire Valley, Malawi. *Journal of Zoology*, 186: 507-534.
- Wood, L.A.; Brown, I.R.; Youson, J.H. (1998). Characterisation of the heat shock response in the gills of sea lampreys and a brook lamprey at different intervals of their life cycles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120: 509–518.
- Wootton, R. (1998). *Ecology of Teleost Fishes*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Xie, P.; Chen, Y. (2001). Invasive carp in China's plateau lakes. *Science*, 294: 999-1000.
- Yalçın, S., Akyurt, I.; Solak, K. (2001). Stomach contents of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) in the River Asi (Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 25: 461-468.
- Yang, M.W.; Huang, W.T.; Tsai, M.J.; Jiang, I.F.; Weng, C.F. (2009). Transient response of brain heat shock proteins 70 and 90 to acute osmotic stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Zoological Studies*, 48 (6): 723-736
- Zbanyszek, R.; Smith, L.S. (1984). Changes in carbonic anhydrase activity in coho salmon smolts resulting from physical training and transfer into seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 79(2): 229-33.