

CLÁUDIO ADRIANO PIECHNIK

**ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NAS  
BRANQUIAS DO PEIXE *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae)  
APÓS EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edith Susana Elisabeth Fanta

Co-orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Kawall

CURITIBA

2006

*Primavera Nos Dentes*

*Quem tem consciência para ter coragem  
Quem tem a força de saber que existe  
E no centro da própria engrenagem  
Inventa a contra mola que resiste*

*quem não vacila mesmo derrotado  
Quem já perdido nunca desespera  
E envolto em tempestade decepada  
Entre os dentes segura a primavera*

*(Secos e Molhados)*

**Dedico este trabalho a todos  
aqueles que sentiram minha ausência.**

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Edith Fanta pela amizade, incentivo e exemplo de paixão pela biologia, pela ciência e pela pesquisa.

À Dra. Lucélia Donatti pela amizade, disponibilidade, conselhos e prontidão sempre que precisei de ajuda.

À Dra. Helena Gonçalves Kawall pela amizade, disponibilidade, exemplo pessoal e ajuda fundamental na realização das análises bioquímicas.

Ao Dr. Metry Bacila pela amizade, disponibilidade, conselhos e ajuda fundamental na realização das análises bioquímicas no laboratório de pesquisas da PUC PR, além de seu exemplo pessoal de dedicação e profissionalismo inesgotáveis.

Ao Biólogo e amigo Pedro Rondon Werneck, ao estagiário, estudante de biologia, e amigo, Luiz Eduardo Nunes Ferreira e ao biólogo Fabio Carneiro Sterzelecki pelo companheirismo, disponibilidade e ajuda sem a qual este trabalho não seria concluído.

Ao Biólogo, prof. Antonio Luiz Portela (Luizão) pelo empréstimo da casa, barco e demais materiais para que as coletas pudessem ser realizadas.

Ao curso de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular e a todos os seus professores integrantes, pela oportunidade de aperfeiçoamento e formação proporcionados.

À PUC PR por permitir o uso do laboratório de pesquisas e de seus equipamentos para realização das análises enzimáticas.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. OBJETIVO GERAL.....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. LOCAL DE ESTUDO.....	11
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
3.3. ACLIMATAÇÃO DE <i>BATHYGOBIUS SOPORATOR</i> AO LABORATÓRIO.....	13
3.4. EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO.....	14
3.4.1. Limites de tolerância.....	14
3.4.2. EXPERIMENTO DE EXPOSIÇÃO DOS PEIXES A DIFERENTES SALINIDADES.....	15
3.5. ATIVIDADE $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase.....	15
3.6. PREPARAÇÃO DA MEMBRANA PARA BIOENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	15
3.6.1. Ensaio enzimático.....	16
3.7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	16
3.7.1. Microscopia óptica.....	16
3.7.2. Microscopia eletrônica.....	17
3.8. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	18
BRÂNQUIAS:.....	19
3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1. LIMITES MÁXIMO E MÍNIMO DE TOLERÂNCIA DO PEIXE <i>B. soporator</i> À VARIAÇÃO DE SALINIDADE.....	21

4.2. MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO BRANQUIAL.....	22
4.3. ÍNDICE DE LESÃO .....	40
4.4. ATIVIDADE Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase DE CÉLULAS BRANQUIAIS DE <i>B. saporator</i> EXPOSTOS A DIFERENTES .....	41
4.4.1. Teste de 12 horas.....	41
4.4.2. Teste de 96 horas.....	44
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS .....	57

## FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Baía de Guaratuba, local de coleta .....	12
<b>Figura 2</b> – Exemplar adulto da espécie <i>Bathygobius soporator</i> (Valenciennes, 1837) .....	13
<b>Tabela 1</b> - Alterações histopatológicas consideradas nas análises das Brânquias de acordo com Bennett <i>et al.</i> (1999). .....	19
<b>Figura 3</b> - Limite mínimo de tolerância do peixe <i>B. soporator</i> à variação de salinidade .....	21
<b>Figura 4</b> - Limite máximo de tolerância do peixe <i>B. soporator</i> à variação de salinidade .....	22
<b>Tabela 2</b> - Alterações histopatológicas observadas em <i>B. soporator</i> nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 12h. Porcentagens referentes a cada alteração considerando n=8.....	23
<b>Figura 5</b> – Gráfico da porcentagem de alterações histopatológicas observadas em <i>B. soporator</i> nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 12h (n=8).....	23
<b>Tabela 3</b> - Alterações histopatológicas observadas em <i>B. soporator</i> nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 96h. Porcentagens referentes a cada alteração considerando n=8.....	24
<b>Figura 6</b> – Gráfico da porcentagem de alterações histopatológicas observadas em <i>B. soporator</i> nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 96h (n=8).....	24
<b>Figura 7</b> - Organização estrutural das brânquias de <i>Bathygobius soporator</i> exposto a salinidade 17ppm – 96h. Corte longitudinal. Observar: lamela primária (LP), lamelas secundárias (LS), epitélio respiratório (ER) e espaço sanguíneo (ES). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).....	26
<b>Figura 8</b> - Organização estrutural das brânquias de <i>Bathygobius soporator</i> exposto a salinidade 6 ppm – 96h. Corte longitudinal. Observar: descolamento do epitélio respiratório (DE), lamela primária (LP), lamelas secundárias (LS) e epitélio respiratório (ER). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).....	27

- Figura 9** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 6ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: descolamento do epitélio respiratório (DE), lamela primária (LP) , lamelas secundárias (LS), e espaço sanguíneo (es).. Microscopia de luz. Aumento 400X . Coloração Hematoxilina eosina (HE). ..... 28
- Figura 10** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 0ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: hipertrofia das células do epitélio respiratório (HR) e lamela primária (LP). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE)..... 29
- Figura 11** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 6ppm - 96h. Corte longitudinal. Observar: Hipetrofia do epitélio respiratório (HR), lamela primária (LP) e espaço sanguíneo (es). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE)..... 30
- Figura 12** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 06ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: aneurisma (AN), lamela primária (LP), espaço sanguíneo (es) e célula epitelial (ep). Microscopia de luz. Aumento 400X Coloração Hematoxilina eosina (HE). ..... 31
- Figura 13** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 0ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: local de fusão entre duas lamelas secundárias (FL) e lamela primária (LP). Microscopia de luz. Aumento 400X . Coloração Hematoxilina eosina (HE)..... 32
- Figura 14** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células sanguíneas no lúmen de um capilar e célula de muco (cm). Aumento 2.500X. .... 33
- Figura 15** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Células de muco (cm) e projeções da membrana apical em contato com o meio externo (mp). Aumento 8.000X..... 34



<b>Figura 16</b> - Estrutura do epitélio branquial de <i>B. saporator</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Células de cloreto (cc), mitocôndrias espalhadas por todo seu citoplasma (m) e sistema tubular de membranas (st). Aumento 10.000X.....	35
<b>Figura 17</b> - Estrutura do epitélio branquial de <i>B. saporator</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 34ppm. Lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), descolamento (DE) e edema (ed). Aumento 4.000X.....	36
<b>Figura 18</b> - Estrutura do epitélio branquial de <i>B. saporator</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 96 horas em salinidade 17ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células de cloreto (cc), células sanguíneas no lúmen de um capilar (sg) e célula de muco (cm). Aumento 5.000X. ....	37
<b>Figura 19</b> - Estrutura do epitélio branquial de <i>B. saporator</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 17ppm. Lamela secundária (LS) com interdigitações (id) desmossomo (ds) . Aumento 60.000X. ....	38
<b>Figura 20</b> - Estrutura do epitélio branquial de <i>B. saporator</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 6ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células de cloreto (cc) e célula de muco (cm). Aumento 4.000X.....	39
<b>Tabela 4</b> - Alterações histopatológicas consideradas nas análises das Brânquias de acordo com Bernett <i>et al.</i> (1999) considerando as diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) nos testes de 12h e 96h. Um fator de importância de 1 a 3 foi atribuído para cada alteração e aplicado na fórmula para obtenção dos valores acima. pr = padrão de reação, alt = alteração, a = pontuação atribuída à alteração, e w = fator de importância.....	40
<b>Figura 21</b> – Representação do grau de injúria sofrida pelas brânquias, sendo que um índice de lesão com valor elevado representa alto grau de injúria .....	40
<b>Figura 22</b> - Atividade Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase de células branquiais de <i>B. saporator</i> expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 12h.....	41

<b>Tabela 5</b> - Resumo Estatístico Teste 12 horas.....	42
<b>Tabela 6</b> - Estatística Anova para o teste de 12 horas.....	42
<b>Tabela 7</b> - Estatística Dunn's para o teste de 12horas. Amostras com $P < 0,01$ .....	43
<b>Figura 23</b> - Atividade $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase de células branquiais de <i>B. soporator</i> expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 12h.....	44
<b>Figura 24</b> - Atividade $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase de células branquiais de <i>B. soporator</i> expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 96h.....	45
<b>Tabela 8</b> - Resumo Estatístico Teste 96 horas.....	45
<b>Tabela 9</b> - Estatística Anova para o teste de 96 horas.....	46
<b>Tabela 10</b> - Estatística Dunn's para o teste de 96horas. Amostras com $P < 0,01$ .....	47
<b>Figura 25</b> - Atividade $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase de células branquiais de <i>B. soporator</i> expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 96h.....	47

## RESUMO

As brânquias de teleósteos marinhos realizam secreção de sal (NaCl) através das células de cloreto pela atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase com finalidade regulação osmótica-iônica para manutenção do teor hídrico e composição dos líquidos corporais de peixes. Para realizar este trabalho utilizamos representantes adultos do peixe tropical *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) coletados na baía de Guaratuba (Paraná, Brasil). A espécie estuarina eurialina se distribui naturalmente em locais onde a salinidade varia de 0ppm (gamboas) a 34ppm (planícies de maré). O objetivo do trabalho foi verificar a alteração na atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e alterações morfológicas nas brânquias do peixe após exposição grupos de peixes (n=8) a salinidades de 0, 6, 17 e 34ppm após 12 e 96 horas de exposição. Os animais foram aclimatados por 7 dias e as condições abióticas foram mantidas constantes com temperatura a 26°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), pH 7 e salinidade 17ppm, fotoperíodo de 12 h de luz e escuro. A redução na salinidade foi efetuada progressivamente através da diluição da água marinha com água filtrada e decolorificada, numa taxa de aproximadamente 4 ppm a cada 2 horas. O aumento na salinidade foi efetuado progressivamente acrescentando-se sais marinhos artificiais à do aquário com o aumento numa taxa de aproximadamente 4 ppm a cada 2 horas. Foram considerados como controle os exemplares conservados em aquário com salinidade 17ppm. Em nossos experimentos obtivemos como valor limite mínimo de tolerância a baixa salinidade para a espécie 0ppm e limite máximo de tolerância 58ppm. As brânquias foram processadas para serem analisadas em microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Alterações na salinidade da água levam a alterações significativas nas estruturas do epitélio branquial e menor grau de higidez em 6ppm e 0ppm. Pudemos observar nos tecidos branquiais descolamento do epitélio, hipertofia, fusão de lamelas secundárias, aneurisma e hemorragia. A atividade de enzima ATPase foi medida pelo procedimento que utiliza o bioensaio para piruvato kinase (PK)/ lactato desidrogenase (LDH). A atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial para é maior em salinidade 34ppm, se comparada a salinidade 6 e 0ppm, e é maior em salinidade 17ppm se comparada a salinidade 6ppm no teste de 12h e é maior em salinidade 34ppm, se comparada a salinidade 0

e 6ppm, e é maior em salinidade 17ppm se comparada a salinidade 0ppm no teste de 96h.

## ABSTRACT

Gills of marine teleost fishes are responsible for salt secretion (NaCl) through their chloride cells by the activity of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase enzyme, with the purpose to regulate osmotic-ionic balance of the body fluids. For this study, we used adult specimens of the tropical fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) collected in Guaratuba bay (Paraná, Brazil). This eurihaline species lives in estuaries where the salinity varies from 0 to 34ppm. The objective of this study was to verify how the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase activity and the gill morphology changes when fish face different salinities. *B. soporator* (n=8) were exposed to salinities 0, 6, 17 and 34ppt for 12 and 96 hours. The animals had been acclimatized for 7 days and abiotic conditions had been kept constant: temperature  $26^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), pH 7, salinity 17ppt, and a photoperiod of 12 hours dark/12 hours light. Salinity was reduced gradually by dilution of sea water with filtered and dechlorinized water, in a rate of 4 ppt every 2 hours. The increase in water salinity was gradual by addition of artificial marine salts in a rate of 4 ppt every 2 hours. Animals maintained in water with salinity 17ppm were the control group. *B. soporator* resisted to a salinity as low as 0ppt, and as high as 58ppt. The gills were processed for optical and for transmission electron microscopy. Changes in salinity resulted in significant changes in the structures of gills epithelia, mainly in salinities 6ppt and 0ppt. Intercellular oedema, hipertrophy, secondary lamellae fusion, aneurysm and hemorrhage were the most frequent pathologies. The activity of the enzyme ATPase was measured in a bioassay for piruvato kinase (PK)/ lactate deshidrogenase (LDH). The activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the gills of *B. soporator* in salinity 34ppm is higher than in salinities 6ppm and 0ppm. It is also higher in salinity 17ppt if compared to the salinities 6ppt after 12 hours of exposure. After 96 hours of exposure, the activity is higher in salinity 17ppm than in 0ppm.

## 1. INTRODUÇÃO

Os Teleostei, grupo mais diversificado de peixes ósseos, tem aproximadamente 24.000 espécies viventes. São amplamente adaptados ao habitat aquático, sendo especializados para a vida em ambientes tão diversos como as grandes profundezas oceânicas, recifes de corais, áreas rasas e litorâneas, poças de maré, lagos, rios, cavernas, entre outros (POUGH, 2003). Naturalmente, os hábitos de vida dos peixes, estão inseparavelmente relacionados com as estruturas e suas funções nesses organismos. As conseqüências eco-fisiológicas e ecotoxicológicas decorrentes da exposição de peixes a agentes estressantes naturais ou artificiais em seus ambientes naturais têm colaborado para um melhor entendimento dos processos fisiológicos desses organismos (RANKIN & JENSEN, 1993).

Os corpos de água contêm substâncias dissolvidas, como sais, gases, compostos orgânicos e poluentes. Além da temperatura da água, esses são os fatores de maior importância fisiológica para os organismos aquáticos (ODUM, 1988; SCHIMIDT, 1996). Os minerais dissolvidos em água doce e água salgada diferem tanto na composição quanto na quantidade (RICKLEFS, 1996). A água do mar contém cerca de 3,5% de sal, ou seja, 35 partes por peso de sal por 1000 partes de água. Os principais íons dissolvidos na água são sódio e cloreto, com magnésio, enxofre e cálcio presentes em quantidades substanciais. Cerca de 2,7% dos sais estão presentes na forma de cloreto de sódio e a maior parte do restante consiste de sais de magnésio, de cálcio e de potássio (ODUM, 1988; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT, 1996).

A concentração total de sal no mar varia segundo sua localização geográfica. Peixes que vivem em regiões de mangue, orlas rochosas, baías ou piscinas de maré, freqüentemente sofrem com mudanças súbitas de salinidade dependendo das condições sazonais e climáticas, sendo que por vezes são observadas modificações repentinas em um mesmo dia (FANTA, 1997). Em regiões subtropicais ou temperadas de grande amplitude térmica, verões e invernos chuvosos ou secos podem significar uma variação de 0,5 partes por mil (ppm) a 34ppm de salinidade

(FANTA, 1997), e situação semelhante ocorre em regiões polares onde congelamento e degelo podem provocar alterações significativas na salinidade do mar (FANTA, 1995; ROMÃO *et al.*, 2001).

Estuários são regiões em que a água é salobra, ou seja, sujeita tanto à influencia da água doce dos rios que nele desembocam, quanto das marés do mar. É difícil determinar exatamente a partir de que ponto a água do mar torna-se salobra, mas tecnicamente considera-se água salobra a que possui entre 0,5 e 30 gramas de sal por litro (SCHIMIDT, 1996).

A água salobra é extremamente importante do ponto de vista fisiológico, pois representa uma barreira para a distribuição de muitos organismos marinhos, assim como para organismos de água doce. Estão entre os ecossistemas mais produtivos do planeta (LOWE-MCCONNELL, 1987; ODUM, 1988; POUGH, 2003; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT-NIELSEN, 1996; FANTA, 1997; RANDALL *et al.*, 2000).

A grande variedade de oferta de recursos alimentares em estuários, principalmente devido a grande produção primária e conseqüente produção secundária (ROBERTSON & BLABER, 1992) faz com que os estuários congreguem espécies marinhas, de água doce ou anádromas, que usam os estuários como áreas de alimentação, de criação de larvas e juvenis, ou em parte de suas migrações para a reprodução. Residentes permanentes, que completam todo seu ciclo de vida dentro dos estuários, estão representados por poucas espécies vivendo principalmente em águas rasas (LOWE-MCCONNELL, 1987; RICKLEFS, 1996; SCHIMIDT, 1996).

Além disso, a alta abundância de peixes em áreas de manguezais (SPACH *et al.*, 2003) e estuários se deve à presença de refúgios contra a predação, decorrentes da complexidade estrutural da região, sua pouca profundidade, a turbidez da água e o reduzido número de peixes carnívoros de grande porte que ali são encontrados (ROBERTSON & BLABER, 1992; MULLIN, 1995). Cortando os manguezais existe uma complexa rede de canais de maré (gamboas), bastante heterogêneas quanto à profundidade e ao regime de marés, e que na baixa mar concentram peixes juvenis e na preamar possibilitam o movimento dos peixes para dentro da floresta do mangue (RONNBACK *et al.*, 1999). A função ecológica e a composição da

assembléia de peixes em canais de maré e em marismas são bem conhecidas. Entretanto, em manguezais, principalmente da costa brasileira, o conhecimento sobre a utilização dos canais de maré por peixes é reduzido (SPACH *et al.*, 2003).

As propriedades físicas da água criam alguns desafios para os peixes. Para sobreviverem com sucesso eles devem se ajustar ao ambiente (SCHMIDT, 1996; RANDALL *et al.*, 1997; POUGH *et al.*, 2003). A sobrevivência dos peixes depende de serem estruturalmente e fisiologicamente adaptadas a lidar com as características e as variações do meio ambiente (RICKLEFS, 1996; FANTA, 1997). A adaptação às mudanças no ambiente demanda um ajuste completo das seqüências metabólicas, que podem envolver mudanças na estrutura, na concentração ou ainda no uso de seqüências alternativas de enzimas (RICKLEFS, 1996).

A salinidade é um dos fatores ambientais que exerce pressão seletiva sobre os organismos aquáticos afetando a sobrevivência, o metabolismo e a distribuição dos peixes durante seu desenvolvimento. Algumas espécies vivem seu ciclo de vida inteiro em um único habitat onde a salinidade pode ser variável ou não, enquanto que outros migram entre regiões com características abióticas diferentes ao longo de sua vida (VARSAMOS *et al.*, 2005).

Em peixes adultos o balanço hidromineral é de responsabilidade de tecidos e órgãos especializados como as brânquias, o intestino e o sistema urinário, submetidos ao controle neuroendócrino (VARSAMOS *et al.*, 2005).

As brânquias dos peixes têm múltiplas finalidades. Além de proverem as trocas gasosas, possuem um importante papel na regulação osmótica e iônica, na regulação de ácido e base e na excreção de nitrogênio (EVANS *et al.*, 2005). Sobre as brânquias passa um fluxo unidirecional de água, que provém da boca e é eliminada através dos opérculos. As superfícies respiratórias das brânquias são projeções delicadas da porção lateral de cada arco branquial. A troca de gases ocorre nas numerosas projeções microscópicas dos filamentos, chamadas de lamelas secundárias, ou lamelas respiratórias. O arranjo vascular das brânquias maximiza a troca de oxigênio num sistema de contra-corrente. Cada filamento branquial possui duas artérias: um vaso aferente, que vai do arco branquial até a



ponta do filamento, e um vaso eferente, através do qual o sangue retorna para o arco. Cada lamela secundária tem um espaço sanguíneo, conectado aos vasos aferente e eferente (SCHMIDT, 1996; RANDALL *et al.*, 1997; POUGH *et al.*, 2003).

A trocas de matéria e energia com o ambiente são essenciais para a sobrevivência dos organismos, sendo parte destas trocas mediada pela superfície epitelial. As moléculas de água e os íons atravessam o epitélio quase que livremente, enquanto moléculas mais pesadas se movem com certos limites. Os peixes usam tanto a troca ativa, quanto a passiva, para regular suas concentrações internas frente a variações das condições externas (RANDALL *et al.*, 1997).

Os íons e as moléculas de água se movem prontamente entre o ambiente externo e os fluidos corpóreos internos do animal, através da ativação inicial de proteínas de transporte na superfície epitelial, seguida da síntese de novas proteínas de transporte, de forma que manter um ambiente interno estável demanda um gasto energético elevado (MCCORMICK, 1995; PRODOCIMO e FREIRE, 2006).

Os líquidos corpóreos de teleósteos marinhos são hipotônicos em relação à água do mar. Há uma tendência desses peixes em perder água para o meio, especialmente através do epitélio das brânquias (MAZEAUD e MAZEAUD, 1981). Para repor o volume de água perdido os peixes bebem água do mar. A maior parte da absorção de sal ocorre por ingestão, e não por absorção de sal pela superfície corpórea ou pelas brânquias (CONTE, 1969; SCHMIDT NIELSEN, 1996; MCCORMICK, 1995; RANDALL *et al.*, 2000; POUGH *et al.*, 2003). Já em água doce os peixes experimentam influxo de água por osmose.

Peixes eurialinos podem ainda diminuir sua demanda energética por comportamentos osmorregulatórios, procurando meios isotônicos se comparados com seus fluídos corporais. (KIDDER *et al.*, 2006). Teleósteos eurialinos, como, por exemplo, *Dicentrarchus labrax*, possuem capacidade osmorregulatória ao ocorrer variação das condições ambientais, de água doce para água hipersalina. Esta capacidade fisiológica é geralmente monitorada utilizando-se ensaios de atividade enzimática ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), quantificação de hormônios (prolactina e hormônio do crescimento) ou a expressão de seus mRNAs (BOUTET *et al.*, 2006). Grande parte das informações sobre a fisiologia da osmorregulação em peixes teleósteos é

baseada em espécies eurialinas (EVANS; 1980 *apud* GOSWAMI *et al.*, 1983; McCORMICK, 1995; RANDALL *et al.*, 1997 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005; WEBSTER e DILL, 2006).

A absorção de 70 a 80% da água ingerida e da maior parte do NaCl e do KCl presentes na água do mar ocorre através do epitélio intestinal. Inicialmente a água do mar ingerida é diluída a 50% por absorção passiva dos sais através do esôfago (SCHMIDT NIELSEN, 1996) e posteriormente, no intestino delgado, ocorre a absorção ativa secundária através da membrana apical, por meio de co-transporte Na/2Cl/K, seguida de transporte ativo na membrana basolateral pela ATPase de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. A maioria dos íons divalentes tais como Ca<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup> permanece no trato gastrointestinal e é expelida pelo ânus (SCHMIDT NIELSEN, 1996; POUGH *et al.*, 2003). O excesso do sal absorvido junto com a água é posteriormente eliminado do sangue para a água do mar por transporte ativo Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> através do epitélio das brânquias e por secreção de sais divalentes pelos rins (EVANS *et al.*, 1982; PISAM & ROMBOURG, 1991, *apud* McCORMICK, 1995). A urina é isotônica em relação ao sangue, mas rica em sais não secretados pelas brânquias (especialmente Ca<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> e SO<sub>4</sub><sup>-</sup>). O resultado da regulação osmótica combinada das brânquias e dos rins nos teleósteos marinhos é a retenção de água (CONTE, 1969; SCHMIDT-NIELSEN, 1996; McCORMICK, 1995; RANDALL *et al.*, 1997; POUGH *et al.*, 2003).

As brânquias dos teleósteos marinhos estão revestidas por um epitélio que contém células de cloreto, ou células de trocas iônicas, por meio das quais ocorre o transporte de NaCl do sangue para a água ao redor. Para desempenhar sua função de transporte de sal, as células de cloreto encontram-se concentradas na região interlamelar das lamelas secundárias das brânquias e nas junções entre os filamentos ou lamelas primárias e as lamelas secundárias (LAURENT & DUNEL, 1980; PERRY, 1997; FERNADES *et al.*, 1998), sendo classificadas em dois tipos:  $\alpha$  e  $\beta$ . As do tipo  $\alpha$  localizam-se na base das lamelas secundárias e estão presentes em brânquias de teleósteos de água doce e marinhos. Acredita-se que sejam células precursoras das células de cloreto de peixes adaptados à água do mar. As do tipo  $\beta$  são encontradas na região interlamelar do filamento primário. São células freqüentes em peixes de água doce e podem degenerar quando a espécie é transferida e

adaptada à água do mar. (JOBILING, 1995; PERRY, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.* 1997).

As células de cloreto são altamente especializadas, caracterizando-se por uma aparência colunar larga, contendo um sistema de retículo endoplasmático tubular extenso com vesículas subapicais, cripta apical e superfície muco serosa, grande densidade de mitocôndrias envoltas por um sistema tubular, núcleo ovóide e complexas junções com células vizinhas (McCORMICK, 1995; RANDALL *et al.*, 1997; POUGH, 2003). LAURENT & DUNEL, 1980; PHILPOTT, 1980; JOBILING, 1995; MORON & FERNANDES, 1996; ZADUNAISKY, 1996, PERRY *et al.* 1996; PERRY, 1997). O sistema tubular tem continuidade com a membrana basolateral, resultando em uma grande área de superfície para localização de proteínas de transporte. Talvez a proteína de maior importância é a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase com um papel central na secreção salina (McCORMICK, 1995). As ATPases branquiais estão intimamente envolvidas na osmorregulação, regulação ácido- base e respiração em peixes (PARVEZ *et al.*, 2005).

Exposição a salinidades diferentes são muitas vezes refletidas por modificações morfológicas (CARMONA *et al.*, 2004) e ultraestruturais nestas células. VAN DER HEIJDEN *et al.*, (1997), que observaram um aumento do número de células de cloreto no epitélio branquial da tilápia *Oreochromis mossambicus* associando ao aumento na salinidade. No bagre *Hypostomus plecostomus* verificou-se redução da região apical das células de cloreto de exemplares aclimatados à água destilada, gerando redução de perda de íons para o ambiente (FERNANDES *et al.*, 1998). Em salinidades iguais, espécies diferentes podem usar mecanismos diferentes de suas células de cloreto como observado em *Gobionotothen gibberifrons* e *Trematomus newnesi* ao enfrentarem salinidades entre 25 e 38‰ (FANTA *et al.*, 1995). Foram, ainda, encontradas grandes diferenças nas células de cloreto do epitélio branquial além da alta atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, comparando-se o esturjão *Acipenser naccarii* em água doce e em água salgada. (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005).

*Fundulus heteroclitus* (killifish) é um modelo de organismo para estudos de regulação iônica, sendo as brânquias o principal local de trocas de íons. Nestas, o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são excretados para a água do mar (LAURENT *et al.*, 2006).

Uma diferença significativa da fluidez da membrana e da composição da bicamada lipídica foi observada em células epiteliais de brânquias de *Oreochromis niloticus* em consonância com mudanças na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ajudando o influxo de  $\text{Na}^+$  maior que o efluxo de  $\text{K}^+$  através das células do epitélio branquial durante a adaptação à salinidade (SHIVKAMAT & ROY, 2005). *Salmo salar* (salmão), *Oncorhynchus mykiss* (truta) e *Salvelinus alpinus* rapidamente regularam as concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmático e os níveis de osmolaridade após exposição à água marinha. As três espécies demonstraram um aumento similar na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase das brânquias durante a aclimação em água do mar (BYSTRIANSKY *et al.*, 2006).

Mensurando-se o custo energético de habitar diferentes salinidades e correlacionando estes custos com o tamanho do corpo e atividade de enzimas osmorregulatórias conclui-se que preferências por salinidades mais altas podem aumentar a atividade enzimática (WEBSTER, 2006), sendo que a aclimação a salinidades extremas aumenta a atividade dos órgãos osmorregulatórios em *Sparus auratus* (POLAKOF *et al.*, 2006).

A regulação promovida pelas células de cloreto e a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é crítica durante o movimento do peixe entre águas de diferentes concentrações salinas (água doce, água salobra e água marinha) em regiões de estuários, sendo muito importante em peixes estenoalinos que vivem sob grande variabilidade de condições ambientais (McCORMICK, 1995; PRODOCIMO & FREIRE, 2006; ROMÃO *et al.*, 2001). A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase gera baixa concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular e alta concentração de cargas negativas dentro da célula. O gradiente de  $\text{Na}^+$  é então utilizado para transportar  $\text{Cl}^-$  do interior da célula através do co-transporte  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ . Assim o  $\text{Cl}^-$  deixa a célula sob um gradiente elétrico através de algum canal de  $\text{Cl}^-$  apical (McCORMICK, 1995; VARSAMOS *et al.*, 2005).

Neste modelo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase geram um gradiente elétrico e iônico. A ouabaína é um inibidor específico da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, que se liga do sítio de

ligação do potássio, inibindo fortemente a excreção de  $\text{Cl}^-$  e alterando o gradiente elétrico (SILVA *et al.*, 1977; KARNAKY *et al.*, 1977 *apud* McCORMICK, 1995). A localização basal da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase foi verificada com eficácia, comparando-se a exposição externa à ouabaína e injetando-se a substância (SILVA *et al.*, 1977). Frações celulares de tecido branquial fracionado contém maior atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase que outras frações celulares (SARGENT *et al.*, 1975 *apud* McCORMICK, 1995). É possível visualizar grandes concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase no interior das células usando-se auto-radiografia com [ $^3\text{H}$ ] ouabaína (KARNAKY *et al.*, 1976 *apud* McCORMICK, 1995). Estes resultados evidenciam que as bombas de sódio não estão localizadas na superfície apical, mas distribuídas através da célula no extenso sistema tubular que é contínuo com a membrana basolateral (McCORMICK, 1995; VARSAMOS *et al.*, 2005).

Para o estudo aqui proposto escolheu-se o peixe teleósteo *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) da família Gobiidae por que suportam grande variação de salinidade, temperatura, oxigenação, e turbidez, (FANTA, 1997; CARVALHO FILHO, 1999; MENDES, 2006). Permanecem vivos em águas rasas, entre 0-2 metros, geralmente entre rochas, corais, raízes de mangues, bordas de canais, lagoas salobras, poças de maré, rios costeiros e estuários de águas rasas. São abundantes desde a costa até as ilhas oceânicas, ocorrendo no Pacífico Oriental Tropical e no Atlântico Ocidental, desde a Flórida nos EUA até o Rio Grande do Sul, no Brasil (MENESES & FIGUEIREDO, 1976; MAUGÉ, 1986; CARVALHO-FILHO, 1999).

Maria-da-toca é um de seus nomes populares, numa referência ao fato de que estes peixes buscam abrigo em pequenos espaços entre rochas. Ficam imóveis, camuflados e, se assustados, se aprofundam nas tocas ou fogem. Outras vezes podem ser facilmente pegos com as mãos, conforme relatos de pescadores (FANTA, 1997; CARVALHO FILHO, 1999; MENDES 2006). Territoriais, disputam espaço e comida com indivíduos da mesma espécie, e são extremamente vorazes, comendo todo o tipo de invertebrados bentônicos, ovos, zooplâncton e larvas de peixes. Podem passar de uma poça de maré para outra, saltando pela areia ou pelas pedras. São de hábitos principalmente diurnos, mas também ativos à noite (FANTA,

1997; CARVALHO FILHO, 1999; MENDES 2006). Os casais são perenes e a reprodução ocorre praticamente o ano todo. O casal guarda os ovos depositados em superfícies lisas e duras por eles preparadas. As larvas são planctônicas e tem desenvolvimento rápido, passando a habitar o fundo (CARVALHO FILHO, 1999).

A família Gobiidae está no meio de um processo evolutivo e existem aproximadamente 600 espécies conhecidas que ocupam ambientes diferentes, com exceção dos pelágicos. Em certos ambientes eles apresentam adaptações fisiológicas tais como euritermia, eurialinidade, resistência à dissecação e a asfixia (NORMANDO & GREENWOOD, 1974 *apud* FANTA, 1997).

Para melhor compreender os mecanismos que esta espécie usa para manter a homeostase ao enfrentar variações súbitas e freqüentes de salinidade neste ambiente peculiar em que vive, foram realizados bioensaios para que se pudesse acompanhar as alterações ultraestruturais das células de cloreto e a atividade enzimática no epitélio das brânquias frente a salinidades extremas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a alteração na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e alterações morfológicas nas brânquias do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) após exposição a diferentes salinidades.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os limites máximo e mínimo de tolerância do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) à salinidade ambiental;
- Observar a existência ou não de alterações morfológicas em brânquias de *B. soporator* expostos a diferentes salinidades através de técnicas de microscopia ótica;
- Observar a existência ou não de alterações morfológicas em brânquias de *B. soporator* expostos a diferentes salinidades através de técnicas de microscopia eletrônica.
- Verificar mudanças ou não na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de células branquiais de *B. soporator* expostos a diferentes salinidades;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL DE ESTUDO

Os peixes foram coletados na baía de Guaratuba (Figura 1), que é um estuário encaixado na planície costeira do litoral sudeste do Brasil ( $25^{\circ} 51.80'S$ ,  $48^{\circ} 38.20'W$ ) (SUGUIO & TESSLER, 1984) sendo uma das duas áreas estuarinas ou protegidas do Estado do Paraná (ÂNGULO & ARAUJO, 1996). A baía tem uma área de  $48,57 \text{ km}^2$  e está inserida no município de Guaratuba (BIGARELLA *et al.*, 1978). Estende-se por 15 km terra adentro e possui a largura máxima de 5 km. A baía apresenta numerosas ilhas e extensos manguezais, penetrando mais ou menos profundamente, nos rios que nela deságuam (BIGARELLA, 1946). Os rios que desembocam na baía de Guaratuba têm as nascentes na parte montanhosa do complexo cristalino da Serra do Mar mas no curso inferior quando tornam-se meandranes, sofrem a influência das marés muitas vezes até algumas dezenas de quilômetros acima da foz (BIGARELLA, 1946).

A região da baía de Guaratuba apresenta clima do tipo pluvial temperado, com chuvas durante todo o ano e maiores pluviosidades e temperaturas mais altas ocorrendo no verão. A pluviosidade e a ingressão da cunha salina afetam a salinidade, que possui sazonalidade nítida (MAACK, 1981).





**Figura 1** – Baía de Guaratuba, local de coleta (→).

### 3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Os peixes estudados foram *Bathygobius soporator* Valenciennes, coletados com linha e anzol (sem trava) e isca de camarão nas margens da Baía de Guaratuba. A coleta foi aleatória nas poças de maré que se formam em rochedos próximos à praia durante a maré baixa.



**Figura 2** – Exemplar adulto da espécie *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837)

Os peixes foram transportados para o Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes (BioPX), localizado no Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em Curitiba. Os exemplares coletados foram transportados em compartimentos plásticos de 20L, com oxigenação produzida por compressor de ar portátil. As coletas foram realizadas entre os meses de novembro de 2004 e julho de 2005. Foi coletado um total de 106 animais para este trabalho.

### 3.3. ACLIMATAÇÃO DE *BATHYGOBIUS SOPORATOR* AO LABORATÓRIO

Após coleta e transporte os peixes foram distribuídos em aquários de 25L, contendo cada um deles 8 indivíduos. Os aquários tiveram as faces laterais e posteriores revestidas com papel contact verde, do mesmo modo que a face interna do anteparo colocado em frente ao aquário (FANTA, 1995). O fundo dos aquários foi recoberto com areia grossa e tijolos com furos foram colocados para oferecer abrigo aos peixes (ROMÃO *et al.*, 2001; FANTA, 1997)

Os aquários foram preenchidos com água marinha trazida do mesmo local da coleta dos peixes e as diluições para a obtenção das diferentes salinidades foram preparadas com água destilada e previamente aerada. A salinidade foi controlada por salinômetro.

Durante a fase de aclimatação de 7 dias as condições abióticas foram mantidas constantes: temperatura 26°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ); pH 7 e salinidade 17ppm; fotoperíodo de 12 h de luz e escuro. A temperatura da água foi controlada por aquecedores acoplados a termostatos eletrônicos.

A alimentação oferecida foi constituída de pedaços de camarão, baseado no fato de que *B. saporator* pode ser considerado onívoro e eurífago (NOMURA, 2002). A alimentação foi ofertada a cada dois dias duas horas após o início do período de luz (ROMÃO *et al.*, 2001).

### 3.4. EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO

#### 3.4.1. Limites de tolerância

Para a determinação do limite mínimo de tolerância à baixa salinidade 20 exemplares de *B. saporator* (CSt 6,9cm  $\pm 1,2$ ) foram transferidos para aquário que teve sua salinidade alterada progressivamente, de 2 em 2 horas, através da diluição da água marinha com água filtrada e dechlorificada, numa taxa de aproximadamente 4 ppm a cada 2 horas. A redução na salinidade foi acompanhada com salinômetro. O valor de tolerância mínimo foi estabelecido como a salinidade em que todos os peixes morreram.

Para a determinação do limite máximo de tolerância à alta salinidade 20 exemplares de *B. saporator* (CSt 7,7cm  $\pm 0,8$ ) foram transferidos para aquário que teve sua salinidade alterada progressivamente, de 2 em 2 horas, retirando-se um pouco da água do aquário, acrescentando-se sais marinhos artificiais à própria água do aquário, diluindo por completo os sais e vagorosamente devolvendo a água para o aquário, provocando o aumento numa taxa de aproximadamente 4 ppm a cada 2 horas. O aumento na salinidade foi acompanhado com salinômetro. O valor de

tolerância máximo foi estabelecido como a salinidade em que todos os peixes morreram.

Foram considerados como padrão os exemplares (CSt  $9,3\text{cm} \pm 0,7$ ) conservados em aquário a 17ppm de salinidade. As condições de temperatura, ambiente do aquário, filtragem, iluminação e alimentação foram mantidas constantes, sendo as mesmas da aclimação.

### 3.4.2. EXPERIMENTO DE EXPOSIÇÃO DOS PEIXES A DIFERENTES SALINIDADES

Com base nos dados obtidos no experimento de limites de tolerância foram feitos os seguintes experimentos sem alterar as condições de temperatura, ambiente do aquário, filtragem, iluminação e alimentação.

O grupo controle ( $n = 8$ ; CSt  $8,4\text{cm} \pm 1,0$ ) foi mantido em aquário com salinidade 17ppm.

Grupos experimentais (CSt  $8,7\text{cm} \pm 0,9$ ) foram expostos a diferentes salinidades obtida progressivamente, de 2 em 2 horas, através da diluição da água marinha com água filtrada e dechlorificada ou acrescentando-se sais marinhos artificiais à água numa taxa de 4pp por hora.

Foram testadas três salinidades: 34ppm ( $n = 8$ ), 06ppm ( $n = 8$ ), e 0 ( $n = 8$ ), e dois tempos de exposição, 12 horas e 96 horas.

Para cada tempo de exposição nas diferentes salinidades foram coletadas amostras de brânquias após secção transversal da medula espinhal e próximo à região occipital do peixe para medições da atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e para estudos através de microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

### 3.5. ATIVIDADE da $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase

A atividade de enzima ATPase foi medida pelo procedimento que utiliza o bioensaio para piruvato kinase (PK)/ lactato desidrogenase (LDH) descrita em GIBBS & SOMERO, 1989.

### 3.6. PREPARAÇÃO DA MEMBRANA PARA BIOENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Para os ensaios de atividade enzimática os filamentos brânquiais foram cortados, acondicionados em tubos Eppendorf e imediatamente congelados em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores. Nos ensaios de atividade da ATPase, os filamentos foram cortados dos arcos branquiais e homogeneizados em tampão EIS (1mM/l EDTA, 50 mM/l imidazol, 250 mM/l sacarose, 5 mM/l 2-mercaptoetanol, pH 7.5) na proporção de 1:9 (peso úmido: tampão). A homogeneização foi feita à mão, usando-se homogenizadores de vidro.

#### 3.6.1. Ensaio enzimático

A atividade de enzima ATPase foi medida pelo procedimento que utiliza o bioensaio para piruvato kinase (PK)/ lactato desidrogenase (LDH). Os preparados de membrana, após serem descongelados, foram divididos em duas porções. A primeira fração foi diluída com 1 volume de tampão EIS contendo 10 mM de ouabaína e incubado por 30-60 min em temperatura ambiente. A ouabaína é um inibidor específico de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase. A outra fração foi tratada da mesma maneira, no entanto, a ouabaína não foi adicionada. As reações foram iniciadas com a adição das preparações das membranas. As atividades de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase foram calculadas pela diferença entre a atividade total de ATPase sem ouabaína e com ouabaína.

O meio para o ensaio foi preparado com NaCl 100mM/l, KCL 20mM, 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM disódio adenosina trifosfato (ATP), fosfoenolpiruvato (PEP) 0.5 mM, frutose-1,6-bifosfato (FIBP) 0.05 mM, B-nicotidamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) 0.2 mM, tampão de Tris 30 mM (pH 7.5,  $10^{\circ}\text{C}$ ) e enzimas em excesso (PK e LDH). RENZIS e BORNACIN (1984) citam que a ativação máxima desta enzima ocorre na maioria dos casos a pH 7.2, e concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  de 100 e 20 mM respectivamente. A reação foi medida observando-se o decréscimo em absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm.

### 3.7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

#### 3.7.1. Microscopia óptica

As brânquias foram fixadas em ALFAC (85mL de álcool 80%, 10mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial), por um período de 24 horas em temperatura ambiente, sendo em seguida transferidas para álcool 70%.

As peças foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico (80%, 90% e 100%), diafanizadas com xileno e incluídas em Paraplast Plus (Sigma<sup>®</sup>), seguido de emblocagem e posterior trimagem, segundo as técnicas de rotina (CLARK, 1981). A partir dos blocos trimados foram feitos cortes seriados obtidos com o auxílio de micrótomo com espessuras de 3 a 5 $\mu$ m e aderidos a lâminas de vidro com albumina 1% esticados em uma placa aquecedora e secos a temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram submetidos às técnicas de rotina de desparafinização, hidratação e coloração no Laboratório de Biologia Integrativa de Peixes (BioPx).

A fim de analisar e descrever as características estruturais e histoquímica das brânquias em microscopia de luz e para identificação e a localização dos diferentes tipos celulares do epitélio branquial, as lamínas foram evidenciadas com as técnicas Hematoxilina de Harris e Eosina (CLARK, 1981).

A análise e a documentação fotográfica das lâminas foi feita no fotomicroscópio Zeiss Axiophot.

#### 3.7.2. Microscopia eletrônica

As brânquias foram fixadas em Karnowsky (CLAUREP GLAUERT, 1975) (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,2M pH 7.2 a 4°C). Em seguida as peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,2M pH 7.2 a 4°C e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,2M pH 7.2 durante 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida colocado em

acetona. A impregnação e a inclusão foram levadas a efeito em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes ultra-finos foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante.

Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A análise do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### 3.8. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

As alterações histopatológicas observadas nas brânquias foram avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET *et al.* (1999). As alterações consideradas e seus respectivos fatores de importância estão listados na Tabela 1. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores de 0 a 6 para as alterações observadas, sendo: 0 = inalterado, 2 = ocorrência ocasional, 4 = ocorrência moderada e 6 = ocorrência severa (lesão difusa). Os valores intermediários também foram considerados. Os Índices das Brânquias ( $I_B$ ) foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$I_B = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

aonde, pr = padrão de reação, alt = alteração, a = pontuação atribuída à alteração, e w = fator de importância. Estes índices representam o grau de injúria sofrida pelo órgão, sendo que um índice de lesão com valor elevado representa alto grau de injúria do órgão.

**Tabela 1-** Alterações histopatológicas consideradas nas análises das brânquias de acordo com Bennett *et al.* (1999).

<b>PADRÃO DE REAÇÃO</b>	<b>UNIDADE FUNCIONAL</b>	<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>FATOR DE IMPORTÂNCIA</b>	
<b>BRÂNQUIAS:</b>				
<b>Alterações Circulatórias</b>		Hemorragia/Hiperemia/Aneurisma	1	
		Edema intercelular (descolamento de epitélio)	1	
<b>Alterações Regressivas</b>	Epitélio	Alterações estruturais (desestruturação de lamelas secundárias)	1	
		Alterações citoplasmáticas	1	
		Depósitos	1	
		Alterações nucleares	2	
		Atrofia	2	
		Necrose	3	
		Tecido de Suporte	Alterações estruturais	1
	Alterações citoplasmáticas		1	
	Depósitos		1	
	Alterações nucleares		2	
	Atrofia		2	
	Necrose		3	
	<b>Alterações Progressivas</b>		Epitélio	Hipertrofia
		Hiperplasia		2
Tecido de Suporte		Hipertrofia	1	
		Hiperplasia	2	
		<b>Inflamação</b>	Exudato	1
			Ativação do Sistema Reticulo Endotelial	1
Infiltração Leucocitária	2			



### 3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para avaliar a atividade da ATPase entre os diferentes níveis de salinidade, primeiramente foi testada a homogeneidade das variâncias, com o teste de homocedasticidade através do Teste de Bartlett e posteriormente foram utilizados o teste paramétrico Anova (Análise de Variância) ou o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste complementar de Dunns.

Na avaliação de 3 salinidades dentro de um mesmo teste, seja de 12 horas seja de 96 horas, consideramos cada salinidade como um tratamento diferente.

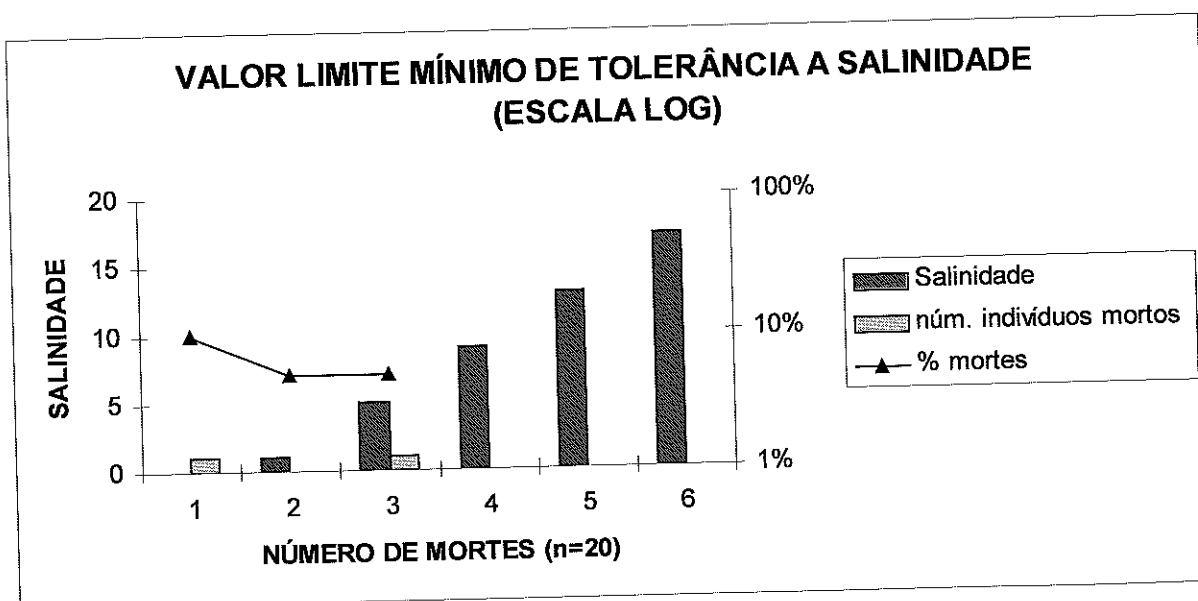
## 4. RESULTADOS

### 4.1. LIMITES MÁXIMO E MÍNIMO DE TOLERÂNCIA DO PEIXE *B. saporator* À VARIAÇÃO DE SALINIDADE

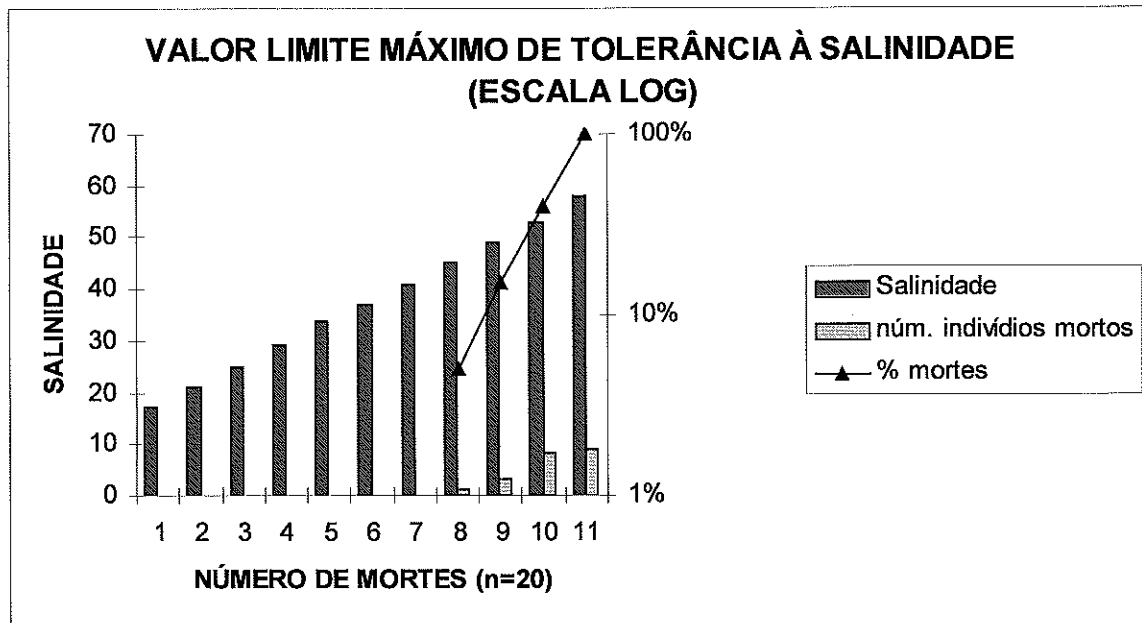
Foi determinado que o valor limite mínimo de tolerância à baixa salinidade para *B. saporator* é 0ppm, e o valor limite máximo de tolerância à alta salinidade é 58 ppm.

Como no limite mínimo somente um exemplar morreu próximo a 5ppm e um em 0ppm, totalizando somente 10% dos animais em teste, desconsideramos a morte como referencial de tolerância mínimo (Figura 3).

Para o limite máximo observamos a morte de 1 animal na salinidade 45ppm, 3 animais na salinidade 49ppm, 8 animais na salinidade 53ppm e 9 animais na salinidade 59ppm, totalizando 100% dos peixes em teste (Figura 4).



**Figura 3-** Limite mínimo de tolerância do peixe *B. saporator* à variação de salinidade



**Figura 4-** Limite máximo de tolerância do peixe *B. saporator* à variação de salinidade

Foram considerados como padrão os exemplares conservados em aquário a 17ppm de salinidade, mesma salinidade média encontrada no ambiente onde os exemplares foram coletados.

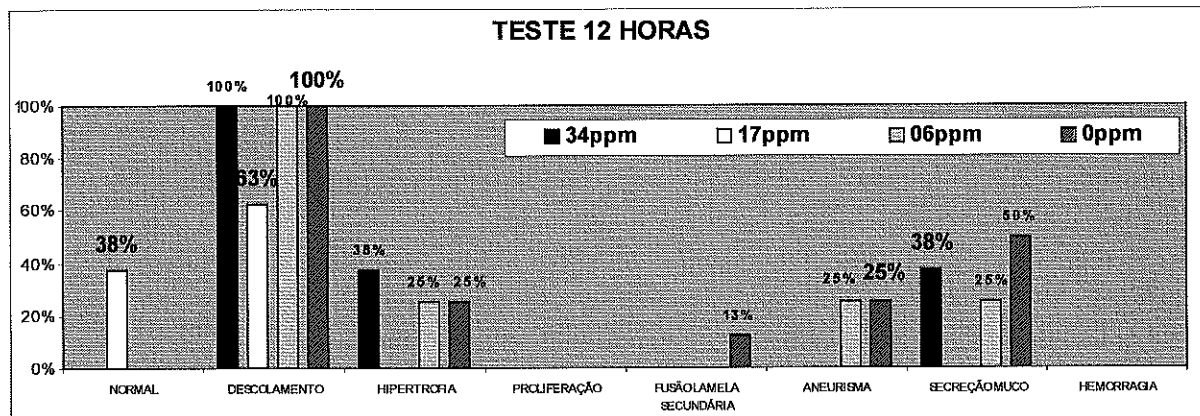
#### 4.2. MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO BRANQUIAL

A morfologia dos filamentos branquiais de *B. saporator* observada ao microscópio óptico apresentou padrão comum a outros teleósteos, com lamelas primárias (filamentos branquiais) e longas e delgadas lamelas secundárias com capilares sanguíneos (Figura 7).

As alterações histopatológicas foram observadas e contabilizadas (Tabela 2 e Tabela 3). Podemos destacar, além dos tecidos inalterado (Figura 7), as alterações: descolamento do epitélio (Figura 8 e Figura 9), hipertofia (Figura 10), fusão de lamelas secundárias (Figura 11), aneurisma (Figura 12), e hemorragia (Figura 13).

**Tabela 2** - Alterações histopatológicas observadas em *B. saporator* nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 12h. Porcentagens referentes a cada alteração considerando n=8

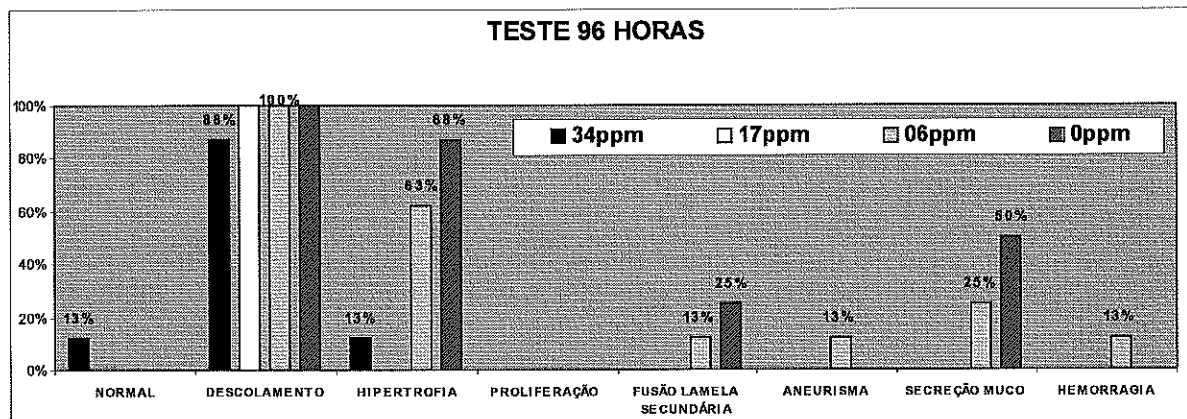
Alterações, Número de indivíduos que apresentam a alteração, % de indivíduos que apresentam a alteração nas diferentes salinidades.								
12h	34ppm	%	17ppm	%	06ppm	%	0ppm	%
NORMAL	0	0	3	37,5	0	0	0	0
DESCOLAMENTO	8	100	5	62,5	8	100	8	100
HIPERTROFIA	3	37,5	0	0	2	25	2	25
PROLIFERAÇÃO	0	0	0	0	0	0	0	0
FUSÃO LAMELAS SECUNDÁRIAS	0	0	0	0	0	0	1	12,5
ANEURISMA	0	0	0	0	2	25	2	25
SECREÇÃO DE MUCO	3	37,5	0	0	2	25	4	50
HEMORRAGIA	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 5** – Gráfico da porcentagem de alterações histopatológicas observadas em *B. saporator* nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 12h (n=8)

**Tabela 3** - Alterações histopatológicas observadas em *B. soporator* nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 96h. Porcentagens referentes a cada alteração considerando n=8

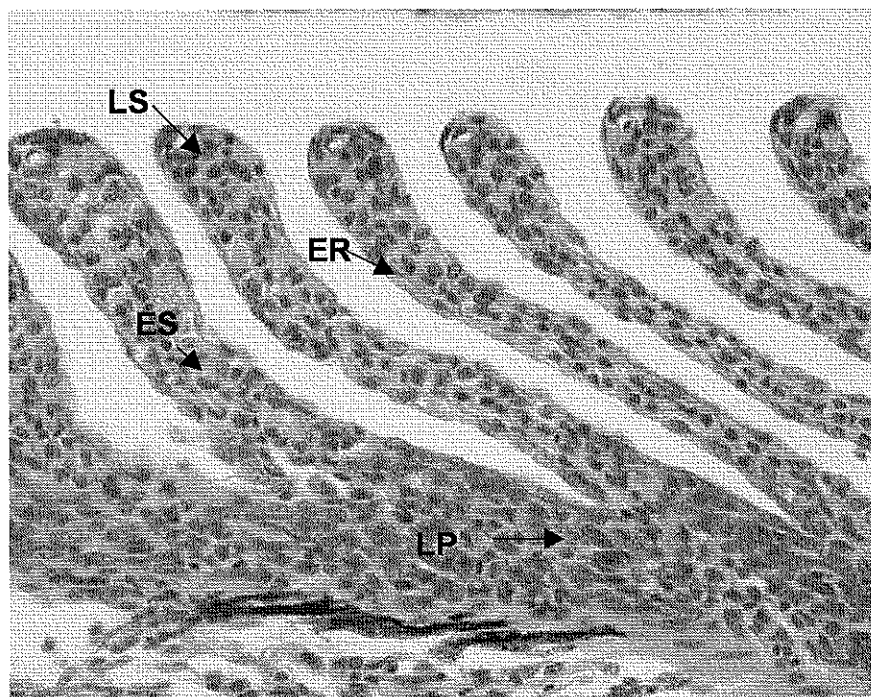
Alterações, Número de indivíduos que apresentam a alteração, % de indivíduos que apresentam a alteração nas diferentes salinidades.								
96h	34ppm	%	17ppm	%	06ppm	%	0ppm	%
NORMAL	1	12,5	0	0	0	0	0	0
DESCOLAMENTO	7	87,5	8	100	8	100	8	100
HIPERTROFIA	1	12,5	0	0	5	62,5	7	87,5
PROLIFERAÇÃO	0	0	0	0	0	0	0	0
FUSÃO LAMELA SECUNDÁRIA	0	0	0	0	1	12,5	2	25
ANEURISMA	0	0	0	0	1	12,5	0	0
SECREÇÃO MUCO	0	0	0	0	2	25	4	50
HEMORRAGIA	0	0	0	0	1	12,5	0	0



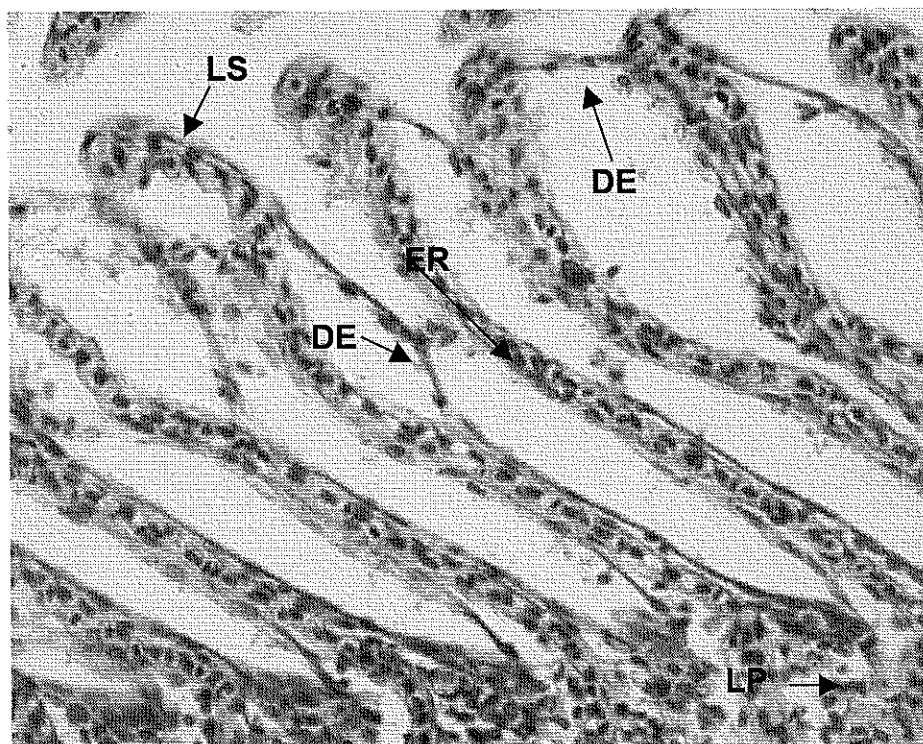
**Figura 6** – Gráfico da porcentagem de alterações histopatológicas observadas em *B. soporator* nas diferentes salinidades (34ppm, 17ppm, 6ppm e 0ppm) após o teste de 96h (n=8)

As eletromicrografias mostraram a ultra estrutura das células que compõe os filamentos branquiais (Figura14). Na situação controle, após 96 horas em água 17ppm observa-se a lamela primária na região interlamelar (entre lamelas secundárias - figura15) apresentando células de cloreto. Estas células possuem mitocôndrias espalhadas por todo seu citoplasma envoltas por um sistema tubular de membranas (Figura16) e região apical com algumas projeções da membrana apical em contato com o meio externo (água)- figura17. Observa-se ainda nas proximidades da região apical de uma célula de cloreto, intensas interdigitações e desmossomas entre células adjacentes (Figura19). As lamelas secundárias apresentam delgadas células pavimentares revestindo-as externamente e células sanguíneas no interior dos capilares (Figura18). Na situação experimental, após 12 horas em água 6ppm observa-se células acessórias com citoplasma mais eletrodense quando comparado com o das células de cloreto e também rico em mitocôndrias. Em um aumento maior, observa-se o aspecto do citoplasma de uma célula de cloreto, com abundancia de mitocôndrias envoltas pelo sistema tubular de membranas (Figura 20).

Também foram detectadas alterações significativas nos tecidos branquiais. Dentre estas alterações podemos destacar a hiperplasia, que corresponde à proliferação de células do epitélio interlamelar e respiratório podendo levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias. Também observou-se aneurisma que é descrito como uma dilatação do espaço sanguíneo devido à lesão das células pilares e acúmulo de células sanguíneas. O descolamento do epitélio, caracterizado pela sua separação da membrana basal devido a infiltração de fluido intersticial nas lamelas secundárias também foi demonstrado. Todas as alterações observadas correspondentes aos diferentes tempos do experimento e diferentes salinidades estão organizadas e expostas na Tabela 2 e Tabela 3.

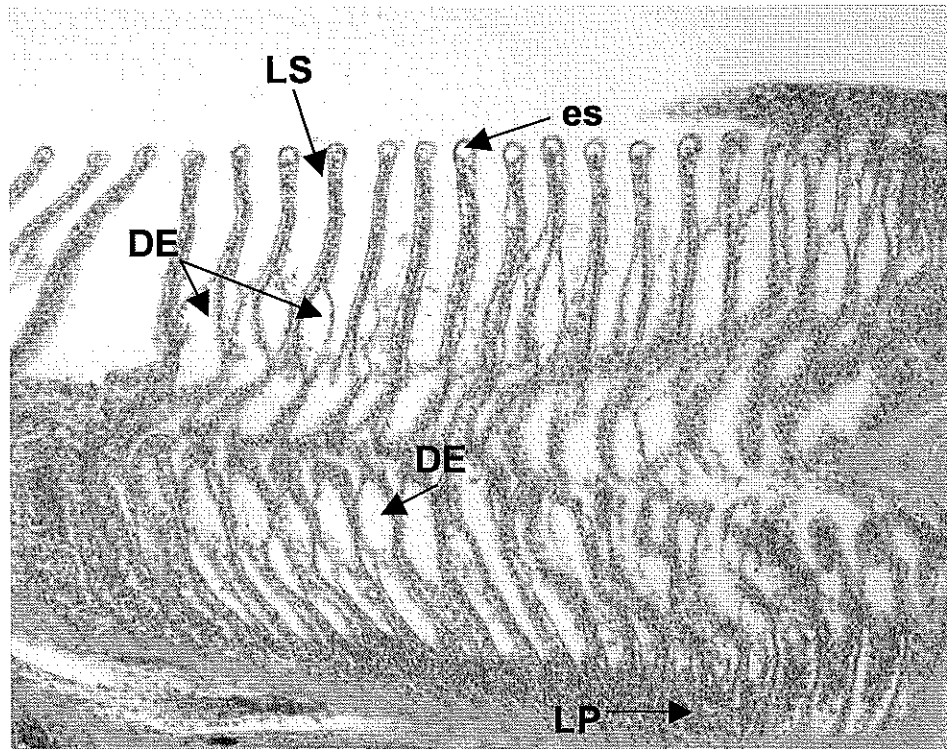


**Figura 7** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 17ppm – 96h. Corte longitudinal. Observar: lamela primária (LP), lamelas secundárias (LS), epitélio respiratório (ER) e espaço sanguíneo (ES). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).



**Figura 8** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 6 ppm – 96h. Corte longitudinal. Observar: descolamento do epitélio respiratório (DE), lamela primária (LP), lamelas secundárias (LS) e epitélio respiratório (ER). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).

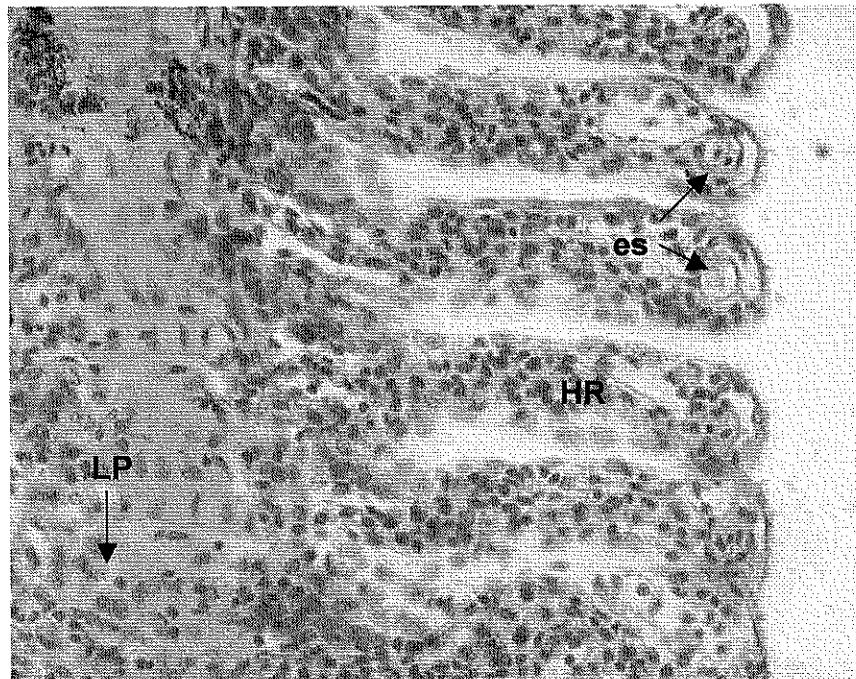




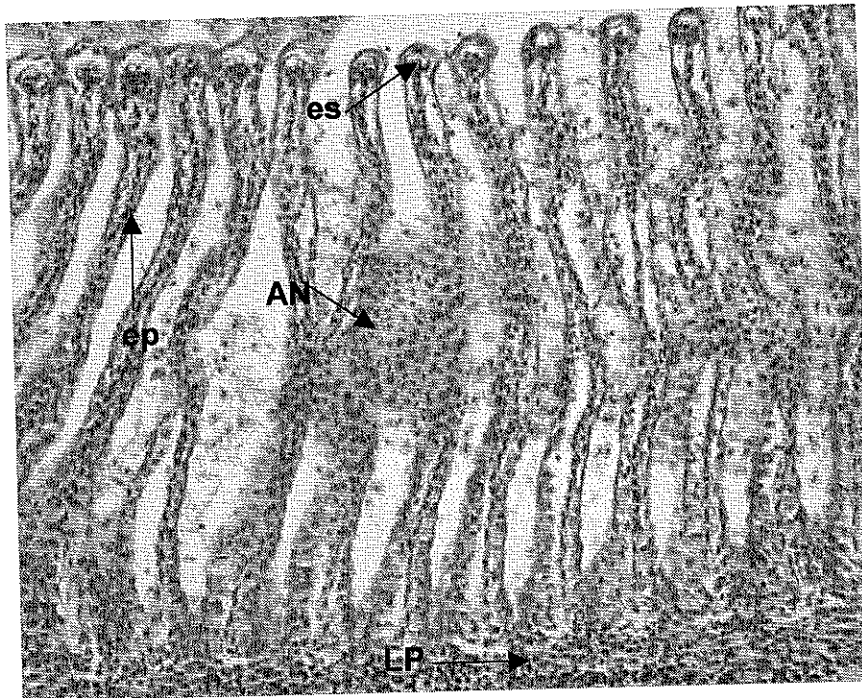
**Figura 9** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 6ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: descolamento do epitélio respiratório (DE), lamela primária (LP) , lamelas secundárias (LS), e espaço sanguíneo (es).. Microscopia de luz. Aumento 400X . Coloração Hematoxilina eosina (HE).



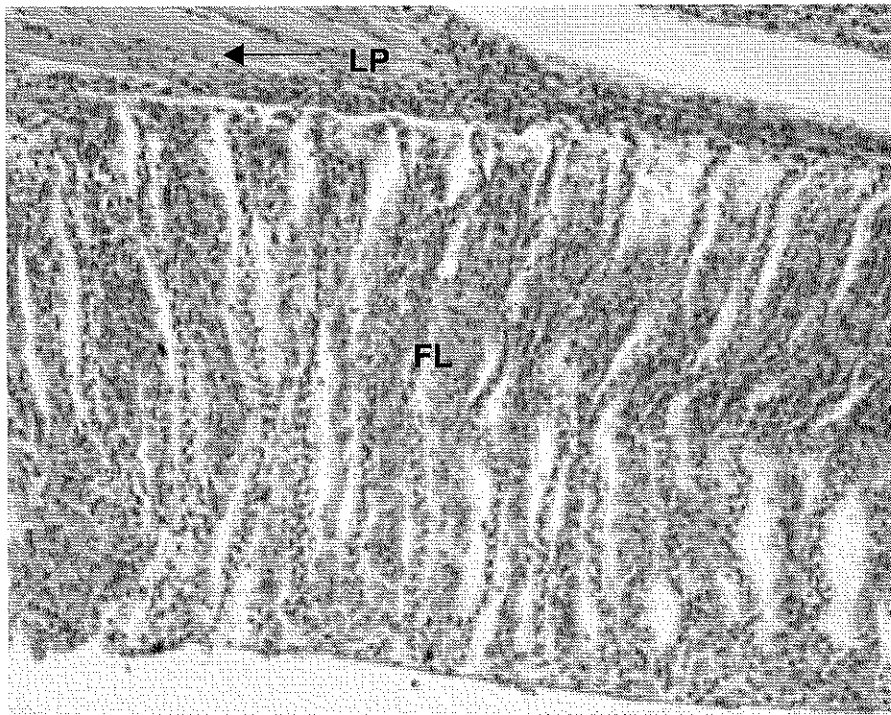
**Figura 10** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 0ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: hipertrofia das células do epitélio respiratório (HR) e lamela primária (LP). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).



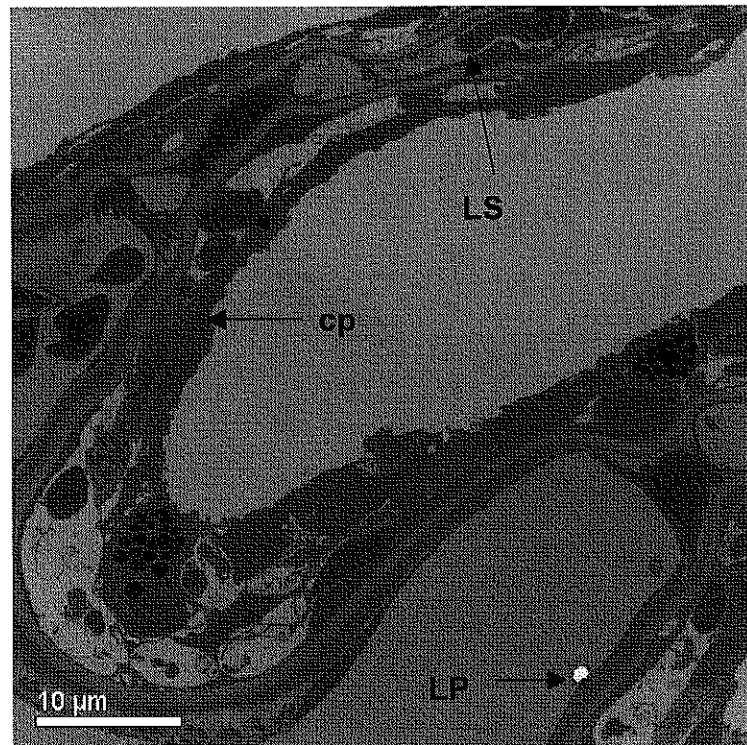
**Figura 11** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 6ppm - 96h. Corte longitudinal. Observar: Hipetrofia do epitélio respiratório (HR), lamela primária (LP) e espaço sanguíneo (es). Microscopia de luz. Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).



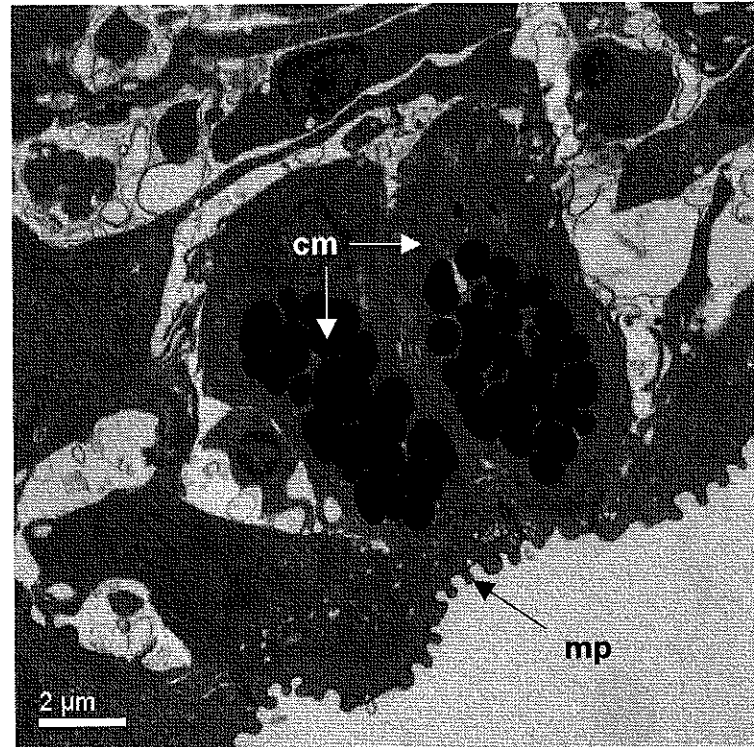
**Figura 12** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 06ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: aneurisma (AN), lamela primária (LP), espaço sanguíneo (es) e célula epitelial (ep). Microscopia de luz. Aumento 400X. Coloração Hematoxilina eosina (HE).



**Figura 13** - Organização estrutural das brânquias de *Bathygobius soporator* exposto a salinidade 0ppm - 12h. Corte longitudinal. Observar: local de fusão entre duas lamelas secundárias (FL) e lamela primária (LP). Microscopia de luz. Aumento 400X . Coloração Hematoxilina eosina (HE).

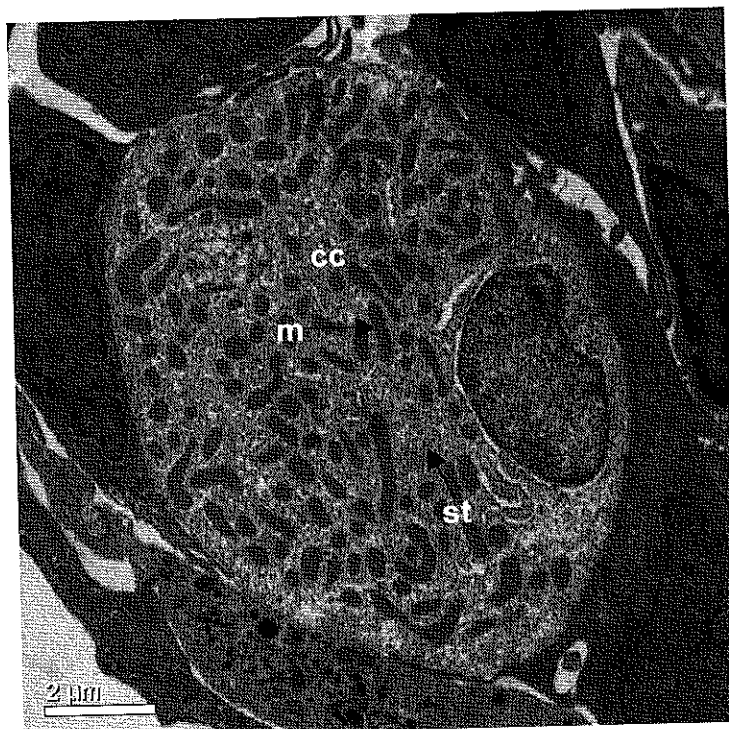


**Figura 14** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células sanguíneas no lúmen de um capilar e célula de muco (cm). Aumento 2.500X.



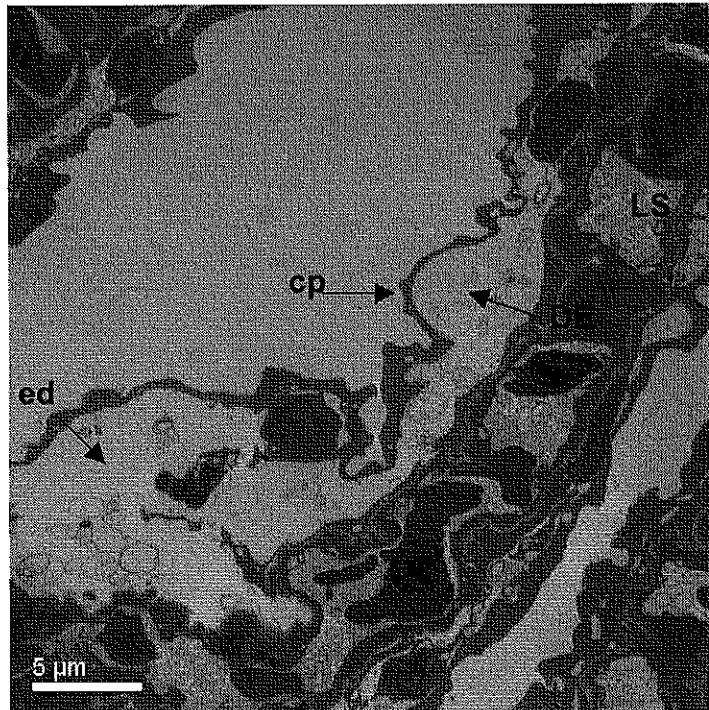
**Figura 15** - Estrutura do epitélio branquial de *B. saporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Células de muco (cm) e projeções da membrana apical em contato com o meio externo (mp). Aumento 8.000X.



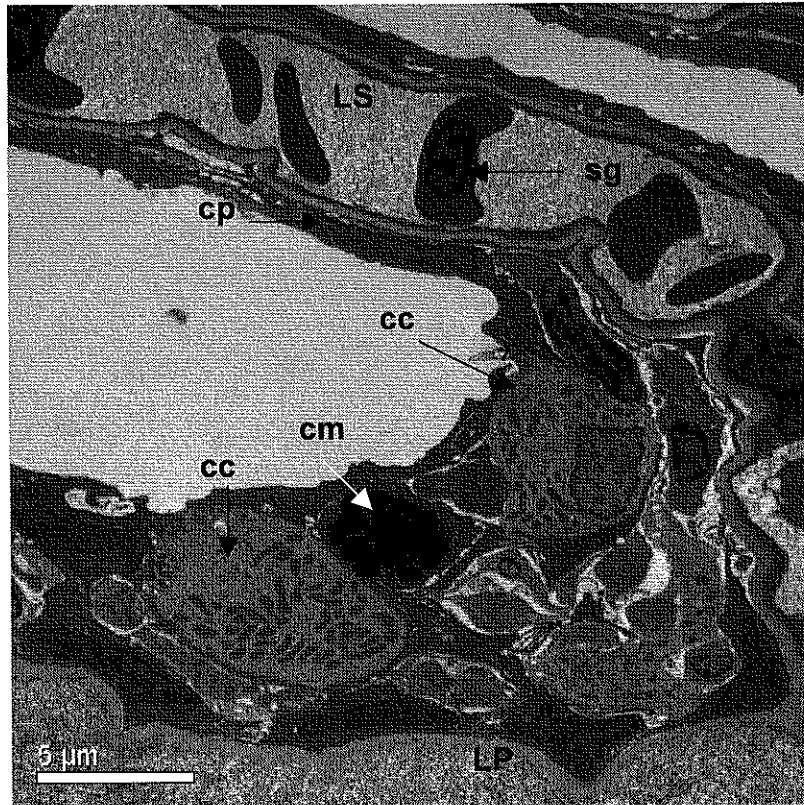


**Figura 16** - Estrutura do epitélio branquial de *B. saporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 0ppm. Células de cloreto (cc), mitocôndrias espalhadas por todo seu citoplasma (m) e sistema tubular de membranas (st). Aumento 10.000X.

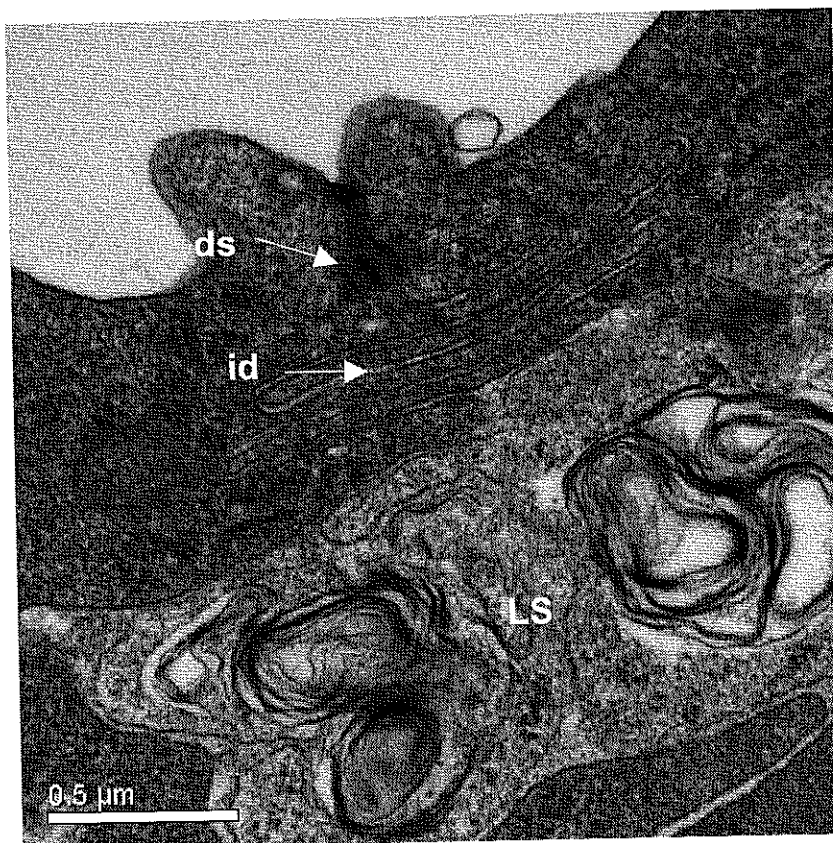




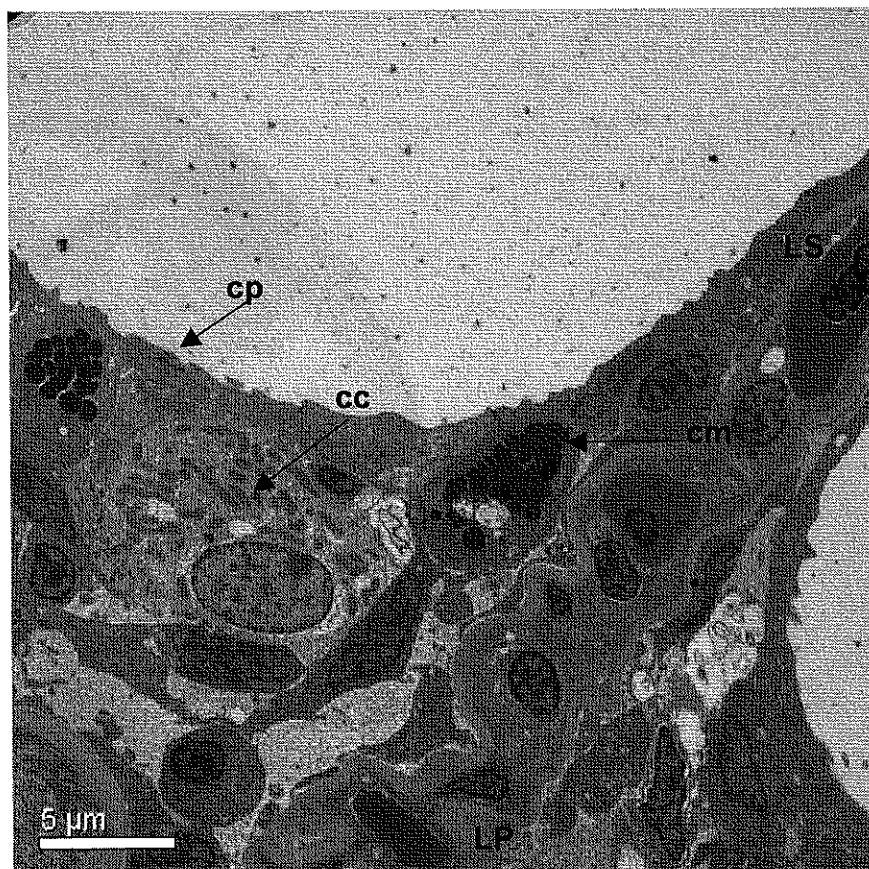
**Figura 17** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 34ppm. Lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), descolamento (DE) e edema (ed). Aumento 4.000X.



**Figura 18** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 96 horas em salinidade 17ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células de cloreto (cc), células sanguíneas no lúmen de um capilar (sg) e célula de muco (cm). Aumento 5.000X.



**Figura 19** - Estrutura do epitélio branquial de *B. saporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 17ppm. Lamela secundária (LS) com interdigitações (id) desmossomo (ds) . Aumento 60.000X.



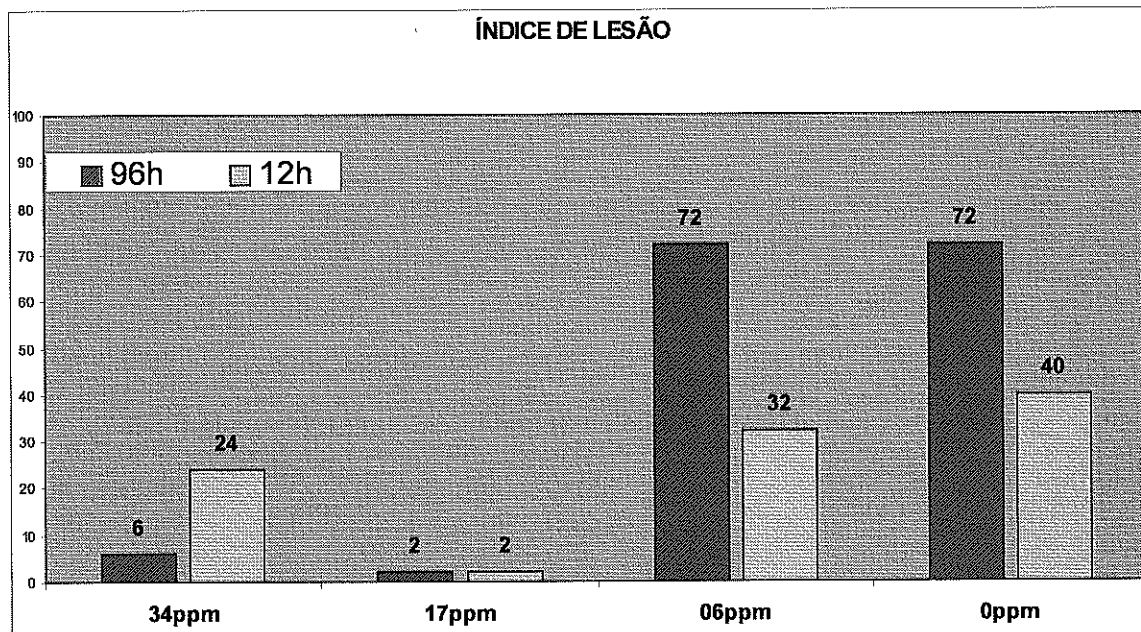
**Figura 20** - Estrutura do epitélio branquial de *B. soporator* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 12 horas em salinidade 6ppm. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) com células pavimentares (cp), células de cloreto (cc) e célula de muco (cm). Aumento 4.000X.

### 4.3. ÍNDICE DE LESÃO

Levando-se em consideração as alterações histopatológicas observadas nos tecidos branquiais e utilizando-se os dados calculados que estão na Tabela 4, foram obtidos os índices de lesão.

**Tabela 4** - Alterações histopatológicas consideradas nas análises das Brânquias de acordo com Bennett *et al.* (1999) considerando as diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) nos testes de 12h e 96h. Um fator de importância de 1 a 3 foi atribuído para cada alteração e aplicado na fórmula para obtenção dos valores acima. pr = padrão de reação, alt = alteração, a = pontuação atribuída à alteração, e w = fator de importância.

	34ppm - 96h	34ppm - 12h	17ppm - 96h	17ppm - 12h	06ppm - 96h	06ppm - 12h	0ppm - 96h	0ppm - 12h
soma pr	1	2	1	1	2	2	2	2
soma alt	2	2	1	1	3	2	3	2
a	3	3	2	2	4	4	4	5
w	1	2	1	1	3	2	3	2
índice de lesão	6	24	2	2	72	32	72	40



**Figura 21** – Grau de injúria sofrida pelas brânquias, sendo que um índice de lesão com valor elevado representa alto grau de injúria

Na salinidade 34ppm, observamos que o índice de lesão foi maior no teste de 12 horas do que no teste de 96 horas. Assim, podemos observar que quanto menor a salinidade, maior o índice de lesão no teste de 96 horas.

#### 4.4. ATIVIDADE $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase DE CÉLULAS BRANQUIAIS DE *B. saporator* EXPOSTOS A DIFERENTES

##### 4.4.1. Teste de 12 horas

Os efeitos do ensaio para mensurar a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados de brânquias de *B. Saporator* em 12 horas de teste estão expostos na Figura 22. A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aumentou quando comparamos as amostras expostas à salinidade 6ppm em relação à 17ppm e esta em relação à 34 ppm, como observamos na Figura 23. Também podemos observar que em nível de significância de 5% a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados de brânquias expostas a salinidade 34ppm difere da salinidade 6ppm, a salinidade 34ppm difere da salinidade 0ppm e a salinidade 17ppm difere da salinidade 6ppm (Tabela 7). A menor média obtida para a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados foi das amostras expostas à salinidade 6ppm com o valor  $0,3794\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$  e o maior valor foi das amostras expostas a salinidade 34ppm com atividade  $1,7270\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$  (Tabela 5).

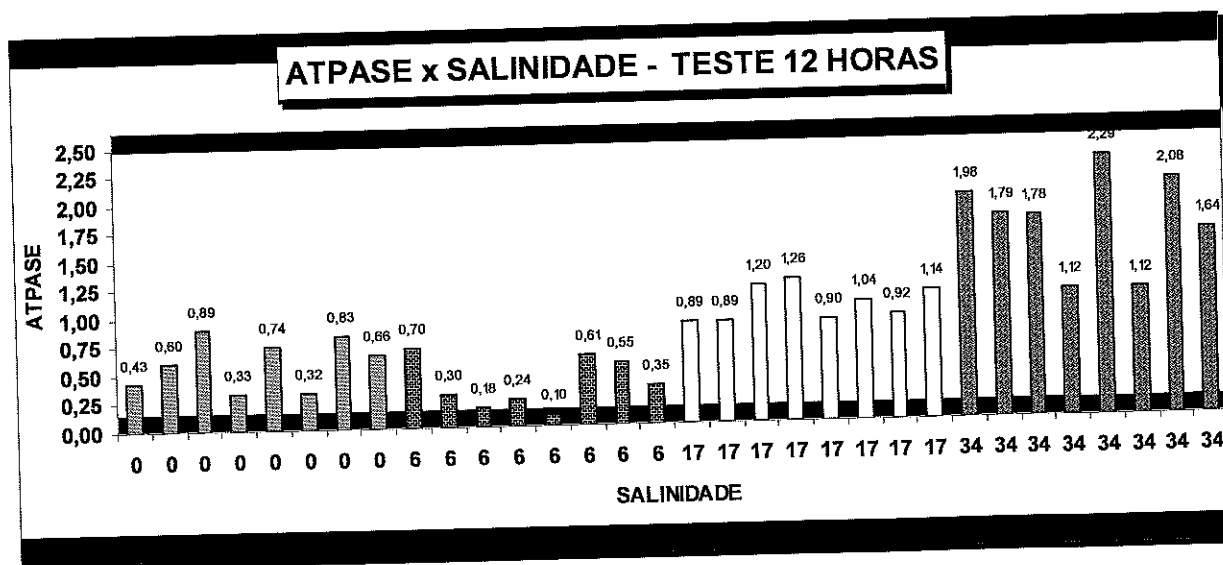


Figura 22 - Atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de células branquiais de *B. saporator* expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 12h.

**Tabela 5 - Resumo Estatístico Teste 12 horas**

<b>Resumo Estatístico Teste 12 horas</b>					
	<b>Todas as salinidades</b>	0ppm	6ppm	17ppm	34ppm
Número de Observações	32	8	8	8	8
Média	0,9339	0,6000	0,3794	1,0293	1,7270
Mediana	0,8887	0,6311	0,3241	0,9821	1,7839
Moda	0,8887	0	0	0,8887	1,1249
Variância	0,3401	0,0482	0,0481	0,0231	0,1787
Valor mínimo	0,1009	0,3221	0,1009	0,8887	1,1249
Valor máximo	2,2926	0,8887	0,7041	1,2579	2,2976

**Anova****Tabela 6 - Estatística Anova para o teste de 12 horas**

Fonte de Variação	G.L.	SQ	QM	F	P-valor
Tratamento	3	8,45661	2,81887	37,79	0,000
Resíduos	28	2,08873	0,0745974	-	-
Total	31	10,5453	-	-	-

Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos  $H_0$ , ou seja, a enzima ATPase não é igual em todos os níveis de salinidade medidos.

**Teste de Bartlett.**

Ao nível de significância de 5%, não rejeitamos  $H_0$ , ou seja, existe homocedasticidade entre os níveis de salinidade.

Porém, como o p-valor está no limite resolvemos considerar que não existe homocedasticidade entre os dados e assim, utilizar um método Não-paramétrico.

### Teste Kruska Wallis (Não paramétrico)

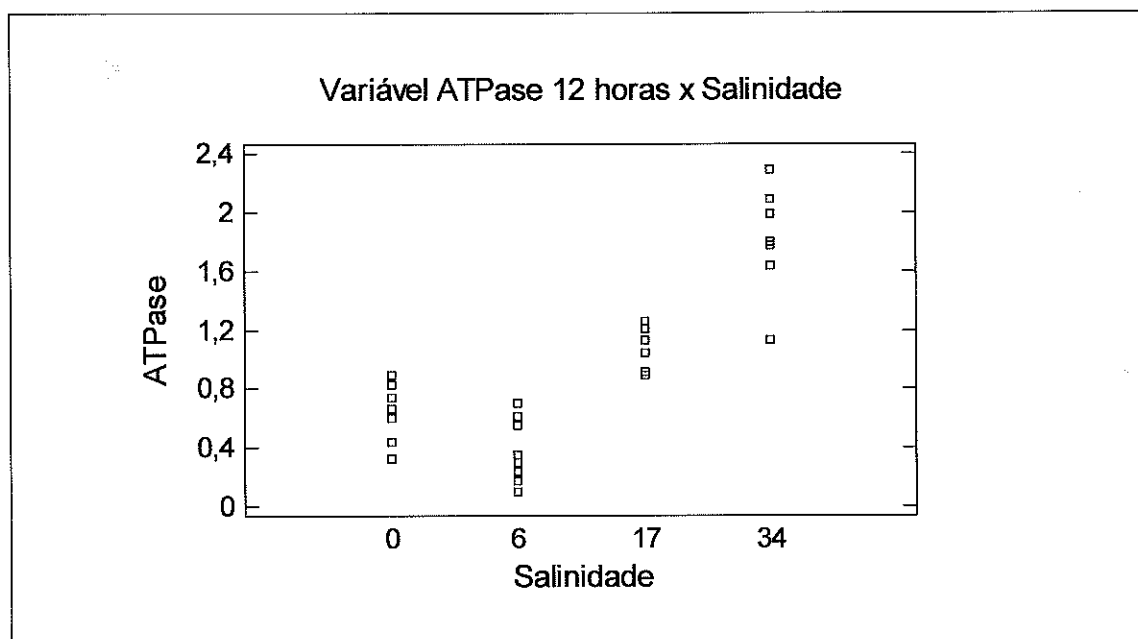
Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos  $H_0$ , ou seja, a proteína ATPase não é igual em todos os níveis de salinidade medidos.

Utilizando o Teste de Dunn's (Teste de comparação):

**Tabela 7** - Estatística Dunn's para o teste de 12 horas. Amostras com  $P < 0,01$

Comparação	Estatística	P-valor
<b>Salinidade 34 x Salinidade 6</b>	<b>-21,5</b>	<b>P&lt;0,001</b>
<b>Salinidade 34 x Salinidade 0</b>	<b>-16,875</b>	<b>P&lt;0,01</b>
<b>Salinidade 17 x Salinidade 6</b>	<b>-14,875</b>	<b>P&lt;0,01</b>

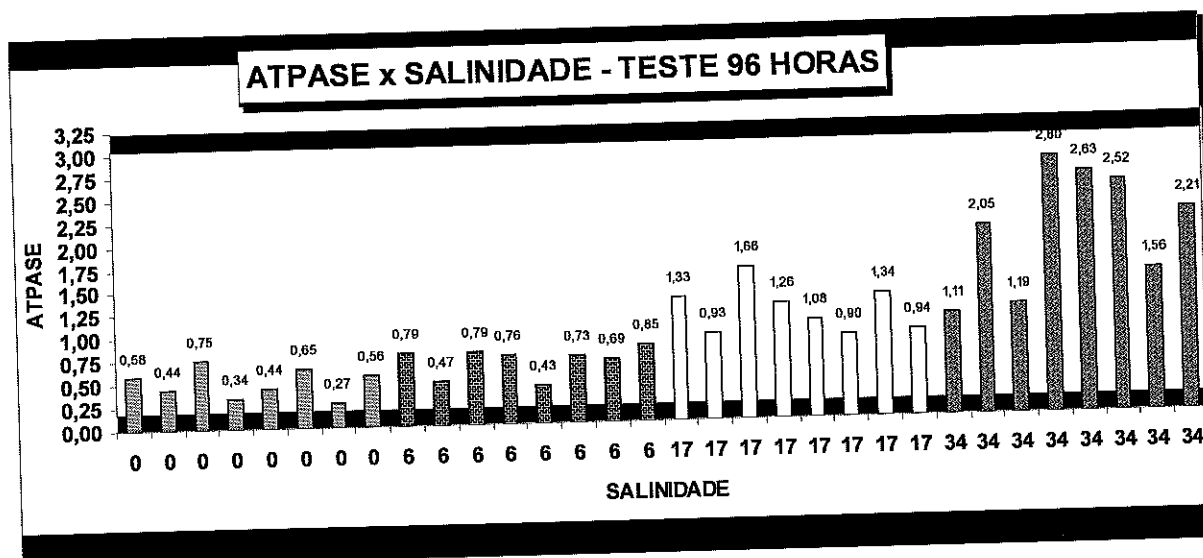




**Figura 23** - Atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$ ) de células branquiais de *B. soropator* expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 12h.

#### 4.4.2. Teste de 96 horas

Os efeitos do ensaio para mensurar a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados de brânquias de *B. Soporator* em 96 horas de teste estão expostos na Figura 24. A atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aumentou quando comparamos as amostras expostas à salinidade 0ppm em relação à 6ppm e esta em relação à 17ppm e esta em relação à 34 ppm, como observamos na Figura 25. Também podemos observar que em nível de significância de 5% a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados de brânquias expostas a salinidade 34ppm difere da salinidade 6ppm, expostas a salinidade 34ppm difere da Salinidade 0ppm e expostas a salinidade 17ppm difere da Salinidade 0ppm. (Tabela 10). A menor média obtida para a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos homogenados foi das amostras expostas a salinidade 0ppm com o valor  $0,5026\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$  e o maior valor foi das amostras expostas a salinidade 34ppm com atividade  $2,0087\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$  (Tabela 8).



**Figura 24** - Atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de células branquiais de *B. soporator* expostas a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 96h.

**Tabela 8** - Resumo Estatístico Teste 96 horas

Resumo Estatístico Teste 96 horas					
	Todas as salinidades	0ppm	6ppm	17ppm	34ppm
Número de Observações	32	8	8	8	8
Média	1,0953	0,5026	0,6896	1,1803	2,0087
Mediana	0,8747	0,4980	0,7481	1,1710	2,1316
Moda	0,4401	0,4401	0	0	0
Variância	0,4735	0,0253	0,0241	0,0702	0,4262
Menor observação	0,2705	0,2705	0,4272	0,9016	1,1098
Maior observação	2,7971	0,7470	0,8479	1,6572	2,7971

## Anova

**Tabela 9** - Estatística Anova para o teste de 96 horas

Fonte de Variação	G.L.	SQ	QM	F	P-valor
Tratamento	3	10,8598	3,61993	26,52	0,000
Resíduos	28	3,82156	0,136484	-	-
Total	31	14,6813	-	-	-

Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos  $H_0$ , ou seja, a atividade da enzima ATPase não é igual em todos os níveis de salinidade medidos.

### Teste de Bartlett.

Ao nível de significância de 5%, rejeitamos  $H_0$ , ou seja, não existe homocedasticidade entre os níveis de salinidade.

Como este pressuposto da Anova não foi atendido, usaremos técnicas Não-paramétricas, em específico o Teste de Kruskal-Wallis.

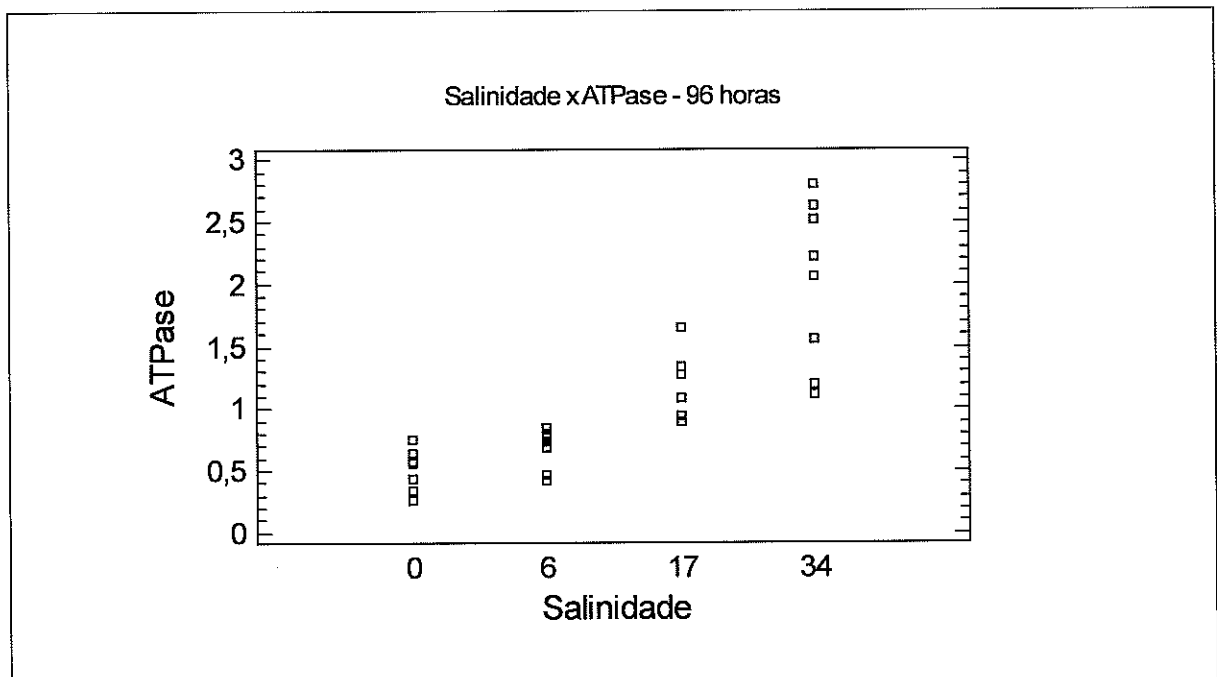
### Teste Kruskal Wallis (Não paramétrico)

Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos  $H_0$ , ou seja, a proteína ATPase não é igual em todos os níveis de salinidade medidos.

Utilizando o Teste de Dunn's ( Teste de comparação):

**Tabela 10** - Estatística Dunn's para o teste de 96horas. Amostras com  $P < 0,01$

Comparação	Estatística	P-valor
Salinidade 34 x Salinidade 6	-16,375	$P < 0,01$
Salinidade 34 x Salinidade 0	-21,375	$P < 0,001$
Salinidade 17 x Salinidade 0	-15,625	$P < 0,01$



**Figura 25** - Atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}/\mu\text{gWM}^{-1}$ ) de células branquiais de *B. soporator* expostos a diferentes salinidades (0ppm, 6ppm, 17ppm e 34ppm) no teste de 96h.

## 5. DISCUSSÃO

A morfologia básica observada para os filamentos branquiais de *B. saporator* é semelhante à estrutura descrita para outros teleósteos, como traíra (*Hoplias malabaricus*) (MORON & FERNANDES, 1996), o bagre (*Hypostomus plecostomus*) (FERNANDES et al., 1998) *Dicentrarchus labrax* (BOUTET et al., 2006), tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (VAN DER HEIJDEN et al., 1997), esturjão (*Acipenser naccarii*) (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005), *Salmo salar* (salmão), *Oncorhynchus mykiss* (truta), *Salvelinus alpinus* (SHIVKAMAT & ROY, 2005), baiacus (*Sphoeroides testudineus e Sphoeroides greeleyi*) (PRODOCIMO & FREIRE, 2006) entre outros.

Pudemos observar que as brânquias de *B. saporator* apresentam segundo arco branquial formado por duas hemi-branquias, cada uma delas formadas por uma fileira de filamentos branquiais. Cada filamento branquial é formado por uma lamela primária, que por sua vez, apresenta duas fileiras de lamelas respiratórias ou lamelas secundárias, as quais apresentam a forma de arcos semilunares projetados lateralmente na lamela primária. Estas lamelas respiratórias são responsáveis pelas trocas gasosas assim como possuem células especializadas na regulação iônica e excreção. Cada lamela respiratória é limitada por uma camada de tecido epitelial simples pavimentoso. Este tecido delimita externamente o espaço sanguíneo, que é mantido pela presença de células pilares. Na região interlamelar encontra-se um epitélio estratificado, onde pode ser encontrado células de cloreto e células secretoras de muco (ROBERTS, 1989).

Além das células de cloreto responsáveis pelo transporte de NaCl, o epitélio branquial observado para *B. saporator* apresentou células pavimentares delgadas ocupando toda a superfície de contato entre o sangue e o ambiente externo (água). Este tem a finalidade de realizar transporte de gases durante a respiração (SARDET et al., 1979; LAURENT & DUNEL, 1980; MORON & FERNANDES, 1996; PERRY et al., 1997). Células acessórias ocorreram na base ou ao lado das células de cloreto na região interlamelar, com citoplasma mais eletrodense do que o citoplasma das células de cloreto. As células acessórias possuem mitocôndrias e também sistema

tubular de membranas cuja função está relacionada com a secreção de sal, sendo encontradas em epitélio branquial de outros teleósteos marinhos (SARDET *et al.*, 1979; GIBBS, 1989; McCORMICK, 1995; FERGUNSON, 1995; FERNANDES, *et al.*, 1998; MORON & FERNANDEZ, 1996; ZADUNAISKY, 1996; VAM DER HEIJDEN *et al.*, 1997; MENDES, 2001; HIROSE, 2003; SHIVKAMAT & ROY, 2005; GIARI *et al.*, 2006; LAURENT *et al.*, 2006; KIDDER *et al.*, 2006).

A ultraestrutura das células de cloreto do epitélio branquial de *B. saporator* é semelhante à descrita para outras espécies de teleósteos dulcícolas e marinhos. Estas células possuem formato globoso e sistema tubular de membranas bastante desenvolvido e associado a mitocôndrias, além de projeções da membrana apical, tal como descrito para outras espécies. (SARDET *et al.*, 1979; McCORMICK, 1995; FERGUNSON, 1995; FERNANDES, *et al.*, 1998; MORON, 1996; ZADUNAISKY, 1996; VAM DER HEIJDEN *et al.*, 1997; MENDES, 2001; SHIVKAMAT & ROY, 2005; GIARI *et al.*, 2006; LAURENT *et al.*, 2006).

A observação dos epitélios branquiais de *B. saporator* indicam estrutura especializada para transporte de íons, com células abundantes em dobramentos de membrana envolvendo mitocôndrias, característico de epitélios de transporte de íons. Ao ser alterada a salinidade da água, foram detectadas alterações significativas nas estruturas destes epitélios.

Ao ser diminuída a salinidade ambiental para 6ppm em 96h de exposição e 0ppm em 12h de exposição observamos hiperplasia dos tecidos branquiais, o que corresponde à proliferação de células do epitélio interlamelar e respiratório podendo levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias (MALLAT 1985; ROBERTS 1989). Também observamos aneurismas que são descritos como uma dilatações do espaço sanguíneo devido à lesão das células pilares e acúmulo de células sanguíneas (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995) em salinidades baixas como em 6ppm em 12h e 96h, assim como em 0ppm em 12h. Outra alteração detectada foi o descolamento do epitélio que é caracterizado pela separação existente entre epitélio da lamela secundária e a membrana basal (FERGUSON 1995) devido a infiltração de fluido intersticial (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995). Esta alteração foi observada em todos os níveis de salinidade em diferentes intensidade e frequência,

porém destacamos notável freqüência nas salinidades diferentes de 17ppm em 12h de exposição em 6ppm e 0ppm em 96h de exposição.

Quando observamos descolamento do epitélio respiratório ou edema há separação entre o espaço sanguíneo e o epitélio que o recobre devido a uma infiltração de líquido originário do sangue após aumento de permeabilidade na parede dos vasos ou distúrbio circulatório local. Esta alteração causa necrose das células epiteliais e quando é intensa pode ter efeitos fisiológicos como uma letal disfunção respiratória e osmorregulatória (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995) Porém trata-se de uma alteração reversível, tendo recuperação total tão logo o agente indutor seja retirado (ROBERTS, 1989).

A congestão corresponde à diminuição ou parada da circulação do sangue em um vaso. Quando há lesão das células pilares, esta congestão é seguida de uma dilatação do espaço sanguíneo. Esta alteração é denominada aneurisma ou telangectasia como pudemos observar em alguns exemplares expostos a extremos durante o experimento. Entretanto a substituição das células pilares e a atuação da regulação da circulação ou redistribuição do sangue levam ao retorno às condições normais (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995).

O muco tem como função proteger o epitélio e o aumento da secreção pode estar relacionado a uma reação a presença de um agente irritante como por exemplo a salinidade (ROBERTS, 1989). O retorno à condição de secreção normal depende da remoção do agente agressor.

Alterações como descolamento do epitélio respiratório, hipertrofia, hiperplasia, fusão das lamelas respiratórias, congestão e aumento da secreção de muco, induzidas por agentes irritantes nas lamelas branquiais não refletem ações específicas do agente, mas sim, refletem uma resposta fisiológica do peixe. Esta resposta pode ser regulada por fatores internos às brânquias ou ser parte de uma resposta sistêmica ao estresse (MALLAT, 1985).

Estas alterações nas lamelas branquiais apresentam um efeito comum que é o aumento da distância entre a água e o sangue, distanciando, com isso, o agente agressor do sistema de distribuição de moléculas do organismo (MALLAT, 1985).

Observamos e classificamos como hemorragia alterações presentes em brânquias de peixes expostos a salinidade de 6ppm durante 12h. onde há ruptura do epitélio respiratório e extravasamento do sangue para o meio externo. Esta pode levar a desestruturação das lamelas secundárias ocorrendo necrose, ou seja, morte celular generalizada, e por conseqüência à perda do padrão estrutural das lamelas. No caso de necrose houve ação direta do agente agressor. A lesão é reversível através de proliferação celular e substituição das células lesionadas. Quando ocorre em grandes proporções, esta alteração pode ser letal para o organismo. Porém em condições não letais, há proliferação celular e substituição das células mortas(MALLAT 1985, FERGUNSON 1995).

Alterações como hemorragia e desestruturações das lamelas secundárias são induzidas por agentes irritantes nas lamelas branquiais e refletem ações específicas do agente sobre as células do epitélio respiratório (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995).

As alterações branquiais aqui relatadas não são específicas para um agente agressor, sendo reconhecidas em animais submetidos a diferentes substâncias químicas (MALLAT, 1985). Podem, ainda, ser resultado de outros agentes físicos ou biológicos. De uma forma geral, estas alterações lesivas acarretam uma diminuição da eficiência respiratória, podendo, quando ocorrendo de forma intensa e combinada, levar a morte do indivíduo (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995).

Considerando o estado de saúde dos tecidos das brânquias avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET *et al.* (1999) verificamos que *B. saporator* depois da exposição a diferentes salinidades conserva higidez em salinidades superiores a 17ppm com tecidos permanecendo inalterados ou alterações de ocorrência ocasional. Os maiores graus de alteração, logo, menor higidez são observados em salinidade de 0ppm e, principalmente, 6ppm. Nestas salinidades observamos ocorrência moderada e ocorrência severa de alterações histológicas em ambos os tempos de exposição. Tais alterações branquiais aqui relatadas podem estar relacionadas à diminuição da salinidade do meio, ou seja, o fator físico salinidade, de uma forma geral, leva a alterações lesivas que acarretam em uma diminuição da eficiência respiratória, podendo, quando ocorrendo de forma



intensa e combinada, levar a morte do indivíduo (MALLAT 1985, FERGUNSON 1995, BERNET *et al.*, 1999).

Ainda considerando as ações específicas do agente sobre as células do epitélio respiratório podemos dar enfoque a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de células branquiais de *B. saporator* expostos a diferentes salinidades. Analisando atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase desta espécie nas diferentes salinidades testadas e nos diferentes tempos temos a indicação de que esta espécie é osmorreguladora, alterando a atividade branquial da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase o que levaria a uma manutenção das concentrações plasmáticas dos íons e sua estabilidade mesmo quando submetidos à redução ou aumento da salinidade, fato que se não ocorresse poderia levar a morte do indivíduo (EVANS, 2005; KIDDER, *et al.*, 2006).

Reverendo a literatura e trabalhos recentes concluímos que a função da osmorregulação envolve o transporte da água e de sais no organismo do peixe com o objetivo de manter a estabilidade do líquido extracelular. A manutenção desta estabilidade frente à variação de salinidade do meio depende de vários mecanismos fisiológicos. Para *B. saporator* submetidos a ambientes em diferentes salinidades, assim como para outras espécies na mesma condição experimental a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase das brânquias está relacionada à capacidade deste órgão osmoregulatório para a saída de íons adicionais em um ambiente hiperosmótico (MCCORNICK, 1995) e para a entrada de íons em um ambiente hiposmótico. Observamos nos resultados as mudanças na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase das brânquias depois que transferência para um meio hiperosmótico vai de encontro com a aquela relatada previamente para outras espécies, assim como com o papel fisiológico desta bomba de íons em teleósteos eurialinos (MCCORNICK, 1995). Além de que, estes resultados reforçam o modelo relacionando a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e a salinidade ambiental observadas para diversos teleósteos eurialinos.

O aumento progressivo do co-transporte ocasionado pela maior atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durante a passagem de *B. saporator* para salinidades mais altas durante os experimentos assim como a observação das micrografias eletrônicas nos levam a supor a localização desta proteína de transporte nas células de cloreto

branquiais. Esta é uma evidência adicional para o papel desta proteína na secreção de íons pelas brânquias. A aclimação na água com maior concentração de sais e a abundância de células de cloreto nesta condição embora este seja o primeiro estudo para quantificação para a proteína de co-transporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias de *B. soporator* vem de encontro a outros estudos de um grande número teleósteos que demonstraram aumentos na atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase da brânquia depois que transferência para maiores salinidades (MCCORNICK, 1995; EVANS, 2005; KIDDER, *et al.*, 2006).

Na aclimatização da água salgada para água doce é de grande importância a manutenção da regulação iônica visto que os peixes são submetidos a uma redução severa de íons devido à entrada adicional da água por osmose (DEANE & WOO, 2004). Para tanto propomos que *B. soporator* (a partir da análise dos resultados para  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial), a exemplo de outros peixes eurialinos se adaptam a salinidades diferentes regulando um número de funções fisiológicas chave que são necessárias para a homeostase. Tal cascata de eventos é descrita em uma série de respostas fisiológicas que culminam na diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial e secreção de NaCl (MCCORNICK, 1995; EVANS, 2005; KIDDER, *et al.*, 2006). Podemos supor que como resposta inicial a tal alteração do meio temos o fechamento dos espaços existentes entre células de cloreto e células acessórias (VARSAMOS, 2005). A partir da literatura existente e trabalhos publicados podemos esperar após este evento um aumento da prolactina plasmática (VARSAMOS, 2005; EPSTEIN *et al.*, 1980; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996;). Experimentos com outras espécies demonstram que estes hormônios induzem diminuição do número das células de cloreto e das invaginações nas suas membranas (PRODOCIMO & FREIRE, 2006). Tal diminuição reflete diretamente na diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e secreção de NaCl como resposta ao ambiente de água doce como verificamos em experimento com *B. soporator*. Por seguinte sugerimos que temos a ativação da  $\text{H}^+$  ATPase e os níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$  voltam ao normal, já que os animais sobreviveram às variações de salinidade em seu meio natural e em experimento (VARSAMOS, 2005).

Já na aclimatização da água doce para salgada ou hipersalina os peixes têm que conter a possibilidade de entrada adicional de íons e de perda osmótica de água. Para tanto supomos que a H<sup>+</sup> ATPase é desativada inicialmente em *B. saporator* a exemplo do que ocorre para outras espécies (VARSAMOS, 2004 2005; SAKAMOTO *et al.*, 1997; SEIDELIN, 1999; LIN *et al.*, 2004; PIERMARINI, 2000). Assim temos como resposta fisiológica o aumento do Na<sup>+</sup> plasmático que por conseqüência estimularia o aumento do cortisol e GH também no plasma (VARSAMOS, 2005). Tais hormônios demonstram em trabalhos com outras espécies a indução não só do aumento do número das células de cloreto mas também um acréscimo das invaginações das suas membranas (PRODOCIMO & FREIRE, 2006). A conseqüência final deste processo é o aumento da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e secreção de NaCl como podemos observar em nossos resultados. Por fim, podemos supor que os níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup> voltam ao normal, já que os animais sobreviveram às adversidades de mudança de salinidade tanto em seu meio natural quanto em experimento. Muitos teleósteos marinhos são fortemente eurialinos, possuindo grande capacidade de tolerar e se adaptar a redução de salinidade, especialmente animais que vivem em regiões estuarinas sujeitas a diluição da água do mar (JOBILING, 1995) situação encontrada na baía de Guaratuba, ambiente onde os exemplares de *B. saporator* utilizados em nossos estudos foram coletados. Nesta região observamos principalmente a variação sazonal da salinidade além da variação imposta pelo regime de marés. Sendo assim quando peixes desta região, incluindo a espécie estudada, são submetidos a uma redução de salinidade, as modificações fisiológicas ocorrem em duas etapas, por isso observamos valores diferentes de atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase quando comparamos animais expostos às mesmas salinidades porém em tempos diferentes (12h e 96h). Trabalhos descrevem que a primeira etapa é classificada como adaptativa. Nesta etapa ocorrem alterações na concentração iônica e osmótica do plasma pela perda de íons inorgânicos e ganho osmótico de água. Já a segunda etapa é regulatória, na qual a osmolaridade e as concentrações iônicas do plasma aumentam para os níveis normais, sendo reguladas e mantidas dentro de limites estreitos em homeostase. A redução da salinidade acarreta em geral uma redução

do número de células de cloreto das brânquias, e da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial, eventos controlados pelo hormônio prolactina (EPSTEIN *et al.*, 1980; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996). Por outro lado, em teleósteos dulcícolas eurialinos transferidos para a água do mar, na etapa adaptativa ocorre aumento da osmolaridade do plasma e da concentração iônica devido à reversão do gradiente salino que favorece agora a entrada difusiva de sal pelo epitélio branquial. Na etapa regulatória, após alguns dias ou semanas de aclimação à água do mar, em geral é observado um aumento no número de células de cloreto e aumento da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial, eventos controlados pelos hormônios cortisol e do crescimento (EPSTEIN *et al.*, 1980; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996; EVANS *et al.*, 2005; KIDDER, *et al.*, 2006). Portanto animais expostos por períodos curtos de tempo (horas) se comparados a animais expostos a períodos longos de tempo (dias ou semanas) apresentam valores diferentes nos valores da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase devido a respostas fisiológicas também diferentes, como observamos e deduzimos ter ocorrido para *B. soporator*.

Nossos resultados sugerem também um papel para esta enzima na entrada de íons em ambientes hiposmóticos. Entretanto nós não temos nenhuma indicação se *B. soporator* pode ou não absorver ativamente estes íons em ambientes hiposmóticos pelo epitélio branquial tendo em vista a redução da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial quando há diminuição da salinidade ambiental. É notável como esta espécie mantém a osmolaridade de seu organismo por 96 horas diminuindo o efluxo de íons. Assim é possível supor que influxo dos íons adicionais poderiam ser dirigidos pela ativação rápida da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dos rins que retornariam à atividade basal assim que a atividade nas brânquias fosse estimulada durante o período regulatório.

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo pode-se concluir que:

A exposição a salinidades iguais ou superiores a 58ppm causam mortes em *Bathygobius soporator*.

*Bathygobius soporator* são resistentes a meios com baixa salinidade vivendo em água 0ppm.

A diminuição da salinidade da água para 6ppm, no teste de 96h, e 0ppm, no teste de 12h, leva a hiperplasia dos tecidos branquiais.

Com a diminuição da salinidade observamos aneurisma nas salinidades 6ppm, no teste de 12h e 96h, e em 0ppm, no teste de 12h.

Há descolamento em todas as salinidades nos testes de 12h e 96h.

Ocorre hemorragia em *Bathygobius soporator* expostos a salinidade 6ppm durante 12h.

Brânquias de *Bathygobius soporator* conservam higidez em salinidade igual a 17ppm.

Alterações na salinidade da água levam a alterações significativas nas estruturas do epitélio branquial e menor grau de higidez em 6ppm e 0ppm.

A atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial para *Bathygobius soporator* é maior em salinidade 34ppm, se comparada a salinidade 6ppm e 0ppm, e é maior em salinidade 17ppm se comparada a salinidade 6ppm no teste de 12h.

A atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial para *Bathygobius soporator* é maior em salinidade 34ppm, se comparada a salinidade 0ppm e 6ppm, e é maior em salinidade 17ppm se comparada a salinidade 0ppm no teste de 96h.

## REFERÊNCIAS

- ANGULO, R. J. & ARAÚJO A. D. Classificação das costa paranaense com base na sua dinâmica, como subsídio à ocupação da orla litorânea. **Boletim Paranaense Geociências**, Curitiba, v.44, p.07-17, 1996.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.** 22, 25-34.
- BIGARELLA, J. J. Contribuição ao estudo da planície costeira do Estado do Paraná. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.1, p. 75-111, 1946.
- BIGARELLA, J. J.; R. D. BECKER; D. J. de MATOS; A. WERNER. A Serra do Mar e a porção oriental do Estado do Paraná. Um problema de segurança ambiental e nacional (contribuição à geografia, geologia e ecologia regional). Curitiba, Governo do Estado do Paraná, Secretaria de Estado do Planejamento – Associação de Defesa e Educação Ambiental (ADEA). 248 p., 1978.
- BOUTET, I; C.L. LONG KY, C.L. & BONHOMME, F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. **Gene**, v.379 , p.40-50, 2006.
- BYSTRIANSKY, J.S.; RICHARDS, J.G.; SCHULTE P.M. & BALLANTYNE J.S. Reciprocal expression of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms  $\alpha$ 1a and  $\alpha$ 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. **Journal of Experimental Biology**, n. 209, p.1848-1858, 2006.
- CARMONA, R.; GARCÍA GALLEGO, M; SANS, A.; DOMEZAIN, A. & OSTOS-GARRIDO, M.V. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. **Journal of Fish Biology**. 64, p 553-556, 2004.
- CARVALHO FILHO, A. **Peixes da costa brasileira**. São Paulo: Melru, 320p., 1999.
- CLARK, G. **Staining producer**. Baltimore the Willians Wilkins Co., 512p., 1981.
- CLAUREP GLAUERT, A.M. **Practical methods in electronic microscopy**: fixation, dehydration and embedding biological specimens. Stramgen Waxes Richard Research Laboratory, Cambridge North Roland Publishing Co. Amsterdam Oxford 1975.
- CONTE, F.P. Salt Secretion. In **Fish Physiology**. London: Acad. Press, Vol 1 (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.) p.241-292, 1969.

DAY JR, J.W.; HALL, C.A.S.; KEMP, W.M. & YÁÑEZ-ARANCIBIA, A. **Estuarine Ecology**. New York, John Wiley & Sons, 558p., 1989.

EPSTEIN, F.H.; SILVA, P. & KORMANIK, G. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. *American Journal of Physiology*, v 238, p. R246-R250, 1980.

EVANS, D.H.; PIERMARINE, P.M. & CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85: 97-177, 2005.

FANTA, E. Influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 38(4), p.1237-1251, 1995.

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

FERGUNSON, H.W. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleostes**. 3. ed. Iowa: University Press. 263p. 1995.

FERNANDES, M.N.; PERNA, S.A. & MORON, S.E. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. *Journal of Fish Biology*, v. 52, p. 844-849, 1998.

GIARI, L.; MANERA, M.; SIMONI, E. & DEZFULI B.S. Changes to chloride and rodlet cells in gills, kidney and intestine of *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to reduced salinities *Journal of Fish Biology*, v.69, Issue 2, p. 590, 2006.

GIBBS, A. & SOMERO G.N. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase in gills of marine Teleosts, *J. exp. Biol.* v.143, p.475-492, 1989.

GOSWAMI, S.V.; PARWEZ I. & SUNDARARA J. Some aspects of osmoregulation in a stenohaline freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), in different salinities. *J. Fish Biol.* v.23, p.475-487, 1983.

JOBLING, M. **Environmental Biology of Fishes**. London: Chapman & Hall, 1995.

KIDDER, G.W.; PETERSEN, C.W. & PRESTON, R.L. Energetics of osmoregulation: II. water flux and osmoregulatory work in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus* *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. v. 305A, Issue 4, p. 318 – 327, 2006.

- LAURENT, P. & DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R147-R159, 1980.
- LAURENT, P.; CHEVALIE, C. & WOOD, C.M. Appearance of cuboidal cells in relation to salinity in gills of *Fundulus heteroclitus*, a species exhibiting branchial  $\text{Na}^+$  but not  $\text{Cl}^-$  uptake in freshwater. **Cell and Tissue Research**. v. 325, n.3, 2006.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. New York: p. 223-225, 1987.
- MAAK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Rio de Janeiro: J. Olimpio Ed. Secr. Cultura e do Esporte do Estado do Paraná, 450p., 1981.
- MALLAT, J. Gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, p. 630-648, 1985.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M. *et al.* Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A 141, p. 183-190, 2005.
- MAUGÉ, L.A. Gobiidae. 1986. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>, acesso em 07 set. 2004.
- MAZEAUD, M.M. & MAZEAUD, F. Adrenergic Responses. In PICKERING, A. D. *Stress and Fish*. London: Acad. Press, 367p., 1981.
- MCCORMICK, S.D. Hormonal control of gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase and chloride cell function. In *Fish Physiology: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, v.14 (Wood, C. M. & Shuttleworth, T. J., eds), p.285-315. San Diego, Acad. Press. 1995.
- MENDES, Liana de F.. Natural history focus blennies and gobis behaviour (Actinopterygii, Blennioidei, Gobioidae) from Fernando de Noronha Archipelago. **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 23, n. 3, 2006.
- MENESES, N.A. & J.L. FIGUEIREDO. **Manual de Peixes marinhos do sudoeste do Brasil**. Teleostei. São Paulo, Museu de Zoologia, 1976.
- MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G. & IWAMA, G. K. Physiological and respiratory responses of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 117, n.3, p. 391-362, 1996.
- MORON, S. E. & FERNÁNDEZ, M.N. Pavement cell ultrastructural differences on *Hoplias mallabaricus* gill epithelia. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 357-362, 1996.



- MULLIN, S.J. Estuarine fish population among red mangrove prop roots of small overwash island. **Wetlands**, Lawrence, 15(4), p. 324-329, 1995.
- NIKOLSKY, G. V. **The ecology of Fishes**. New York: Acad. Press, 352p., 1963.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Ed., 434p., 1988.
- PARVEZ, S.; SAYEED, I. & RAISUDDIN, S. De Decease gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to diluted paper mill effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2005.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishies. **Annual Reviews in Physiology**, v. 59, p. 325-347, 1997.
- PERRY, S.F.; REID, S.G.; WANKIEWICZ, E.; IYER, V. & GILMOUR, K.M. Physiological rewsponses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. **Physiological Zoology**, v. 69, n. 6, p. 1419-1441, 1996.
- PHILPOTT, C.W. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. r171-r184, 1980.
- POLAKOF, S.; ARJONA, F.J.; ALVARELLOS, S.S.; MARTÍN DEL RÍO, M.P., MANCERA, J.M. & SOENGAS, J.L.. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus* **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v.176,n.5, 2006
- POUGH, F. H.; JANIS C.M. & HEISER J.B. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Ed., 699p., 2003.
- PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A. . 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**, v. 142, n. 3-4, p. 347-355, 2006.
- RANDALL, D.; W. BURGGREN & K. FRENCH. **Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. p.531-581. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000.
- RANKIN, J.C. & JENSEN F.B. **Fish ecophysiology**. London: Chapman & hall, 1993.
- RENZIS, G. D. e M. BORNACIM. Ion transport and gill ATPases. **Fish Physiol.**, XB: 65-104, 1984.

- REYNOLDS, E. S., 1963 The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biology**, New York, 17, 208–212.
- RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza**. 3 ed. Guanabarakoogan, 1996.
- ROBERTSON, A.I. & BLABER, S.J.M. Plankton, epibenthos and fish communities, p. 63-100. *In* ROBERTSON, A.I. & ALONGI, D.M. (Eds). **Tropical mangrove Ecosystems (Costal and Estuarines Studies 41)**. Washington, DC, American Geophysical Union, 236p., 1992.
- ROBERTS, R. J. **Fish Pathology**. 2. ed. London: Baillière :Tindall, 1989, 467p.
- ROMÃO, S.; FREIRE, C.A. & FANTA, E. 2001. Ionic regulation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. **J. Fish Biol.** v.59, p.463-468, 2001.
- RONNBACK, P; TROELL, M.; KAUTSKY, N. & PRIMAVERA, J.H. Distribution pattern of shrimps and fish among *Avicennia* and *Rhizophora* macrohabitats in the Pagbilao mangroves, Philippines. **Estuarine and Costal Marine Science**, London, 48, p. 223-234, 1999.
- SARDET, C. PISAN, M. & MAETZ, J. The surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. **Journal of Cell Biology**, v. 80, p. 96 –117, 1979.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: Adaptação e meio Ambiente**. São Paulo: Livraria Santos Ed., p.299-352, 1996.
- SHIVKAMAT, P. & ROY, R. Regulation of membrane lipid bilayer structure during salinity adaptation: A study with the gill epithelial cell membranes of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 142, p. 28-36, 2005.
- SILVA, P; SOLOMON R.; SPOKES K. & EPSTEIN F.H. Ouabain inhibition of gill Na-K ATP-ase: Relationship to active chloride transport. **J. Exp. Zool.**, v.199, p.419-426, 1977.
- SILVEIRA, J. Morfologia do litoral. *In*: AZEVEDO, A. (ed.) **Brasil: a terra e o homem**. Companhia Editora Nacional. São Paulo, p. 253-305, 1964.
- SPACH, H.L.; SANTOS C. & GODEFROID R.S. Padrões temporais na assembléia de peixes na gamboa do Sucuriú, Baía de Paranaguá, Brasil. Curitiba: **Rev. Bras. Zool.**, v.20, n.4, 2003.
- SUGUIO, K. & TESSLER. Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: origem e nomenclatura. *In*: Lacerda, L. D.; D. S. Araújo; R. Cerqueira & B. Turcq (eds). **Restingas brasileiras: Origem, Estrutura e Processos**. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1984.

VAM DER HEIJDEN, A.J.H.; VERBOST, P.M.; EYGENSTEYN, J.; BONGA, S.E.W. & FLIK, G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or sea water: quantification by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 55-64, 1997.

VARSAMOS, S.; NEBEL, C. & CHARMANTIER. Ontogeny of osmoregulation in postbryonic fish: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology, part A** 141, p. 401-429, 2005.

WATSON, M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophysical, Biochemi. Cytology*, 4, 4, 475-478.

WEBSTER, S.J. & DILL, L.M. The energetic equivalence of changing salinity and temperature to juvenile salmon **Functional Ecology**, 20:4 621, 2006.

ZADUNAISKY, J.A. Chloride cells and osmoregulation. **Kidney International**, v. 49, p. 1563-1567, 1996.

