

ALESSANDRA FATIMA DE LARA

**CURSO TEMPORAL DA REGULAÇÃO OSMO-IÔNICA NO CAMARÃO DE ÁGUA
DOCE EURIHALINO *Macrobrachium acanthurus* (PALAEMONIDAE) QUANDO
SUBMETIDO A MEIO HIPER-OSMÓTICO**

**Monografia apresentada à disciplina de
Eságio em Fisiologia como requisito
parcial à conclusão do Curso de
Graduação em Ciências Bilógicas,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Arruda de
O. Freire**

**CURITIBA
2003**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Carolina Arruda de Oliveira Freire, pela orientação e acompanhamento durante todas as etapas da execução do trabalho.

Ao Prof. Silvio Marques Zanata, pelo empréstimo de reagentes.

Ao Nelio pelo inestimável companheirismo, apoio e incentivo em todas as horas.

Aos meus pais, Humberto e Maria Julia, que sempre me apoiaram e possibilitaram que eu atingisse meus objetivos.

Aos meus irmãos, André e Alysson, pelo apoio e amizade.

À amiga Viviane pelo apoio e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Comparativa, em especial Valéria, Ivonete e Denilton, pelos momentos agradáveis de convivência.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	5
2 MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 COLETA DOS CAMARÕES E ACLIMATAÇÃO	6
2.2 EXPERIMENTOS NO LABORATÓRIO	7
2.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE HEMOLINFA, DETERMINAÇÃO DA OSMOLALIDADE E DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÍONS CLORETO, MAGNÉSIO E CÁLCIO	8
2.4 CONTEÚDO DE ÁGUA NO TECIDO MUSCULAR	8
2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)	9
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	10
3 RESULTADOS	11
3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E PORCENTAGEM DE ÁGUA NO MÚSCULO DO CAMARÃO <i>Macrobrachium acanthurus</i>	11
3.2 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO, MAGNÉSIO E CÁLCIO NA HEMOLINFA de <i>Macrobrachium acanthurus</i>	12
3.3 PADRÃO ELETROFORÉTICO MUSCULAR DE <i>Macrobrachium acanthurus</i> (SDS-PAGE)	12
4 DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÕES	22
6 REFERÊNCIAS	23

RESUMO

Apesar de inúmeros estudos abordando a osmorregulação em palaemonídeos, nenhum estudo varreu tantos tempos, buscando detectar o padrão temporal da osmorregulação. O camarão de água doce eurihalino *Macrobrachium acanthurus* foi avaliado quanto ao efeito da salinidade 20 sobre a osmolalidade e a concentração de cloreto, magnésio e cálcio da sua hemolinfa desde os primeiros minutos de exposição até dias: 10, 20, 30 e 45 minutos e 1, 2, 3, 6, 9, 15, 24, 48 e 120 horas. Nestes tempos, foram dosados a osmolalidade e os íons cloreto, magnésio e cálcio na hemolinfa, o conteúdo de água no músculo. Amostras de musculatura abdominal expostas à salinidade 20 por 2 h e 15 h e em situação controle foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) com protocolo padrão. Observou-se que há uma perda do controle da osmolalidade a partir de 9 h de exposição que se estende até 48 h; contudo, mesmo após a perda dessa capacidade regulatória, a porcentagem de água muscular manteve-se controlada em todos os tempos avaliados. A concentração de cloreto na hemolinfa apresentou alterações semelhantes a da osmolalidade, como esperado, com o mesmo padrão temporal; confirmando que as alterações da osmolalidade se devem primeiramente a variações no NaCl. A concentração de magnésio e cálcio foi bem regulada na hemolinfa desde os primeiros minutos até dias de estresse hiper-salino, embora o íon Mg^{2+} tenha mostrado ligeira tendência a acompanhar o padrão da osmolalidade e da concentração de cloreto. Com relação ao perfil proteico de homogenizados da musculatura abdominal, que tinha como objetivo a possível detecção de banda aumentada na região de 70 e 90 kDa, que seria compatível com a expressão aumentada de proteínas de estresse, através de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), não foi observada alteração nas bandas correspondentes a 70 e 90 kDa. Portanto, seria necessária a utilização de técnica imunológica (Western Blot) para revelar a alteração na expressão de proteínas de estresse.

ABSTRACT

Despite the large number of studies on palemonid osmoregulation, no study has focused on so many time points, trying to portray a detailed time course of shrimp osmoregulation. The euryhaline freshwater shrimp *Macrobrachium acanthurus* was evaluated about the effect of salinity 20 on the osmolality and concentrations of chloride, magnesium and calcium in the hemolymph, since the first 10 minutes of exposure until 5 days: 10, 20, 30 and 45 min; 1, 2, 3, 6, 9, 15, 24, 48 and 120 hours. Concentrations of hemolymph chloride (Cl⁻), magnesium (Mg²⁺) and calcium (Ca²⁺) were determined using colorimetric assays, as was also the determination of total protein content in abdominal muscle homogenates. Muscle homogenates were prepared from shrimps exposed to salinity 20 for 2 h and 15 h. The samples were then submitted to SDS-PAGE using standard protocols. There is a distinct loss of control of hemolymph osmolality from 9 h to 48 h. However, even during this rise in hemolymph osmolality, muscle water remains stable. Chloride in the hemolymph behaved similarly to osmolality, as would be expected, since blood osmolality is primarily due to NaCl. Hemolymph magnesium and calcium were always well regulated, although magnesium has displayed a slight tendency to follow osmolality and chloride. The examination of the protein profile of the muscle homogenates had the goal of possibly detecting increased band (s) of 70 and 90 kDa, which would be compatible with increased expression of the stress protein (HSP 70, HSP 90). However, no evident alteration in the electrophoretive profile was detected. An immunological technique (Western Blot) would be necessary in order to adequately address this issue.

1 INTRODUÇÃO

A superfície terrestre é recoberta por cerca de 71% de água, sendo a maior parte oceano. A concentração média de sais dissolvidos nos oceanos - a salinidade - é de aproximadamente 3,5% (g/100 ml) ou salinidade de 35 (Schmidt-Nielsen, 1996). Os principais íons contidos na água marinha são o sódio (Na^+) e o cloreto (Cl^-), acompanhados de magnésio (Mg^{2+}), enxofre (S) e cálcio (Ca^{2+}); os valores relativos destes íons permanecem praticamente constantes. O total de água doce em rios e lagos ocupa menos de 1% da área e 0,01% do volume da água do mar; o conteúdo total de sais na água doce pode variar de 0 a 0,5 e os valores relativos dos diferentes íons constituintes podem apresentar grande variação. A água salobra ocorre em regiões litorâneas, onde as águas dos rios se encontram com as águas oceânicas, formando ambientes chamados estuários. Estes ambientes correspondem a menos de 1% da superfície terrestre e sua salinidade varia entre 0,5 e 30. Seu corpo d'água contém substâncias dissolvidas como sais, gases e compostos inorgânicos, substâncias que constituem fatores de grande importância fisiológica (Schmidt-Nielsen, 1996).

O ambiente aquático impõe desafios à manutenção de nível adequado de água e de solutos intra e extracelulares, principalmente ao se tratar de regiões nas quais a salinidade é variável, como os estuários. A osmorregulação é responsável pela manutenção da homeostase de água e solutos nos fluidos corporais, envolvendo o transporte de sais e o movimento de água entre o meio externo e o líquido extracelular (meio interno) através das camadas epiteliais para compensar a perda e/ou ganho desses por difusão passiva (Schmidt-Nielsen, 1996).

Os crustáceos possuem diversas adaptações relacionadas à manutenção de concentrações diferenciadas entre o meio extracelular (fluido corporal) e o meio aquático (Péqueux, 1995). Estas adaptações permitem definir os animais como osmoconformadores ou osmorreguladores. Os primeiros não regulam eficientemente a concentração dos fluidos corporais, mantendo pequenos gradientes em relação ao meio externo. Em contraste, os últimos mantêm sua concentração interna relativamente estável e diferente do meio externo (Randall et al., 1997). Os animais osmorreguladores podem se manter hipo- ou hiper-osmóticos em relação à água,

dependendo do meio em que se encontram: podem ser hiper-osmóticos em baixas salinidades e hipo-osmóticos em altas salinidades (Péqueux, 1995).

Sejam iso- (concentração igual), hiper- ou hipo-osmóticos, osmoconformadores ou osmorreguladores, os animais aquáticos podem ainda ser classificados quanto a sua tolerância em relação à variação de salinidade do meio. Aqueles com capacidade de tolerar grandes variações de concentração salina no ambiente onde vivem ou em laboratório são chamados de eurihalinos, e os que possuem tolerância limitada a variação de salinidade são chamados de estenohalinos. Estas classificações têm mais sentido quando usada de forma comparativa; todas estas classificações dependem da salinidade do ambiente e do tempo de exposição a esta salinidade.

A espécie de interesse neste estudo, *Macrobrachium acanthurus*, pertence à família Palaemonidae. Esta família possui representantes em variedade de ambientes aquáticos de regiões tropicais e temperadas: a maioria é encontrada em água doce, alguns na água do mar e uma minoria em água salobra (Kirkpatrick e Jones, 1985). A espécie *M. acanthurus* encontra-se em água doce próxima a estuários, mas é dependente da água salgada para reprodução e desenvolvimento, assim como outras espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (Moreira et al., 1983; Huong et al., 2001). A importância crescente da carcinocultura no Brasil tem estimulado o estudo de camarões de água doce em todos os estados do país. Nos estados do sul o desenvolvimento da carcinocultura vem exigindo informações mais precisas sobre as espécies que ocorrem em diversos ambientes aquáticos continentais, e o *M. acanthurus* é muito cotado para cultivos com fins comerciais (Bond e Buckup, 1989).

A resposta dos animais ao estresse salino induz à expressão de proteínas de estresse, assim como outros tipos de estresses como o térmico. Esse é um mecanismo molecular, altamente conservado, utilizado pelos organismos para compensar as perturbações da função celular induzidas pelas variações do meio (Feder et al., 1995; Yenari et al., 1999). Calor e vários outros tipos de estresses induzem a expressão de um conjunto de proteínas que mantêm a integridade e viabilidade celular (Yenari et al., 1999). A maioria das proteínas de estresse pertence às famílias de proteínas grandes de até 100 kDa (Hsp100, Hsp90, Hsp70 e Hsp60), as quais são altamente conservadas entre as espécies (Becker e Craig, 1994;

Lindquist e Craig, 1988; Feder et al., 1995; Patruno et al., 2001; Yenari, et al., 1999). Contudo, no copépodo *Eurytemora affinis* foi observado aumento na síntese de proteínas de 24 a 30 kDa, como provável resposta ao estresse salino e a alterações na temperatura (Gonzalez e Bradley, 1994).

O estudo do papel das proteínas de estresse na fisiologia do estresse tem mostrado que todas as espécies têm os genes que codificam para as proteínas de estresse. Contudo, o padrão de expressão desses genes varia com o nível de estresse do ambiente (ambiente-dependente). Provavelmente, espécies que apresentam maiores níveis de expressão das proteínas de estresse estão submetidas, naturalmente, a condições ambientais mais variáveis, o que pode torná-las mais resistentes ao estresse (Feder e Hofmann, 1999).

Estudos relativos à expressão de proteínas de estresse em crustáceos ainda são poucos. Na lagosta *Homarus americanus* (Crustacea, Decapoda) observou-se que o estresse hipo- e hiper-osmótico induz o aumento na expressão de Hsp70 a Hsp90 no músculo abdominal (Spees et al., 2002). O mesmo foi observado em larvas de *H. americanus* expostas ao pesticida heptacloro-ciclodieno, nas quais a quantidade de Hsp70 aumentou (Snyder e Mulder, 2001). Em camarões de água doce foi observado que após lesão traumática ocorre síntese e acúmulo de proteínas na área da injúria: nas primeiras horas após o trauma, há síntese de proteínas de 35, 70, 90 e 150 kDa; e um dia depois, proteínas de 70–90 kDa aumentam drasticamente, especialmente no tecido lesado (Xue e Grossfeld, 1993). O acúmulo de osmólitos orgânicos afetou a expressão de Hsp70 em culturas de células MDCK. O aumento da expressão de Hsp, que se inicia em torno de 1 hora após trauma, em resposta a hiper-tonicidade impede a desnaturação de proteínas quando alguns osmólitos orgânicos são acumulados (Sheikh-Hamad e Garcia-Perez, 1994).

Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação – Universidade Federal do Paraná, observou-se que o palaemonídeo *M. acanthurus* tinha a transparência e a opacidade de sua musculatura abdominal modificada após horas de exposição ao estresse salino. O abdômen tornou-se nitidamente esbranquiçado, efeito esse reversível em alguns dias. Diante disso, formulou-se a hipótese de que esse efeito de alteração na opacidade muscular era decorrente da expressão de proteína de estresse no músculo abdominal. Para buscar a resposta a essa hipótese camarões *M.*

acanthurus foram submetidos à água salobra (salinidade 20) para análise do curso temporal da osmorregulação, desde os primeiros minutos até dias de exposição, acompanhando-se a transparência do músculo abdominal. Além disso, foi verificado o perfil eletroforético do extrato proteico muscular da região abdominal, em tempos selecionados quando a opacidade muscular parecia máxima, para verificar a expressão de proteínas com peso molecular compatível com proteínas de estresse.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o curso temporal do efeito do estresse hiper-salino sobre a regulação osmo-iônica da hemolinfa e o perfil proteico do homogenato de músculo abdominal no camarão de água doce eurihalino *Macrobrachium acanthurus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito do aumento de salinidade sobre a osmolalidade da hemolinfa e o conteúdo de água no tecido muscular de *M. acanthurus*, como indicativo complementar da regulação osmo-iônica dos animais e do estresse imposto às suas células;
- II. Avaliar a regulação dos íons cloreto, magnésio e cálcio na hemolinfa de *M. acanthurus*, quando submetido a condições de estresse hiper-salino;
- III. Avaliar o efeito do aumento da salinidade sobre o perfil proteico do homogenato de músculo abdominal de *M. acanthurus*, utilizando a técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A escolha da espécie *Macrobrachium acanthurus* (Figura 1) para a realização deste estudo se deveu a sua fácil obtenção, por seu porte (foram utilizados animais com comprimento de 5 – 10 cm, aproximadamente), por sua capacidade de suportar as condições estressantes de transporte e sua fácil manutenção em laboratório.



Figura 1 – Exemplar de *Macrobrachium acanthurus*, de aproximadamente 10 cm de comprimento total.

2.1 COLETA DOS CAMARÕES E ACLIMATAÇÃO

Os camarões foram obtidos junto a pescadores, no município de Pontal do Paraná, estado do Paraná, Brasil. Após a coleta, os animais foram colocados em galões plásticos, com aeração constante, e transportados até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR. No laboratório foram mantidos em aquários com temperatura de aproximadamente 20 °C, aeração constante, com água filtrada e sem cloro, com

salinidade igual a do local de origem, $< 0,5$. Os animais foram alimentados em dias alternados, com carne bovina moída.

2.2 EXPERIMENTOS NO LABORATÓRIO

Após aproximadamente 7 dias de aclimação às condições laboratoriais, os espécimes de *M. acanthurus* foram expostos à salinidade 20 (choque hiperosmótico), por 10, 20, 30 e 45 minutos (min) e 1, 2, 3, 6, 9, 15, 24, 48 e 120 horas (h), em aquários de 3 L, aeração constante e temperatura de aproximadamente 20 °C. Em cada aquário e para cada tempo de exposição foram colocados 1 ou 2 camarões, repetindo-se esse procedimento por 3 a 5 vezes, constituindo grupos com 5 a 10 animais para cada tempo (Figura 2). A diluição da água do mar foi feita com água doce filtrada e sem cloro e a salinidade medida através de salinômetro refratômetro S-28 (Shibuya, Japão). Os camarões controle foram mantidos em aquário estoque, com salinidade $< 0,5$ por cerca de 10 dias, contados a partir da data de coleta.



Figura 2 – Disposição dos aquários de 3 L utilizados nos experimentos, no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

2.3 OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE HEMOLINFA, DETERMINAÇÃO DA OSMOLALIDADE E DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÍONS CLORETO, MAGNÉSIO E CÁLCIO

Passado o tempo de exposição, os camarões foram anestesiados em gelo e a corda nervosa ventral foi seccionada entre o cefalotórax e o abdômen. Amostras de hemolinfa foram retiradas por punção cardíaca através de micropipeta regulável (P 10 - 100 μ L) e congeladas (- 20 °C) até o momento das dosagens.

A osmolalidade da hemolinfa foi determinada através de micro-osmômetro de Pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, EUA) das amostras não diluídas. Para a determinação da concentração dos íons cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) na hemolinfa foi utilizado o método colorimétrico através de kits Labtest específicos para cada íon, utilizando-se instruções do fabricante, em amostras em duplicata, diluídas com água deionizada, com posterior leitura em espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 Pro (Pharmacia biotech, Suécia).

2.4 CONTEÚDO DE ÁGUA NO TECIDO MUSCULAR

Com o uso de tesouras e pinças adequadas, foram retiradas amostras de músculo da região abdominal de *M. acanthurus* em situação controle (salinidade < 0,5) e experimentais (salinidade 20). Essas foram pesadas e em seguida submetidas a 60 °C por no mínimo 24 horas, em estufa, na presença de sílica gel para evitar re-hidratação durante o esfriamento. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente. O conteúdo de água foi expresso em porcentagem de peso úmido:

$CA(\%) = [(PU - PS) / PU] \cdot 100$, sendo PU = peso úmido e PS = peso seco.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Para avaliar o efeito do aumento de salinidade sobre o perfil proteico do homogenato de músculo abdominal, foram coletadas amostras dessa musculatura, seguindo o mesmo procedimento descrito acima, em situação controle (salinidade < 0,5) e em estresse hiper-osmótico (salinidade 20, por 2 e 15 h), com 5 animais para cada tempo, com 1 ou 2 animais por aquário, experimentos realizados em triplicata. Foram escolhidos os tempos de 2 h e 15 h para execução desses experimentos em virtude das análises preliminares da osmolalidade e concentração de cloreto na hemolinfa, que eram aparentemente diferentes.

As amostras de músculo abdominal dos exemplares de *M. acanthurus* foram retiradas e colocadas imediatamente em tampão de lise TRITON 1% em PBS. Em seguida, foram adicionados os inibidores de protease fluoreto de metil fenil sulfonil (PMSF) 5 mM, benzamidina 20 mM, EDTA 10 mM, pepstatina A 10 mM e iodoacetamida 10 mM. As amostras foram, então, agitadas para promover a lise das células; o material foi homogenizado em homogenizador teflon/vidro do tipo Potter Elvehjem manualmente em gelo, e em seguida centrifugado a 16.000 rpm por 10 minutos (ou até que o sobrenadante estivesse evidente). O sobrenadante foi retirado e congelado a -20 °C até a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Para determinação da concentração de proteínas totais nas amostras musculares utilizou-se método colorimétrico com kit Labtest, com posterior leitura em espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 Pro (Pharmacia biotech, Suécia). O princípio do método é a reação das proteínas da amostra com o biureto.

Uma alíquota do sobrenadante (contendo 100 µg de proteínas totais) foi diluída em tampão de amostra (Sample Buffer Laemmli, Sigma, EUA) contendo: 4% SDS; 20% glicerol; 10% 2-mercaptoetanol; 0,004% azul de bromofenol; e 0,125 M Tris, pH 6,8. As amostras foram fervidas por 3 - 4 minutos, centrifugadas por 1 minuto e aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida. As amostras migraram sobre gel de empilhamento (acrilamida 3%) em tampão Tris contendo SDS (pH 6,8

ajustado com solução concentrada de Glicina). Em seguida ao gel de empilhamento, as amostras migraram para o gel de separação (acrilamida 7,5%) também em tampão Tris contendo SDS (pH 8,8 ajustado com solução concentrada de Glicina). A corrida processou-se com a utilização de tampão de corrida de Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS. Em um dos poços foi colocado o marcador de peso molecular (Wide Range MW Marker, Sigma, EUA), contendo proteínas com peso molecular de 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 e 6,5 kDa. A corrida durou aproximadamente 4 horas com corrente constante de 15 mAmp, gerada pela fonte da Amersham Pharmacia Biotech EPS 300. Após este período, o gel foi transferido para um recipiente com corante azul de Coomassie por 20 min e depois para solução de descorar para retirar o excesso de corante, contendo metanol 30% e ácido acético 7,5% por aproximadamente 20 minutos, ou até que o “background” estivesse bem claro e as bandas bem definidas. Após esse processo, o gel foi colocado em placa de vidro com papel celofane e algumas gotas de glicerina para secar lentamente. Por fim, o gel foi digitalizado para melhor análise e preservação dos resultados.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi através de análises de variância de 1 fator para determinar o efeito do tempo sobre a variável. Em seguida os grupos significativamente diferentes foram localizados com Teste Tukey. Além disso, foi feita comparação direta do controle em água doce com cada grupo experimental em salinidade 20, através do teste-t Student, sempre com limite de significância em 0,05, usando o Programa SigmaStat, versão 2.03.

3 RESULTADOS

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E PORCENTAGEM DE ÁGUA NO MÚSCULO DO CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus*

A osmolalidade da hemolinfa do camarão eurihalino *Macrobrachium acanthurus* quando exposto a estresse hiper-salino permaneceu, entre 400 e 650 mOsm/kgH₂O (amplitude de médias). Nos camarões mantidos em meio mais concentrado (salinidade 20), observou-se pico da osmolalidade em 2 h (516,8 mOsm/kgH₂O±21,0) em relação aos mantidos em água doce (443,5±14,1), nos demais curtos períodos de exposição, permaneceu próximo aos controles. Contudo, a partir de 9 h há aumento significativo, voltando a baixar apenas a partir em 120 h de exposição: 9 h (540,3±19,7), 15 h (626,3±10,7), 24 h (632,7±6,8), 48 h (651,5±40,1) e 120 h (538,8±16) (Figura 3a). O Teste ANOVA para 1 variável revelou efeito do fator tempo. Os animais expostos por 48 h à salinidade 20 apresentaram o valor da osmolalidade significativamente maior do que os animais em situação controle e do que os expostos por 10, 20, 30 e 45 min, 1 e 6 h, a salinidade 20. Estas amostras e as expostas por 3 h a salinidade 20 também apresentaram valores menores de osmolalidade do que as amostras de camarões expostos por 15 h a estresse hiper-salino. E os animais expostos por 24 h apresentaram a osmolalidade da hemolinfa maior que os expostos por 20 e 45 min e 3 h. Essas diferenças apontadas pelo teste de Tukey (Teste post hoc do ANOVA) confirmam o pico de osmolalidade de 9 à 48 horas também revelado pelo teste-t de Student na comparação de cada grupo individualmente com o controle em água doce.

A porcentagem de água presente na musculatura abdominal desse palemonídeo variou entre 60 e 80%, sem sofrer efeito do tempo de exposição ao meio hiper-osmótico (Figura 3b).

3.2 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO, MAGNÉSIO E CÁLCIO NA HEMOLINFA de *Macrobrachium acanthurus*

A concentração de cloreto na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* permaneceu entre 130 e 230 mM (amplitude de média), aproximadamente. O valor em situação controle foi 137,1 mM \pm 10,1. Apresentou picos em 10 min (167,2 \pm 7,5), 30 min (174,4 \pm 9,4) e 2 h (177,0 \pm 12,5). A partir de 9 h de exposição ao meio hiper-salino, a concentração desse íon aumentou, tornando a diminuir a partir de 24 h de exposição: 9 h (211,3 \pm 12,1), 15 h (221,6 \pm 16,8), 24 h (215,4 \pm 21,4) e 48 h (199,4 \pm 15,6) (Figura 4a). A concentração de cloreto da hemolinfa dos animais expostos ao estresse salino por 15 h foi maior do que a de camarões em situação controle e maior também do que a dos expostos por 20 min, 1 e 6 h à salinidade 20. Da mesma forma, animais expostos por 9 h tiveram concentração de cloreto maior que os controles e os expostos por 3 h a um meio hiper-salino.

A concentração de magnésio na hemolinfa de *M. acanthurus* permaneceu entre 3 e 6 mM (amplitude de médias) e a concentração de cálcio, entre 7 e 12 mM (amplitude de médias), aproximadamente. A concentração desses dois íons não foi afetada pela exposição à salinidade 20. A concentração de magnésio ainda apresentou tendência a aumentar entre 9 e 15 h, mas o efeito não foi estatisticamente significativo. O cálcio foi regulado mais estreitamente, sem apresentar aumento na salinidade 20 (Figuras 4b e 4c, respectivamente).

3.3 PADRÃO ELETROFORÉTICO MUSCULAR DE *Macrobrachium acanthurus* (SDS-PAGE)

A Figura 5 mostra o padrão eletroforético das proteínas do músculo abdominal de *Macrobrachium acanthurus* quando exposto à salinidade de 20 por 2 e 15 h e nos controles em água doce. O objetivo desse experimento foi verificar se haveria alteração no padrão eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas do músculo desses palemonídeos quando submetidos à situação de estresse salino. Na espécie estudada, não foi observada qualquer alteração evidente no padrão de proteínas musculares representadas. Observa-se, nas amostras controles e experimentais, a

presença de proteínas com peso molecular de 116, 97, 84, 66, 45, 36 e outras abaixo de 24 kDa, sem aparente aumento dessas bandas decorrente da síntese de proteínas nas regiões de 70 e 90 kDa.

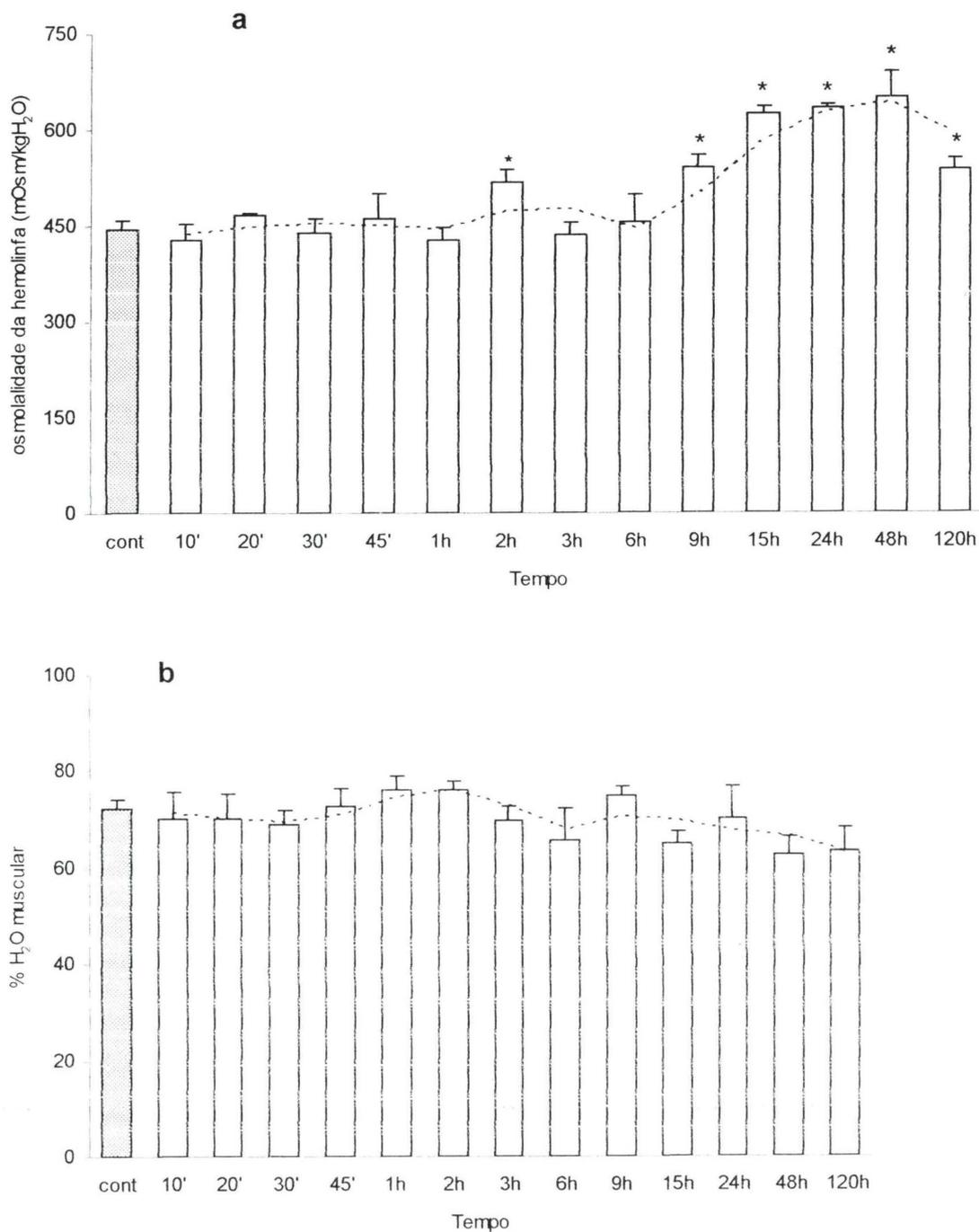


Figura 3 – Osmolalidade na hemolinfa em mOsm/kgH₂O (a) e porcentagem de água muscular (b) de *M. acanthurus* em situação controle em água doce, salinidade < 0,5 (cont) e em salinidade de 20 em minutos (') e horas (h). * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); os valores representam a média \pm EPM de 5 a 10 amostras. A linha tracejada indica a tendência das médias.

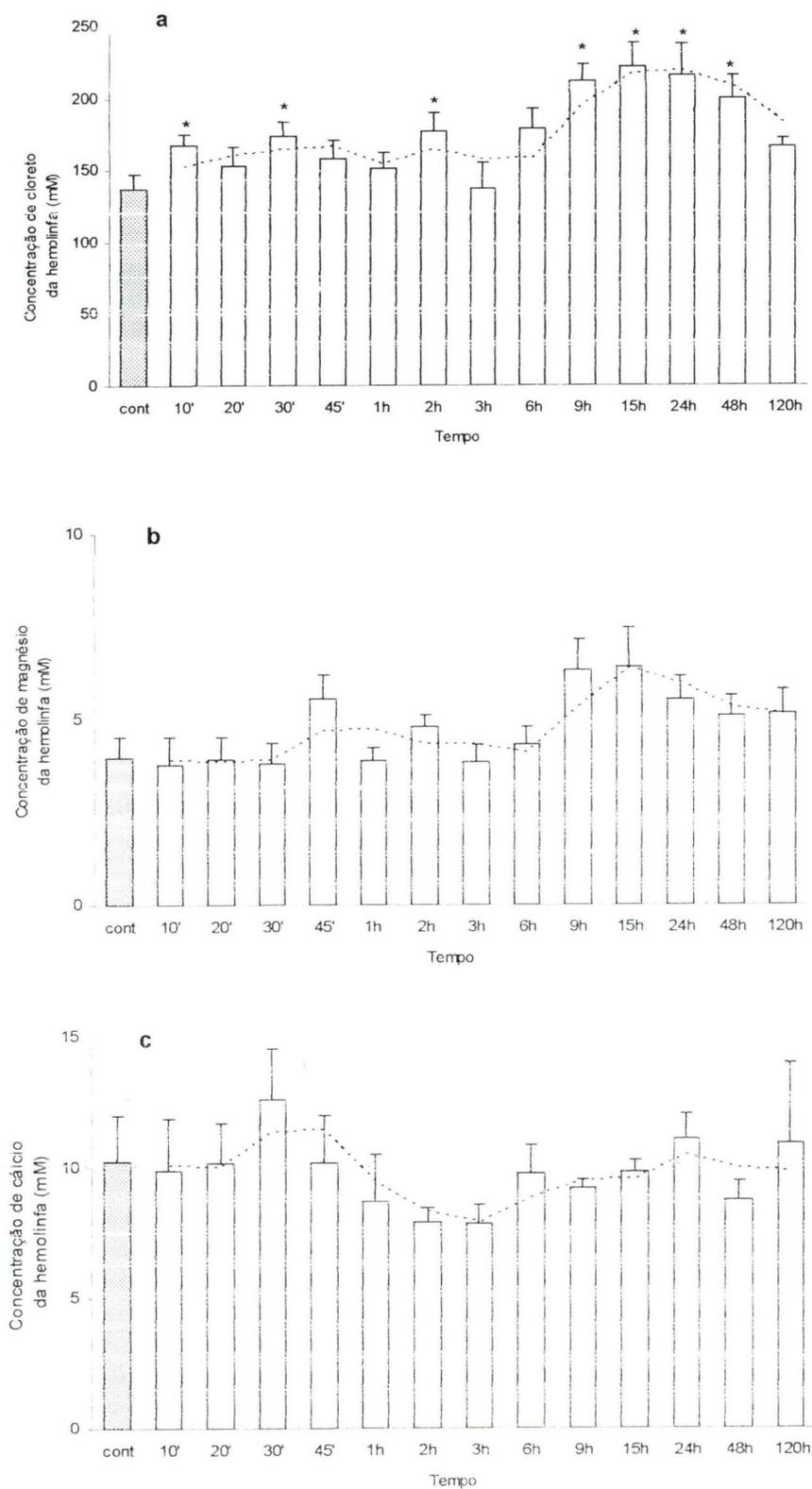


Figura 4 – Concentração de cloreto (a), magnésio (b) e cálcio (c), todos em mM, na hemolinfa de *M. acanthurus* em situação controle em água doce, salinidade < 0,5 (cont) e em salinidade de 20 em minutos (') e horas (h). Os valores representam a média \pm EPM de 5 a 10 amostras. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). A linhatracejada indica a tendência das médias.

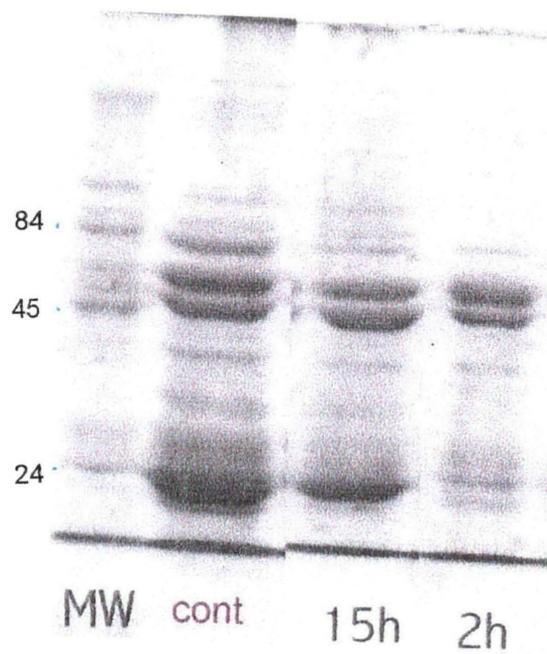


Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) das proteínas da musculatura abdominal de *M. acanthurus*, com 100 μg de proteína total em cada faixa, em situação controle (cont) e experimental em salinidade de 20 por 2 h (2h) e 15 h (15 h). Resultado representativo das replicações.

4 DISCUSSÃO

Existem poucos relatos das alterações iônicas e osmóticas em crustáceos expostos a estresse salino ao longo do tempo. Em especial, relatos de alterações ocorridas com menos de 1 hora de exposição a estresse salino não são comuns. Em *Macrobrachium acanthurus* não foi encontrado qualquer trabalho que descrevesse alterações antes de 1 h de estresse salino. No presente estudo, o objetivo foi o de verificar as alterações apresentadas por *M. acanthurus* na salinidade de 20 ao longo do tempo, a partir de poucos minutos de exposição até dias (10 minutos a 120 horas).

A osmolalidade da hemolinfa de *M. acanthurus* encontrada neste estudo para os camarões em situação controle (salinidade < 0,5) foi de 443 mOsm/kgH₂O. Este valor é semelhante ao encontrado em outros estudos para *M. acanthurus* em situação controle: 440 mOsm/kgH₂O (Moreira et al., 1983) e 420 mOsm/kgH₂O (Brailovsky e Galera, 1997).

Após 24 h em salinidade 22,4, *M. acanthurus* apresentou a osmolalidade da hemolinfa em 640 mOsm/kgH₂O, sendo este seu ponto isosmótico (Moreira et al., 1983). Esse valor é próximo ao encontrado no presente estudo após 24 h em salinidade 20: 633 mOsm/kgH₂O. Embora neste valor de osmolalidade da hemolinfa *M. acanthurus* esteja ligeiramente hiper-osmótico. Nas espécies pertencentes ao gênero *Macrobrachium*, foi descrita uma grande capacidade de hiper e hipo-regular a osmolalidade da hemolinfa em água doce ou baixas salinidades, e hiper-regular diante a exposição a diferentes salinidades (Moreira et al., 1983; McNamara, 1987; McNamara et al., 1990; Funge-Smith et al., 1995; Brailovsky e Galera, 1997; Lima et al., 1997; Wilder et al., 1998; Houg et al., 2001; Freire et al., 2003). Como já era esperado, observou-se nessas espécies dulcícolas expostas a meio salino, como *M. acanthurus*, *M. olfersii* e *M. rosenbergii*, aumento da osmolalidade da hemolinfa até atingiram o ponto isosmótico; e depois disso, passaram a hipo-regular a concentração osmótica na hemolinfa, como *M. potiuna* e *M. rosenbergii* (Wilder et al., 1998; Houg et al., 2001; Freire et al., 2003); outras espécies, apresentam menor capacidade hipo-regulatória, hipo-conformando, como observado em *M. tenellum* e *M. olfersii* (Brailovsky e Galera, 1997; Freire et al., 2003).

O presente estudo demonstra que *M. acanthurus* possui eficiente capacidade osmorregulatória, regulando sua osmolalidade na hemolinfa nas primeiras horas de exposição a uma salinidade superior a que normalmente se encontra, só apresentando aumentos entre 9 e 48 h de exposição. Neste pico, *M. acanthurus* parece perder sua capacidade de hipo-regular e possivelmente se mantém isosmótico. Embora também seja uma espécie dulcícola anádroma, que depende da água salobra para reprodução, *M. olfersii* parece apresentar comportamento osmorregulatório diferente, em parte, de *M. acanthurus*: em salinidade de 21 (próxima a que *M. acanthurus* foi exposto): com exposição de 1, 3 e 6 h a osmolalidade da hemolinfa de *M. olfersii* aumentou proporcionalmente ao aumento da salinidade do meio, para 450, 496 e 578 mOsm/kgH₂O, respectivamente; contudo, após 12h sofreu ligeira queda para 499 mOsm/kgH₂O e após 24 h aumentou novamente, para 640 mOsm/kgH₂O (McNamara, 1987). Em *M. olfersii* a osmolalidade da hemolinfa oscilou, com elevações e quedas, sem apresentar um único pico como em *M. acanthurus*.

A manutenção ou reestabilização do volume celular e o conteúdo intracelular de solutos pode ser considerado como o maior problema enfrentado para manutenção da atividade das células diante de estresse osmótico (Péqueux, 1995). A eficiente capacidade osmorregulatória observada em *M. acanthurus* pode ser confirmada pela constância na porcentagem de água muscular observada nos diferentes tempos testados, mesmo diante da perda da capacidade de hipo-regulação após 9 h. Essa capacidade de regular a concentração osmótica e iônica nos fluidos internos permitiu a penetração dos crustáceos em águas continentais; em especial, os palemonídeos do gênero *Macrobrachium* tiveram sucesso na colonização desse ambiente (McNamara, 1987; McNamara et al., 1990; Freire et al., 2003).

Comportamento semelhante ao observado na osmolalidade foi encontrado na concentração de cloreto. A concentração de cloreto na hemolinfa de *M. acanthurus* apresentou picos em 10 e 45 min (não observados na osmolalidade) e 2 h em estresse hiper-salino, quando comparado aos camarões controles; a partir de 9 h de exposição ao meio hiper-salino, a concentração desse íon aumentou, tornando a diminuir após 24 h de exposição - mas com valores ainda superiores aos controles

até em 120 h. Isso está de acordo com o esperado, pois o cloreto juntamente com o sódio forma o principal osmólito extracelular, NaCl (Schmidt-Nielsen, 1997). O valor para concentração de cloreto em *M. acanthurus* em água doce foi de 137 mM; para *M. olfersii* a concentração de cloreto encontrada foi de 170 mM (Lima et al., 1997) e para *M. rosenbergii*, 200 mM (Huong et al., 2001).

Em *M. olfersii*, a concentração de cloreto na hemolinfa aumentou em salinidade de 21 (exposição de 1 até 240 h) em relação ao controle (McNamara et al., 1990; Lima et al., 1997). Em *M. rosenbergii* também foi observado aumento na concentração de cloreto acompanhando aumento da salinidade do meio, passando de 200 (em água doce) para 514 mM (em água do mar) (Huong et al., 2001). Esse aumento na concentração de cloreto (e sódio), acompanhou o aumento na osmolalidade quando estava em estresse hiper-osmótico (Huong et al., 2001). Em salinidades mais elevadas, ou após longo período de estresse salino no caso *M. acanthurus* no presente estudo, parece que esses *Macrobrachium* tendem a hip-conformar, sugerindo grande permeabilidade. A tolerância a alterações de salinidade em espécies de água doce pode ser decorrente de alterações intra e extra-celulares de osmólitos orgânicos, como aminoácidos livres (Freire et al., 2003).

Em relação ao magnésio, *M. acanthurus* se mostrou eficiente regulador da sua concentração na hemolinfa que permaneceu, em média, entre 3 e 6 mM. A concentração de magnésio na hemolinfa dos camarões em água doce de *M. acanthurus* (5 mM) foi maior que a de outros palaemonídeos do gênero *Macrobrachium*: *M. olfersii*, 2 mM (McNamara et al., 1990) e *M. potiuna* 0,93 mM (Freire et al., 2003). *M. olfersii* e *M. potiuna* em água doce, seu ambiente natural, hiper-regulam a concentração de magnésio, provavelmente por secreção via glândula renal, sofrendo poucas alterações em estresse salino (Freire et al., 2003). *M. rosenbergii* também hiper-regulou a concentração de magnésio na hemolinfa em baixas salinidades (Stern et al. 1987; Wilder et al., 1998); não alterando sua concentração em diferentes salinidades (Funge-Smith et al., 1995). Contudo, McNamara e colaboradores (1990) observaram para *M. olfersii* aumento na concentração de magnésio em 1 e 3 horas (7,60 e 8,54 mM, respectivamente), sofrendo queda no período subsequente e mantendo-se então equilibrado em 6, 12 e 24 horas (5,7, 4,9 e 5,2 mM, respectivamente), durante exposição à salinidade de 21.

De acordo com Brown e Terwilliger (1992), adultos de todas as espécies de crustáceos mantêm a concentração de magnésio hemolinfa abaixo da ambiental, exceto em águas extremamente diluídas.

Com relação ao outro íon de interesse no presente estudo, o cálcio, o palemonídeo *M. acanthurus* se mostrou ainda mais eficiente na regulação da sua concentração na hemolinfa. Não apresentou qualquer alteração significativa nos diferentes tempos testados de exposição a salinidade de 20, permanecendo em média entre 7 e 12 mM. A concentração nos controles de *M. acanthurus* foi próximo de 10 mM; semelhante ao encontrado em *M. rosenbergii*, 10 mM (Wilder et al., 1998) e 11 mM (McNamara et al., 1990).

De maneira geral, os representantes do gênero *Macrobrachium*, demonstram eficiente regulação da concentração de cálcio na hemolinfa. Como observado no presente estudo para *M. acanthurus*, *M. olfersii* em estresse hiper-salino por 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h manteve sua concentração de cálcio próxima ao controle (McNamara et al., 1990). Em *M. rosenbergii* a concentração de cálcio diminuiu com o aumento da salinidade, mas foi relativamente estável (Funge-Smith et al., 1995; Wilder et al., 1995); contudo, apresentou significativo aumento para 20 mM em salinidade de 28 (Funge-Smith et al., 1995). Possivelmente, esse aumento de cálcio é necessário para manter a hemolinfa eletroneutra, compensando o aumento de outros íons, como o sulfato. Apesar do cálcio ser considerado fundamental em muitos processos fisiológicos (Funge-Smith et al., 1995), não pareceu se relacionar às mudanças da osmolalidade da hemolinfa.

Análises da estrutura da cutícula de *M. rosenbergii* mostraram o cálcio como o maior constituinte inorgânico, não sendo afetado por mudanças na salinidade. Com o aumento da salinidade, há incorporação de magnésio, sódio e potássio na cutícula e manutenção de cálcio. A cutícula pode servir como reservatório para manter os níveis de cálcio na hemolinfa (Wilder et al., 1998). Isso explica a constância na concentração de cálcio na hemolinfa de *M. acanthurus* em estresse hiper-salino.

Além de mudanças osmóticas e salinas, também são descritas alterações na síntese de proteínas, em especial de estresse, decorrentes de alterações ambientais, como variação da salinidade (Sheikh-Hamad e Garcia- Perez, 1994; Gonzalez e Bradley, 1994; Spees et al., 2002). Na lagosta *Homarus americanus*, o estresse hipo

e hiper osmótico por 30, 60 ou 120 min aumentou a produção de Hsp70 (70 kDa “heat shock protein”) e Hsp90 (90 kDa “heat shock protein”) no músculo abdominal, indicando que essas proteínas podem ser influenciadas pela variação na salinidade (Spees et al., 2002).

No copépodo estuarino *Eurytemia affinis*, após 5 h de exposição a diferentes salinidades observou-se, em SDS-PAGE, a síntese de novas proteínas: animais em choque hiper-osmótico sintetizaram proteínas de 37 a 39 kDa, possivelmente proteínas de estresse (Gonzalez e Bradley, 1994). Contudo, no presente estudo a técnica de eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) não se mostrou suficientemente sensível para indicar alguma alteração nas bandas de 70 e 90 kDa, que seria compatível com a expressão aumentada de proteínas de estresse, nos homogenatos de musculatura abdominal observado em *M. acanthurus* após 2 h e 15 h em salinidade 20. Observa-se redução na quantidade de proteínas totais em 2 h e 15 h em salinidade 20 em relação ao controle, sendo essa redução mais acentuada em 2h. A utilização de outra técnica para determinar o conteúdo de proteínas totais presente nas amostras musculares, diferente do método colorimétrico, pode ser uma forma futura para confirmação dos resultados obtidos. De fato, deveria ser aplicada técnica imunológica (Western Blot), com anticorpos contra as formas induzíveis reguladas das HSP, para caracterizar inequivocamente possível alteração na expressão dessas proteínas.

5 CONCLUSÕES

- a) *M. acanthurus* é eficiente regulador da osmolalidade da hemolinfa na salinidade 20 nos primeiros minutos de estresse hiper-osmótico. Contudo, a partir de 9h a 48 h de exposição, sua capacidade osmorregulatória diminui. Contudo, isso parece não influenciar o controle do volume celular, pois a porcentagem de água presente na musculatura abdominal se mantém sem significativas alterações.
- b) O íon cloreto tem importante papel na regulação osmótica da hemolinfa *M. acanthurus*, pois seu comportamento foi semelhante ao da osmolalidade, observando –se um pico a partir de 9 h a 48 h.
- c) Os íons magnésio e cálcio foram eficientemente regulados desde os primeiros minutos até dias de exposição à salinidade 20.
- d) Utilizando-se a técnica de eletroforese em condições desnaturantes e redutoras não foi possível evidenciar alterações na expressão de proteínas de estresse, 70 e 90 kDa, dos homogenizados de músculo abdominal de *M. acanthurus*.

6 REFERÊNCIAS

- BECKER, J.; E. A. CRAIG. Heat-shock proteins as chaperones. **Eur. J. Biochem.** v. 219, p. 11-23. 1994.
- BOND-BUCKUP, G.; L. BUCKUP. Os palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). **Rev. Brasil. Biol.** v. 49, n. 4, p. 883-896. 1989.
- BRAILOVSKY, G. S.; E. S. GALERA. Comportamiento osmorregulator de *Macrobrachium tenellum* y *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae) em diferentes salinidades. **Rev. Biol. Trop.** v. 45, n. 3, p. 1085-1091. 1997.
- BROWN, A.C.; TERWILLIGER, N. B. Developmental changes in ionic and osmotic regulation in the Dungeness crab, *Cancer magister*. **Biol. Bull.** V. 182, p. 270-277. 1992.
- FEDER, E. M.; A. D. PARSELL; S. LINDQUIST. The stress proteins. . In: **Cell Biology of Trauma**. (Ed.) J> J> Lemasters and C. Oliver. CRC Press. Boca Raton; 177-191. 1995.
- FREIRE, C. A.; F. CAVASSIN; E. N. RODRIGUES; A. H. TORRES; J. C. MCNAMARA. Adaptative patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. Submetido ao **Comp. Biochem. Physiol A**, em 27 de maio de 2003.
- FUNGE-SMITH, S.J.; A. C. TAYLOR; J. WHITLEY; J.H. BROWN. Osmotic and ionic regulation in the giant Malaysian fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strontium and bromine. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 110A, n. 4, p. 357-365. 1995.
- GONZALEZ, C. R. M.; B. P. BRADLEY. Are there salinity stress proteins? **Mar. Env. Res.** v. 39, p. 205-208. 1994.
- HUONG, D. T. T.; W-J YANG; A. OKUNO; M. N. WILDER. Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationships to osmoregulatory ability. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 128A, p. 317-326. 2001.
- LIMA, A. G.; J. C. MCNAMARA; W. R. TERRA. Regulation of hemplymph osmolytes and gill Na^+/K^+ - ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v 215, p. 81-91. 1997.
- LINDQUIST, S; E. A. CRAIG. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** v. 2, p. 631. 1988.
- MCNAMARA, J. C. The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). **J. Exp. Mar. Biol.**

Ecol. v.107, p. 245-251. 1987.

MCNAMARA, J. C.; L.C. SALOMÃO; E. A. RIBEIRO. The effect of yestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentration during acute exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). **Hydrobiol.** v. 199, p. 193-199. 1990.

MOREIRA, G. S.; J. C. MCNAMARA; S. E. SHUMWAY; P. S. MOREIRA. Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 74A, p. 57-62. 1983.

PATRUNO, M. M.; M. C. THORNDYKE; M. D. C. CARNEVALI; F. BONASORO; P. W. BEESLEY. Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. **J. Exp. Biol.** V. 204, p. 843-848. 2001.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **J. Crust. Biol.** v. 15, n.1, p. 1-60. 1995.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal. Adaptação e Meio-Ambiente.** Santos Livraria Editora, São Paulo. 1996.

SHEIKH-HAMAD, D.; A. GARCIA-PEREZ. Induction of gene expression by heat shock versus osmotic stress. **Am. J. Physiol.** v. 36, p. 28-34. 1994.

SPEES, J. L.; S. A. CHANG; M. J. SNYDER; E. S. CHANG. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the Lobster *Homarus americanus*. **Biol. Bull.** v. 203, p. 331-337. 2002.

STERN, S.; A. BORUT; D. COHEN. Osmotic and ionic regulation of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) adapted to varying salinities and ion concentrations. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 86A, n. 2, p. 373-379. 1987.

WILDER, M. N.; KAZUMAZA, I.; M. ATMOMARSONO; T. HATTA; K. KOMURO. Changes in osmotic and ionic concentration in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 119A, p. 941-950. 1998.

XUE, Z.; R. M. GROSSFELD. Stress protein synthesis and accumulation after traumatic injury of crayfish CNS. **Neurochem. Res.** v. 18, n. 2, p. 209-218. 1993.

YENARI, M. A.; G. R. G. GIFFARD; R. M. SAPOLSKY; G. K. STEINBERG. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (Hsp 70). **Mol. Medic. Tod.** v. 5, p. 525-531. 1999.