

VITOR ANTONIO NARDINO

**EFEITO DA SALINIDADE E SAZONALIDADE SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA Na^+/K^+ -ATPase TECIDUAL E A
MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS METABÓLICAS NO
CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus* (DECAPODA,
PALAEMONIDAE)**

Monografia de Conclusão de Graduação
apresentada ao Departamento de Fisiologia,
Setor de Ciências Biológicas, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carolina Arruda
de Oliveira Freire.

CURITIBA
2003

VITOR ANTONIO NARDINO

**EFEITO DA SALINIDADE E SAZONALIDADE SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA Na^+/K^+ -ATPase TECIDUAL E A
MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS METABÓLICAS NO
CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus* (DECAPODA,
PALAEMONIDAE)**

Monografia de Conclusão de Graduação
apresentada ao Departamento de Fisiologia,
Setor de Ciências Biológicas, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda
de Oliveira Freire.

CURITIBA
2003

Sentado ao pé do fogo eu penso
em tudo que já vi,
flores do prado e borboletas
verões que já vivi;

As teias e as folhas amarelas
de outonos de outros dias,
com névoa e sol de manhã,
no rosto as auras frias.

Sentado ao pé do fogo eu penso
no mundo que há de ser
com inverno sem primavera
que um dia hei de ver.

Porque há tanta coisa ainda
que nunca vi de frente:
em cada bosque, em cada fonte
há um verde diferente.

Sentado ao pé do fogo eu penso
em gente que se desfez,
e em gente que vai ver o mundo
que não verei de vez

Mas enquanto sentado eu penso
em tanta coisa morta
atento espero os pés voltando
e vozes junto à porta.

(J.R.R. Tolkien)

*Dedico este trabalho à minha
madrinha, Regina Nardino Pereira
exemplo de professora, mãe
amiga.
Onde quer que você esteja.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Odalmir Nardino e Celina Paes Nardino, por me ensinarem humildade, caráter e honestidade e por me apoiarem incondicionalmente durante a minha vida.

À minha orientadora, Carolina Arruda de Oliveira Freire, por acreditar em mim mesmo depois dos meus deslizes (que não foram poucos).

A Denilton Vidolin, Maristela Azevedo e Valéria Giglio Togni pela ajuda nas dosagens.

Aos amigos do laboratório Ivonete, Viviane, Maristela, Denilton, Valéria, Alessandra e Clarice pelas coletas, conversas, apoio e tardes na cantina.

Aos meus sobrinhos Matheus Hariel Ângelo e Ediane Ângelo, por me fazerem voltar à infância por alguns instantes.

A Hozana Andrade Castillo, Francisco Filipak Neto, Mônica Mazzei Florecki, Anousea Evelin do Carmo, Vanessa Coquemala, Fábio Rosalinski Kuczkovski e Juliany de Bitencourt pelos quatro anos de trabalhos em equipe, reuniões de estudos, saídas, festas e principalmente amizade.

Aos amigos de fora da faculdade: Thiago, Komatsu, Andrei, Nilson, Maiom, Sally, Sérgio e Marcelo. Que a Força esteja com vocês!

Aos amigos mais recentes: Shiniti, Juliana, Acyr, Cecília, Igor, João Rodrigo, João Ricardo, Bertolini e Célio. Que essa amizade dure muitos anos!

A Rosane Cavet Martins pelo apoio, incentivo e pelo leite da coordenação.

A minha namorada, Maria Elisa Marques Vieira. Obrigado por ser a minha princesa.

E a todos que eu me esqueci de citar, o meu mais sincero muito obrigado.

E finalmente, a Deus, por me dar tanta gente para citar nesta página...

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
MATERIAL E MÉTODOS	5
Coleta e aclimação dos camarões	5
Obtenção da amostra de hemolinfa, determinação da osmolalidade e dosagens dos íons Cl^- e Mg^{2+}	6
Determinação do conteúdo de carboidratos dos tecidos e hemolinfa.....	6
Ensaio da enzima Na^+/K^+ -ATPase	7
Dosagem de triglicerídeos	10
Análise estatística	10
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS CONSULTADAS	23

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Osmolalidade (A), concentração de cloreto (B) e concentração de magnésio (C) na hemolinfa..... 14

Fig. 2: Conteúdo de glicogênio no brânquias (A), hepatopâncreas (B) e músculo (C) e de glicose na hemolinfa (D). 15

Fig. 3: Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (A) e conteúdo de triglicerídeos no hepatopâncreas (B)..... 16

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo verificar o efeito do choque hiperosmótico a curto e longo prazo sobre a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase na brânquias, hepatopâncreas e numa porção do músculo abdominal no camarão *Macrobrachium acanthurus*. Também visa analisar estes dados em conjunto com dados obtidos para regulação osmo-iônica e conteúdo de glicogênio e triglicerídeos (tracilgliceróis) no verão e inverno para verificar a influência da salinidade e da sazonalidade sobre o metabolismo energético deste camarão. O *M. acanthurus* é um camarão da família Palaemonidae que vive em água doce mas necessita da água salgada para o seu desenvolvimento larval e o seu porte lhe dá um potencial para aquacultura. Os camarões utilizados foram coletados no Rio da Draga, município de Pontal do Paraná, PR e aclimatados em água doce com aeração constante e alimentação em dias alternados com carne vermelha. Após a aclimação os camarões foram separados em 4 grupos: os controles foram deixados em água doce (salinidade 0) durante 3 horas e 10 dias e os experimentais em água salobra (salinidade 20) também durante 3 horas e 10 dias. Após esses períodos os animais foram sacrificados e foram realizadas dosagens de íons Cl^- e Mg^{2+} e glicose na hemolinfa, glicogênio e atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em brânquias, hepatopâncreas e músculo abdominal e triglicerídeos no hepatopâncreas. A osmolalidade aumentou em salinidade 20 após 10 dias e neste grupo os valores de inverno foram menores. As concentrações de Cl^- e Mg^{2+} também aumentaram em salinidade 20 após 10 dias. A concentração de glicogênio tecidual é maior no inverno em relação ao verão, exceto em salinidade 20 por 10 dias, quando o conteúdo de glicogênio é maior no verão, para todos os tecidos. A concentração de glicose se manteve constante. Não houve diferença estatística na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase embora haja uma tendência a diminuição nas brânquias em salinidade 20 por 10 dias e a aumento nos demais tecidos em salinidade 20. Também existe uma tendência ao aumento do conteúdo de triglicerídeos no hepatopâncreas em salinidade 20 por 10 dias. Pode-se concluir que o *Macrobrachium acanthurus* é capaz de manter um gradiente osmótico durante um período de horas e durante o inverno a osmorregulação é mais intensa. Durante esta estação o camarão acumula muito mais glicogênio nos tecidos, provavelmente para aguardar a época reprodutiva, mas também consome mais ativamente essa reserva para a regulação osmo-iônica. A enzima Na^+/K^+ -ATPase, com o aumento de salinidade do meio, tende a diminuir sua atividade nas brânquias, evitando assim uma absorção excessiva de sal, enquanto que no hepatopâncreas e músculo abdominal sua atividade tende a aumentar, pois ela deve estar ligada à regulação de volume celular.

INTRODUÇÃO

Na água que cobre a superfície do planeta estão dissolvidos diversos gases, compostos orgânicos e sais, principalmente NaCl. A concentração de sais na água do mar varia em torno de 35 (g de sal / kg de água) enquanto que em rios e lagos de água doce fica abaixo de 0.5, variando entre estes dois extremos nos estuários onde a água doce se mistura às águas oceânicas. Diferenças entre as concentrações de solutos na água e no líquido extra-celular dos animais que vivem no ambiente aquático faz com que ocorra um fluxo de íons e água através dos epitélios mais delgados da parede do corpo, especialmente as brânquias, impondo um desafio à manutenção de uma concentração adequada de solutos no meio interno do animal. A osmorregulação envolve os processos de transporte de sais entre os meios externo e interno, para compensar a perda ou ganho desses por difusão passiva, visando manter uma concentração adequada de solutos no líquido extra-celular (Schmidt-Nielsen, 1996).

Nos animais que habitam água doce a osmorregulação se faz pela absorção ativa de íons para o meio intracelular, principalmente Na^+ e Cl^- , que são os mais comuns, mas também outros íons como Mg^{++} que é o segundo cátion mais comum na água marinha (Spaargaren *in* Maloiv, 1979).

A espécie utilizada neste estudo, *Macrobrachium acanthurus*, pertence à família Palaemonidae e habita regiões de água doce próxima a estuários, mas é dependente da água salgada para reprodução e desenvolvimento, sendo portanto um animal eurihalino, i.e., que suporta grande variação da salinidade do meio externo (Moreira *et al.*, 1983).

A enzima Na^+/K^+ -ATPase está presente em praticamente todas as células animais e atua no contra-transporte ativo de sódio e potássio. Esta enzima atua diretamente no controle do volume celular de todas as células, sendo também responsável pela alta concentração de K^+ intracelular e Na^+ extra-celular (Alberts *et al.* 1997). Segundo Alberts *et al.* (1997) a enzima Na^+/K^+ -ATPase representa um terço de todo o requerimento energético de uma célula animal. Nas células do epitélio branquial de crustáceos, assim como em outros epitélios de transporte, esta enzima se encontra na membrana basolateral, gerando os gradientes eletroquímicos que irão energizar o transporte de outros íons inorgânicos ou moléculas orgânicas (Corotto & Holliday, 1996). Experimentos com o camarão *Macrobrachium olfersii* mostraram que a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial diminui com o aumento da salinidade do meio externo, evitando uma absorção de sal excessiva (Lima *et al.* 1997). Na lagosta *Homarus gammarus* a redução de salinidade do meio provocou o aumento da atividade desta enzima (Lucu & Devescovi, 1999). Segundo Lucu *et al.* (2000) a redução do gradiente osmótico entre a hemolinfa e o meio externo provoca a diminuição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase.

Os triglicerídeos, também chamados triacilgliceróis, são um dos mais importantes substratos energéticos de reserva nos tecidos animais. Estes lipídios são constituídos de três cadeias de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol e cada grama de triglicerídeos libera mais que duas vezes a energia liberada por cada grama de carboidrato, o que comprova a sua importância como reserva energética (Lehninger *et al.* 1995). No crustáceo misidáceo, *Neomysis integer*, temperaturas e salinidades maiores provocam um uso mais elevado das reservas lipídicas. Neste mesmo crustáceo foi

observado que a transferência para um meio de maior salinidade provoca maior consumo das reservas de carboidratos (Verslycke & Janssen, 2002).

A temperatura e a salinidade da água podem alterar a concentração osmótica interna de peneídeos eurihalinos, levando-os a dispender considerável quantidade de energia para a manutenção do equilíbrio osmótico; sendo este de fundamental importância para o bom funcionamento do organismo (Schmidt-Nielsen, 1996). Em *Penaeus stylirostris* foi verificada redução significativa na capacidade osmorregulatória quando submetido a redução de temperatura (Lemaire *et al.*, 2002), e no caranguejo *Chasmagnathus granulata* foi observado que no inverno os lipídios são a principal reserva energética utilizada (Kucharski *et al.*, 2002). Em estudos com *Macrobrachium olfersii* detectou-se diminuição do consumo de oxigênio com o aumento da salinidade até 21, demonstrando redução no metabolismo energético. (McNamara & Moreira, 1987). Sendo assim é interessante estudar a influência da salinidade e da estação do ano sobre o metabolismo energético do camarão *Macrobrachium acanthurus*, camarão de porte razoável e com potencial para aquacultura.

OBJETIVOS

1) Verificar o efeito do choque hiperosmótico a curto e longo prazo sobre a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias, hepatopâncreas e músculo abdominal.

2) Analisar estes dados combinados com os dados obtidos para a regulação osmoiônica e o conteúdo de glicogênio e triglicerídeos no hepatopâncreas para verificar a influência dos fatores salinidade e sazonalidade sobre o metabolismo energético de *Macrobrachium acanthurus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e aclimação dos camarões.

Os camarões *M. acanthurus* foram coletados no município de Pontal do Paraná, PR, no Rio da Draga e aclimatados em laboratório em aquário estoque de 100 litros com água doce não-clorada, com aeração constante e alimentação 3 vezes por semana com carne bovina moída em dias intercalados. A temperatura ficou em torno de 17°C no inverno e 22°C no verão. As coletas foram realizadas nos meses de Janeiro-Fevereiro (experimentos de verão) e Junho-Julho (experimentos de inverno). O camarão *M. acanthurus* tem se mostrado bastante resistente ao transporte do rio ao laboratório, apresentando baixa mortalidade. *M. acanthurus* também tem tamanho razoável de 6 a 10 cm, o que facilita a dissecação e remoção dos órgãos para os ensaios.

Após 6 a 10 dias de aclimação às condições de laboratório, os camarões foram separados em 4 grupos: água doce (<0,5 g de sal por kg de água) durante 3 horas e 10 dias, constituindo os grupos controle, e salinidade 20 durante 3 horas e 10 dias, constituindo os grupos experimentais. Os animais foram expostos às condições controle ou experimentais em recipientes individuais de 200 mL. A salinidade de 20 foi obtida pela diluição de água do mar com água doce não-clorada. Após esses períodos os animais foram anestesiados por resfriamento em gelo e dissecados. Em todas as dosagens o número de animais utilizados foi de 6 a 8 em cada situação e a alimentação foi mantida também no período experimental, também em dias alternados, sem alimentação no dia do experimento.

Obtenção da amostra de hemolinfa, determinação da osmolalidade e dosagem dos íons Cl⁻ e Mg²⁺

Para estas dosagens outros animais foram utilizados, expostos às mesmas condições explicadas anteriormente. Passado o tempo de exposição, os camarões foram anestesiados em gelo e a corda nervosa ventral seccionada entre a região do cefalotórax e do abdomen. Amostra da hemolinfa foi retirada por punção cardíaca com pipetador de 10 µL e congelada (-20°C) até o momento das dosagens.

A osmolalidade da hemolinfa foi determinada através de Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor Vapro Wescor modelo 5520 das amostras não diluídas. Para a determinação da concentração dos íons cloreto (Cl⁻) e magnésio (Mg²⁺) na hemolinfa foi utilizado método colorimétrico (Kits Labtest) específico para cada íon, com posterior leitura em espectrofotômetro, respectivamente a 470 e 505nm, seguindo protocolo do fabricante, em amostras apropriadamente diluídas com água deionizada.

Determinação do conteúdo de carboidratos nos tecidos e hemolinfa

O conteúdo de glicogênio foi medido segundo Leighton *et al.* (1989). Após pesadas as amostras dos tecidos foram colocados em tubos de ensaio de vidro contendo 500µL de KOH em seguida deixados em banho-maria a 60° C por 30 minutos. Os tubos foram retirados do banho e agitados em vórtex. Em seguida 100 µL das amostras foram retirados e colocados em tubos eppendorf contendo 17 µL de ácido acético glacial e 500 µL de tampão acetato (pH 4.8) com amiloglucosidase (1% do volume do tampão acetato). As amostras foram novamente deixadas em banho-maria a 37° C por 2 horas. Após esse tempo os tubos foram retirados e centrifugados por 10 minutos a 1400 rpm. Em seguida 100 µL do conteúdo dos tubos foram retirados e colocados em novos tubos

contendo 1000 μ L de tampão trietanolamina (pH 7,5). Após 40 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 340 nm de comprimento de onda. O conteúdo de glicogênio da amostra foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Cont. Glicogênio} = \text{D.O.} \times 8,85 \times m^{-1}$$

D.O. \rightarrow densidade óptica da amostra

8,85 \rightarrow fator de correção do NADP

m \rightarrow massa do tecido em g

-Tampão acetato (pH 4.8) - 100 ml

Ácido acético glacial (96%) = 480 μ L

Acetato de Na⁺ = 975 mg

-Tampão Trietanolamina – TEA (pH 7.5) – 100 ml

Trietanolamina = 5.6 g

MgSO₄ = 0.074 g

ATP = 0.490 g

NADP = 0.050 g

HK / G6PDh = 600 μ L

O conteúdo de glicose da hemolinfa foi determinado usando-se Kit Labtest específico para glicose.

Ensaio da enzima Na⁺/K⁺-ATPase.

Para o ensaio da Na⁺/K⁺-ATPase foram removidas todas as brânquias de ambos os lados, o hepatopâncreas inteiro e uma porção de músculo abdominal.

A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase foi determinada por comparação da atividade ATPásica total do tecido homogenizado com a atividade ATPásica não sensível à ouabaína. A diferença entre estas duas é a atividade da Na^+/K^+ -ATPase; ou seja, atividade ATPásica sensível à ouabaína.

Soluções:

1. Tampão Imidazol: solução de imidazol 10 mM, pH 7,6 acertado com HCl.
2. Padrão Fosfato: solução de Na_2HPO_4 , 10 mM.
3. Reagente do Fosfato: preparado na hora misturando reagentes A e B na proporção de 1ml A: 6 ml B.
 - 3.1. Reagente do Fosfato A: solução de ácido ascórbico 20%, dissolvido a 60 °C. Armazenado à -20 °C.
 - 3.2. Reagente do Fosfato B: Molibdato de amônio 0.84% em 2N de titrisol (H_2SO_4).
4. Tris-ATP: ATP 75 mM (em tampão imidazol). pH ajustado para 7 com solução de Tris 1M.
5. Comix A0: solução contendo imidazol 20 mM, MgSO_4 6 mM, KCl 20 mM e NaCl 100 mM. pH ajustado para 7,6 com HCl.
6. Comix B+: Comix A0 mais ouabaína 2 mM (concentração final).
7. EDTA- Na_2 : 0,1M de EDTA- Na_2 em tampão imidazol. pH ajustado com solução de Tris 1M até 7,5. Aquecimento em banho maria a 60 °C.
8. Detergente de incubação: Deoxicolato de sódio 10 mM.

Procedimento:

Após a dissecação, os órgãos retirados (brânquias, hepatopâncreas ou porção do músculo abdominal) foram homogenizados em 750 μl de tampão imidazol utilizando

homogenizador manual, teflon-vidro, tipo Potter-Elevehjem. O homogenizado foi centrifugado a 2000 rpm por 3 min, e 495 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos eppendorf contendo 5 µl do detergente de incubação, agitados e deixados em gelo por 20 min. O restante do sobrenadante foi transferido para outros tubos eppendorf e armazenados a -20°C para posterior dosagem de proteínas totais.

Após a incubação, tubos eppendorf previamente identificados, e em duplicata, receberam os reagentes segundo o seguinte esquema:

	Branco	S-Branco	Padrão 50	Padrão 100	A0	B+
Comix A0	380 µl	380 µl			380 µl	
Comix B+			380µl	380µl		380µl
P. Fosfato			50 µl	100 µl		
H ₂ O mQ	130 µl	110 µl	70 µl	20 µl		
Amostra					100 µl	100 µl
EDTA			10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Após todos os reagentes estarem prontos foi pipetado o substrato.

Tris-ATP		20 µl			20 µl	20 µl
----------	--	-------	--	--	-------	-------

e o conteúdo dos tubos foi imediatamente misturado em vórtex e levado à banho maria a 25 °C por 30 min.

Após esse tempo os tubos foram colocados em banho com água em ebulição por 2 min para interromper a reação, e centrifugados a 2000 rpm por 3 min. Vinte microlitros do sobrenadante foram transferidos para novos tubos identificados da mesma maneira, contendo 480 µl de H₂O milliQ, gelada. Foram adicionados 500 µl do reagente do fosfato recém preparado, os tubos foram então agitados e incubados em banho maria

a 60°C por 7 min. Após a incubação os tubos foram resfriados em água com gelo e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 830 nm.

A dosagem de proteínas foi feita utilizando Kit Labtest para dosagem de proteínas totais, também por método colorimétrico.

Cálculos:

$$\text{Padrão médio (Pm)} = [(\text{Abs}_{p50} \times 2) + \text{Abs}_{p100}] \times 0.5$$

$$\text{Atividade ATPásica} = \text{Abs} \times 20 \times \text{Pm}^{-1} \rightarrow \mu\text{mol Pi} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$\text{Atividade da Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase} = (\text{Atividade comix A0} - \text{Atividade comix B+}) /$$

$$\text{Proteínas totais} \rightarrow \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}.$$

Dosagem de triglicerídeos.

Para a dosagem de triglicerídeos foi removido apenas o hepatopâncreas (outros camarões foram usados apenas para essa dosagem).

Logo após a dissecação dos animais o hepatopâncreas removido foi pesado em balança de precisão e rapidamente homogeneizado em 750µl de tampão imidazol (idem protocolo da Na⁺/K⁺-ATPase). Do homogeneizado foi dosada a quantidade de triglicerídeos por método colorimétrico utilizando Kit Labtest específico para triglicerídeos. A leitura foi feita a 545 nm em espectrofotômetro.

Análise estatística.

Os valores fornecidos nos resultados são a média ± erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o software Sigma Plot for Windows da Jandel Corporation. Os grupos experimentais foram comparados com seus respectivos controles e entre as duas estações do ano (quando houver) pelo teste t de Student não pareado com P<0.05. Os gráficos foram feitos com o software Microsoft Excel 2000.

RESULTADOS

As osmolalidades (mOsm/kg H₂O) obtidas para *M. acanthurus* no verão, foram de 401.7±9,6 (n=6) e 306,5±23,4 (n=7) nos controles (0) 3 horas e 10 dias, 416,3±29,2 (n=4) em 20 durante 3 horas e 549,3±12,0 (n=8) em estresse hiper-salino (20) durante 10 dias. No inverno foram de 400,7±12,6 (n=7) e 373,3±25,4 (n=9) em situação controle (0. 3 horas e 10 dias respectivamente), 422,3±20,3 (n=9) em choque hipersalino (20. 3 horas) e 509,9±9,3 (n=7) em 20. 10 dias. A osmolalidade em 20, após 10 dias foi maior em relação aos controles tanto verão quanto inverno e os valores de inverno nesta situação foram menores em relação ao verão (Fig 1A).

Os valores obtidos no verão para a concentração de cloreto na hemolinfa (mM) deste camarão palemonídeo foram em média de: 171.9±7.6 (6) a 0. 3 horas: 115.9±7.4 (7) em 0. 10 dias: 174.9±10.8 (7) em 20. 3 horas e 241.5±4.9 (8) em 20. 10 dias. No inverno os valores obtidos foram 136.6±6.0 (7) nos controles 0, 3 horas; 137,3±11,0 (9) nos também controles 0. 10 dias: 168,8±21,1 (8) quando submetidos a choque hiper-salino (20. 3 horas) e 185,5±7,9 (7) nos animais submetidos a estresse hiper-salino (20. 10 dias). Houve aumento na situação 20. 10 dias em relação ao controle tanto verão quanto inverno. No verão a concentração foi maior em 20. 10 dias e 0, 3 horas em relação ao inverno (Fig. 1B).

A concentração de magnésio (mM) neste camarão eurihalino no verão foi em média de: 2.11±0.2 (6) nos controles de 3 horas: 2.53±0.5 (8) nos controles de 10 dias: 2.50±0.3 (7) em choque hiper-salino (20. 3 horas) e 15.13±4.0 (8) em 20. 10 dias. No inverno as médias obtidas foram de: 3.5±0.3 (6) nos controles (0, 3 horas): 2.2±0.3 (7)

nos também controles 0 (10 dias); $3,0\pm 0,3$ (7) quando expostos a choque hiper-salino (20. 3 horas) e $9,9\pm 3,1$ (7) em 20 por 10 dias. Em 20, 10 dias a concentração de magnésio foi maior que do nos controles no verão e no inverno. Em 0, 3 horas a concentração no inverno foi maior que no verão (Fig. 1C).

Os valores para o conteúdo de glicogênio dos tecidos ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), referentes aos experimentos de verão a curto prazo (3 horas), foram de $1,37\pm 0,9$ $\mu\text{mol/g}$ (6) para brânquias controle (0) e $2,07\pm 0,3$ (4) em estresse hiper-salino (20). Para hepatopâncreas os valores foram $9,64\pm 3,0$ (6) em situação controle (0) e $10,77\pm 1,3$ (4) em estresse hiper-salino (20) e para músculo foram de $1,10\pm 0,2$ (6) para os controles (0) e $1,08\pm 0,3$ (4) para os animais experimentais (20). Os valores de glicogênio na mesma estação referentes aos experimentos de 10 dias, para situação controle e 20 respectivamente, foram de $17,87\pm 5,9$ (7) e $69,78\pm 7,5$ (8) para brânquia; $21,64\pm 6,4$ (8) e $50,10\pm 7,9$ (8) para hepatopâncreas; e $8,88\pm 0,9$ (8) e $40,22\pm 4,6$ (8) para músculo. A concentração aumentou em 20, 10 dias em relação ao controle no verão (Fig 2 A-C).

No inverno os experimentos de curto prazo forneceram os seguintes valores para as concentrações de glicogênio: $78,9\pm 4,7$ (8) em 0 e $57,4\pm 3,3$ (9) em 20 para brânquia, $67,1\pm 5,6$ (8) em 0 e $42,1\pm 6,9$ (9) em 20 para hepatopâncreas e $50,5\pm 3,7$ (8) e $32,3\pm 3,8$ (9) em músculo a 0 e 20 respectivamente. Os valores obtidos nos experimentos a longo prazo (10 dias), para os controles e experimentais respectivamente, foram de $22,7\pm 3,9$ (9) e $34,3\pm 6,9$ (7) para brânquia; $27,0\pm 5,7$ (9) e $22,4\pm 8,3$ (6) para hepatopâncreas; e $20,2\pm 4,0$ (9) e $16,0\pm 3,7$ (7) para músculo. A concentração de glicogênio nos tecidos diminuiu em 20, 3 horas em relação ao controle. Houve um aumento da concentração no inverno em relação ao verão em 3 horas, 0 e 20, para todos os tecidos e em 10 dias, 0 no

músculo. Em 20 após 10 dias houve uma diminuição da concentração no inverno em relação ao verão (Fig. 2 A-C).

As medidas de glicose na hemolinfa para 3 horas (em mg/dl) foram de: $32,7 \pm 5,7$ (6) em situação controle (0) e $25,07 \pm 2,0$ (4) em situação de estresse (20) no verão e de $20,8 \pm 4,1$ (6) nos controles e $19,3 \pm 3,2$ (8) a 20 no inverno. Na experimentação de longo prazo foram obtidos os valores de $23,98 \pm 4,6$ (8) (0) e $16,6 \pm 1,4$ (8) (20) para verão e $19,6 \pm 9,5$ (9) (0) e $14,7 \pm 3,1$ (7) (20) para inverno. Não houve alteração significativa entre os valores de glicose em todas as situações experimentais (Fig. 2D).

A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (em $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), durante o verão, nas brânquias foi de $0,66 \pm 0,2$ (8) em 0 por 3h, $0,66 \pm 0,1$ (10) para 20, 3h, $0,80 \pm 0,3$ (6) para 0, 10 dias e $0,48 \pm 0,2$ (5) para 20, 10 dias. No hepatopâncreas os valores para 3 horas foram de $0,36 \pm 0,2$ (8) em 0 e $0,59 \pm 0,2$ (11) em 20, e para 10 dias foram de $0,06 \pm 0,01$ (4) em 0 e $0,12 \pm 0,03$ (6) em 20. No músculo os valores foram, para os animais aclimatados por 3 horas, de $0,52 \pm 0,2$ (7) em 0 e $0,72 \pm 0,3$ (9) em 20. Para os camarões aclimatados por 10 dias os valores foram de $0,24 \pm 0,1$ (5) em 0 e $0,43 \pm 0,2$ (6) em 20, neste tecido. Não houve diferença estatística entre os experimentais e seus controles, nem entre os aclimatados em 3 horas e os aclimatados por 10 dias (Fig. 3A).

A concentração de triglicerídeos no hepatopâncreas dos animais aclimatados durante o verão (em mg / g de tecido) foi, para os animais aclimatados por 3 horas, de $13,19 \pm 3,6$ (6) em 0 e $13,05 \pm 3,0$ (6) em 20 e para os aclimatados por 10 dias foi de $8,54 \pm 1,0$ (6) em 0 e $11,00 \pm 2,6$ (6) em 20. Não houve diferença estatística entre os animais em 20 e seus controles, nem entre os tempos de exposição (Fig. 3B).

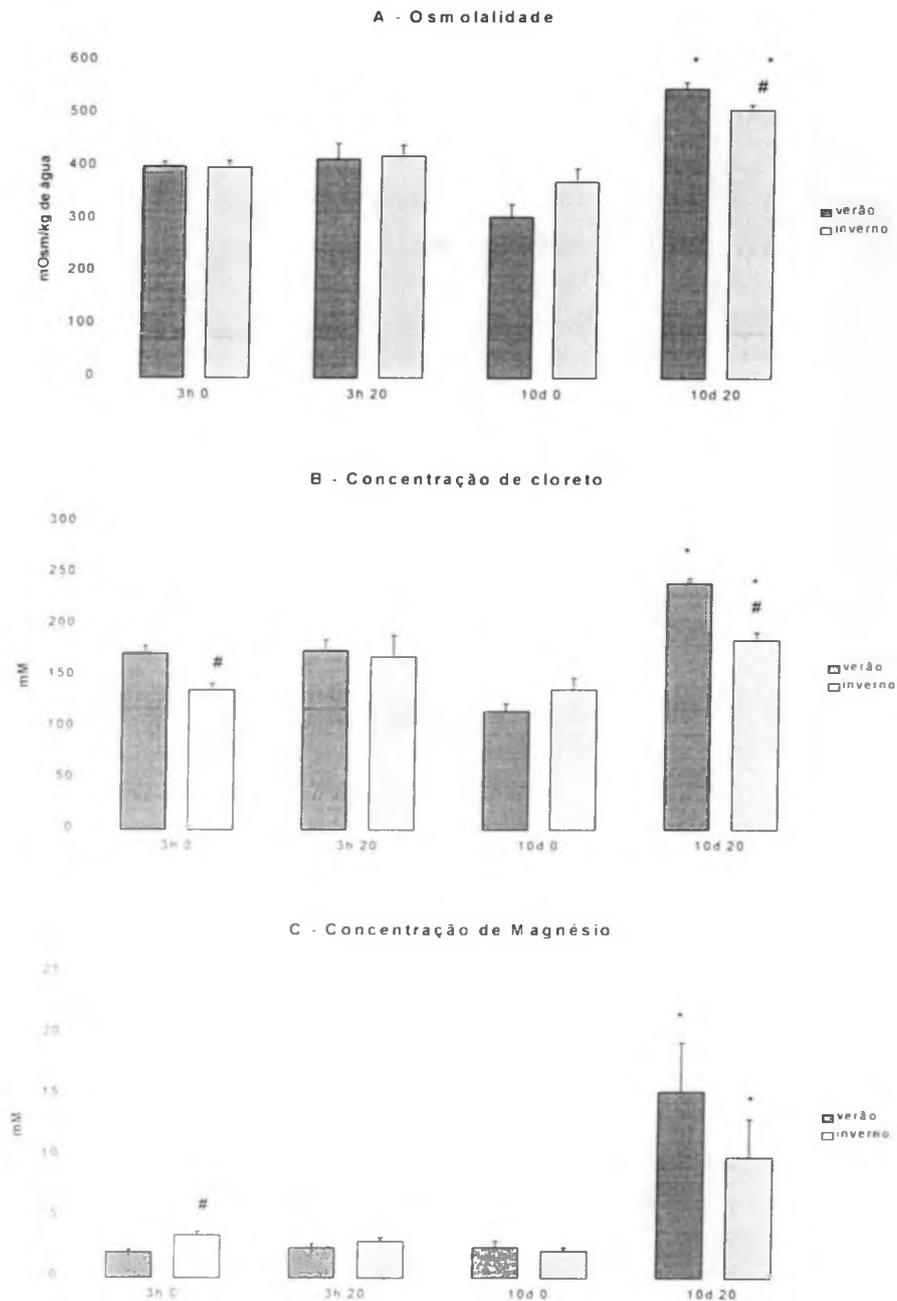


Fig. 1: Osmolalidade (A), concentração de cloreto (B) e concentração de magnésio (C) na hemolinfa.

Escuro = verão, claro = inverno, 3h = 3 horas, 10d = 10 dias.
 *significativamente diferente do controle no mesmo tempo de exposição e estação; #significativamente diferente da outra estação na mesma salinidade e tempo de exposição (P<0,05).

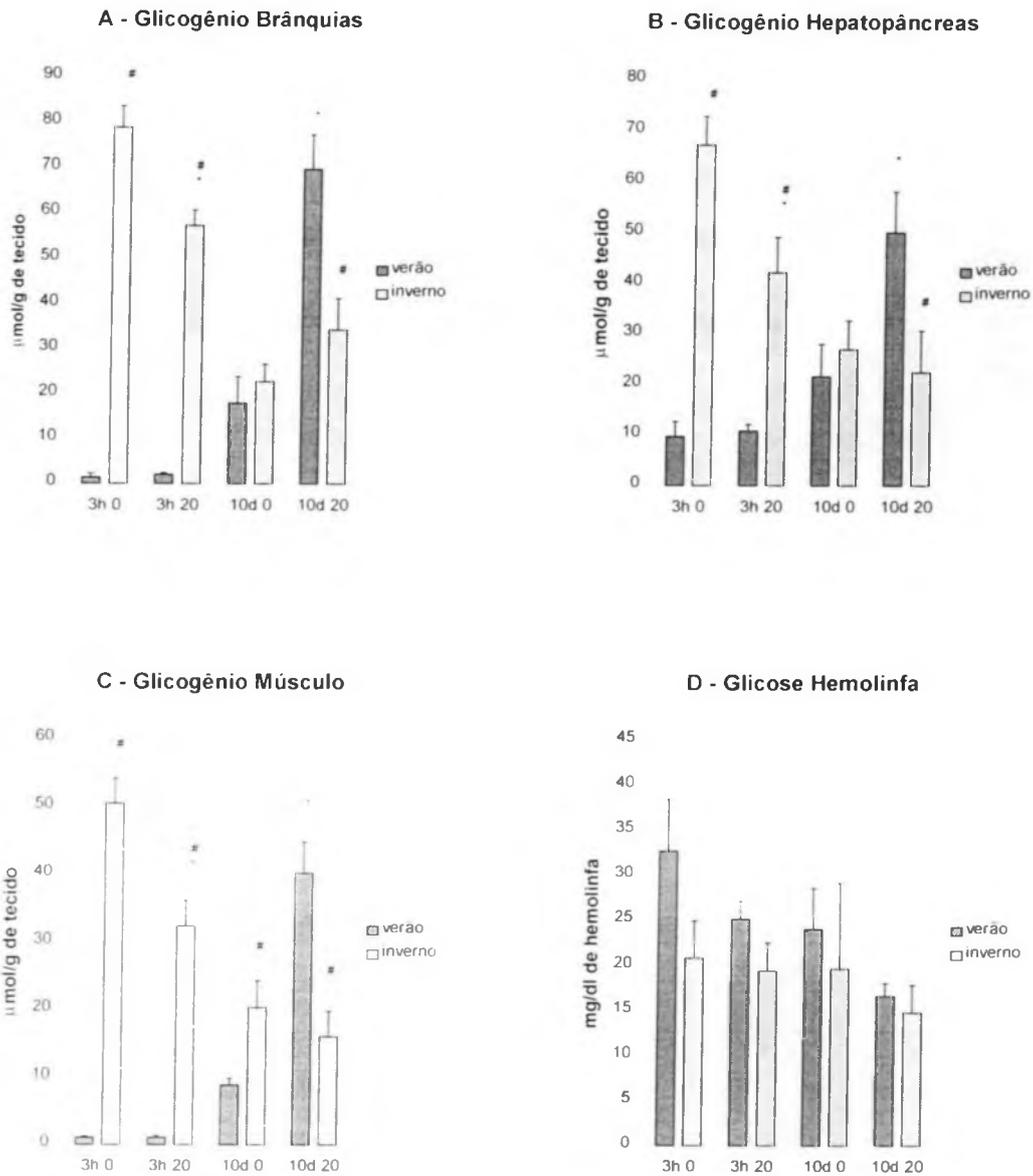
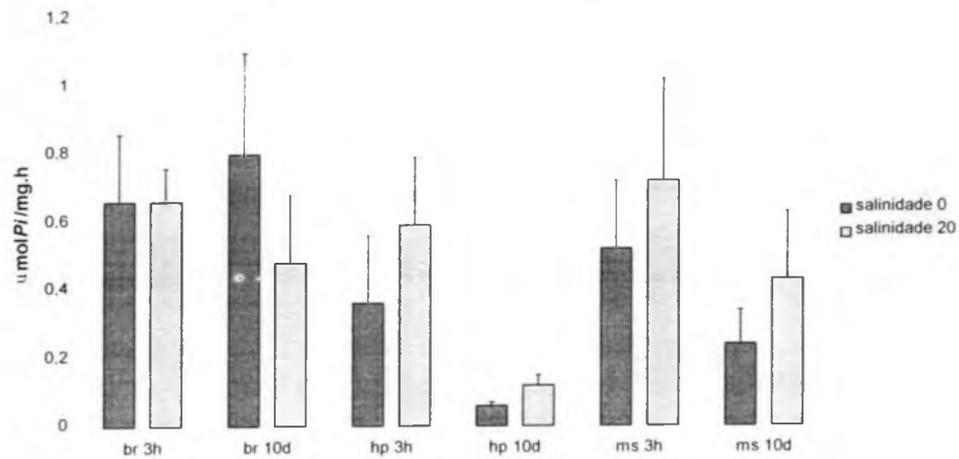


Fig. 2: Conteúdo de glicogênio no brânquias (A), hepatopâncreas (B) e músculo (C) e de glicose na hemolinfa (D).

Escuro = verão, claro = inverno, 3h = 3 horas, 10d = 10 dias. * significativamente diferente do controle no mesmo tempo de exposição e estação; # significativamente diferente da outra estação na mesma salinidade e tempo de exposição ($P < 0,05$).

A - Atividade da Na/K-ATPase



B - Triglicerídeos hepatopâncreas

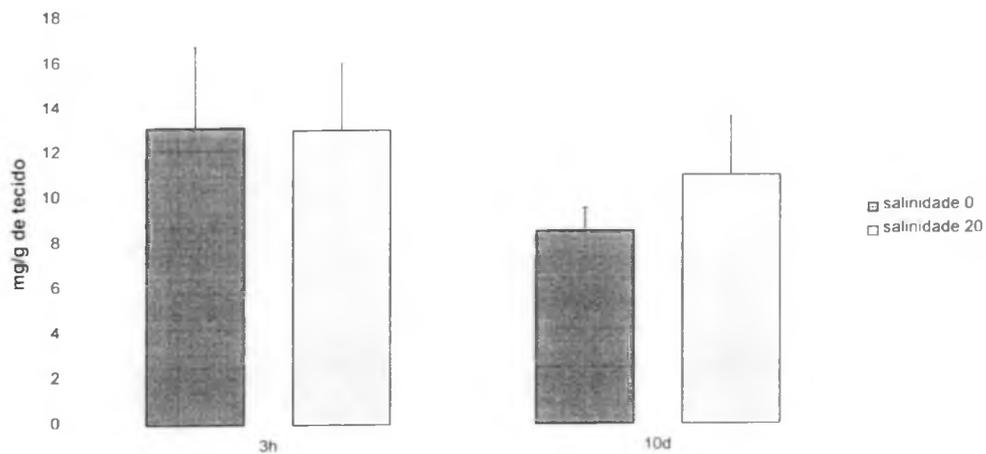


Fig. 3: Atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (A) e conteúdo de triglicerídeos no hepatopâncreas (B).

Escuro = salinidade 0, claro= salinidade 20, 3h = 3 horas, 10d = 10 dias, br = brânquias, hp = hepatopâncreas, ms = músculo.

DISCUSSÃO

A osmolalidade da hemolinfa deste camarão palemonídeo foi significativamente maior depois de exposto a uma salinidade de 20 durante 10 dias. No entanto os valores obtidos no inverno foram menores do que aqueles encontrados no verão para esta situação experimental, contrariando os dados encontrados por Lemaire *et al.* (2002) em que a capacidade osmorregulatória do camarão *Penaeus stylirostris* era menor com a redução da temperatura. Nas demais situações a osmolalidade não foi alterada significativamente. Fica demonstrado que o camarão *M. acanthurus* é capaz de regular a osmolalidade da sua hemolinfa durante um curto prazo quando exposto a choque hiper-osmótico (20).

Com relação à concentração de cloreto na hemolinfa de *M. acanthurus*, observou-se que a exposição do animal ao estresse hiper-salino (20, 10 dias) em ambas as estações (verão e inverno) provocou aumento significativo em relação aos grupos controles (0, 10 dias). Notou-se ainda que no verão a concentração de cloreto é maior que no inverno nos camarões expostos a salinidade de 20 por 10 dias e nos controles em 3h. Foi observada alteração significativa na concentração de magnésio na hemolinfa do palemonídeo *M. acanthurus* em estresse hiper-salino (10 dias, 20) tanto no verão quanto no inverno. A concentração de magnésio também foi maior no inverno que no verão nos grupos de 0, 3 horas. Tanto os valores de magnésio quanto os de cloreto são coerentes com a variação de osmolalidade encontrada, mostrando que o *M. acanthurus* é capaz de controlar sua osmolalidade apenas por um período de horas, semelhante às observações de Lima *et al* (1997) para *M. olfersii*, onde a osmolalidade aumentou de 340 para 737

mOsm.kg⁻¹ H₂O após uma aclimação de 10 dias à água de salinidade 21, assim como a concentração de cloreto: aumentou de 170 para 266 mEq/l.

A concentração de glicogênio em todos os tecidos estudados sofreu um aumento no verão depois de 10 dias em salinidade 20 em relação ao controle neste mesmo período. No inverno, porém, houve o efeito inverso no período de 3 horas, isto é, diminuição do conteúdo de glicogênio nos tecidos estudados na situação de 20 em relação ao controle em água doce.

Houve efeito sazonal significativo sobre a concentração de glicogênio nos tecidos. Foi verificado aumento das concentrações no inverno em relação ao verão para os grupos em 3 horas, tanto em 20 quanto em 0. Para os grupos em 20, 10 dias as concentrações no verão foram maiores que no inverno. Além desses valores, no músculo a concentração de glicogênio foi maior no inverno que no verão para os controles em 10 dias. Em *Chasmagnathus granulata* há redução na absorção de glicose nas brânquias durante o inverno devido ao menor metabolismo, além do fato de que nesta estação a principal reserva utilizada são os lipídios dos tecidos musculares (Kucharski *et al.* 2002). Também foram encontrados concentrações maiores de glicogênio, em brânquias de *C. granulata*, no inverno em relação ao verão (Nery e Santos, 1993 apud Kucharski *et al.*, 2002), compatível com os aumentos na concentração de glicogênio nos tecidos de *M. acanthurus* no inverno nos experimentos de 3 horas.

As concentrações de glicose na hemolinfa se mantiveram estáveis em todas as situações mostrando sua regulação eficiente, independente da taxa de hidrólise ou síntese de glicogênio tecidual, em situações de maior ou menor demanda para sua utilização, por exemplo, pelos tecidos osmorregulatórios (Fig. 2D) diferentemente do

caranguejo *Chasmagnathus granulata*, em que as concentrações de glicose no sangue variam tanto com a osmolalidade quanto com a estação (verão ou inverno) (Nery & Santos, 1993).

Apesar de não haver diferença significativa nos valores de atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase entre os grupos experimentais e controles, é possível notar uma tendência no hepatopâncreas e músculo: em 20 a atividade aumenta em relação à atividade em 0, tanto em 3h quanto em 10 dias. Essa tendência era esperada uma vez que a Na^+/K^+ -ATPase é uma das enzimas mais importantes no transporte de sal, tanto para absorção, quanto para secreção. Considerando a situação de longo prazo, em que a osmolalidade do líquido extracelular fica acima da normal, pode-se especular que esse aumento na atividade da enzima nos órgãos internos signifique um esforço das células em manter o seu volume, uma vez que a osmolalidade do líquido extracelular aumentou.

Nas brânquias pode-se observar tendência a diminuição da atividade da enzima durante o estresse salino a longo prazo. No camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* a atividade branquial da enzima Na^+/K^+ -ATPase diminui quando o animal é exposto a salinidade mais alta, para evitar a absorção excessiva de sal (Lima *et al.*, 1997), o que pode também ser o caso do *M. acanthurus*. Semelhante ao que ocorre em *Hemigrapsus nudus*, um caranguejo marinho: a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial aumenta proporcionalmente ao gradiente osmótico entre o meio interno e externo, quando os caranguejos são expostos à estresse hipossalino por duas semanas, permitindo, assim, a absorção de sal do ambiente (Corotto & Holliday, 1996).

O aumento do conteúdo de glicogênio nos tecidos, durante o inverno, pode ser devido a uma menor utilização de glicogênio, seja por uma atividade metabólica menor.

já que a baixa temperatura pode ter diminuído o catabolismo do animal, ou por que a síntese foi menos inibida que a sua degradação. É possível que o animal esteja fazendo uma reserva energética para a época reprodutiva. O camarão *Macrobrachium vollenhovenii* tem sua maior atividade reprodutiva em agosto (Etim & Sankare, 1998), enquanto em *M. pertesi*, camarão presente na África do Sul, a atividade reprodutiva ocorre de novembro a abril (Reed apud Etim & Sankare, 1998). Em outro camarão, *Palaemonetes varians*, a reprodução é estimulada pelo aumento do fotoperíodo (Bouchon, 1991).

O aumento do conteúdo de glicogênio observado, no verão, em 20, 10 dias, em relação ao controle em água doce também é acompanhado por uma tendência ao aumento no conteúdo de triglicerídeos do hepatopâncreas. Combinado com a maior osmolalidade desta situação, em relação à mesma situação no inverno, sugere que no inverno a regulação do volume celular nos tecidos do *M. acanthurus* é mais intensa que no verão e pode gerar uma depleção significativa no conteúdo de glicogênio dos tecidos. Nery e Santos (1993) verificaram que o conteúdo de glicogênio aumenta nos tecidos do caranguejo *Chasmagnathus granulata* quando exposto a um estresse salino, durante o verão, também após uma exposição de dias. Neste trabalho os caranguejos não foram alimentados durante os experimentos e mesmo assim aumentaram suas reservas de carboidratos.

Por outro lado os dados mostram que o *M. acanthurus* diminui suas reservas de glicogênio durante o choque hipersalino (3h, 20) no inverno. Uma vez que a osmolalidade se manteve normal é possível que o animal tenha usado suas reservas para manter seu gradiente osmótico. Em *C. granulata* o mesmo fenômeno é observado

quando os caranguejos são expostos a choque hiperosmótico no inverno. O fato do *M. acanthurus* manter suas reservas metabólicas no verão quando exposto ao choque hiperssalino talvez seja um resultado da temperatura mais elevada, assim a reserva menor no inverno seria consequência da compensação de um metabolismo basal mais lento, com a necessidade de um maior gasto metabólico para manter os gradientes osmóticos.

Concluindo, pode se dizer que o *Macrobrachium acanthurus* é capaz de manter a osmolalidade da sua hemolinfa por um período de horas e que no inverno a osmolalidade da hemolinfa aumenta menos do que no verão, a longo prazo. No inverno as reservas de glicogênio são muito mais altas que no verão mas também são aparentemente mais utilizadas para a osmorregulação o que pode significar uma taxa de síntese de glicogênio muito alta, suficiente para suplantar a sua degradação. Os dados ainda não são conclusivos, sem a análise da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e da concentração de triglicerídeos no inverno, mas espera-se que ela tenha uma atividade maior que no verão, o que explicaria a osmorregulação mais intensa.

CONCLUSÕES

- O camarão *Macrobrachium acanthurus* é capaz de manter um gradiente osmótico durante um período de horas;

- Durante o inverno a osmorregulação é mais intensa;

- Também durante o inverno o camarão acumula mais glicogênio em seus tecidos, provavelmente para a época reprodutiva, mas também consome essa reserva mais rapidamente com a osmorregulação;

- Nas brânquias a enzima Na^+/K^+ -ATPase tem a atividade com tendência à redução com o aumento da osmolalidade da hemolinfa, evitando a absorção excessiva de sal (no verão).

- No hepatopâncreas e músculo abdominal a enzima Na^+/K^+ -ATPase pode estar ligada à regulação do volume celular, pois sua atividade tende a aumentar com o aumento da salinidade.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

- ALBERTS, A.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3º edição. Editora Artes Médicas. Porto Alegre-RS, 1997.
- BOUCHON, D., 1991. **Biological clock in seasonal reproductive cycle in the ditch shrimp *Palaemonetes varians* Leach. I. Photoperiodic time measurement.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 146: 1-12.
- COROTTO, F.S.; HOLLIDAY, C.W., 1996. **Branchial Na,K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana).** *Comp. Biochem. Physiol.* 113A: 361-368.
- ETIM, L.; SANKARE, Y., 1998. **Growth and mortality, recruitment and yield of the fresh-water shrimp, *Macrobrachium vollenhovenii*, Herklots 1851 (Crustacea, Palaemonidae) in the Fahe reservoir, Côte d'Ivoire, West Africa.** *Fisheries Research* 38: 211-223.
- KUCHARSKI, L. C.; SCHEIN, V.; CAPP, E.; da SILVA, R. S. M., 2002. **In Vitro Insulin Stimulatory Effect in Glucose Uptake and Glycogen Synthesis in the Gills of the Estuarine Crabe *Chasmagnathus granulata*.** *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 256 - 263.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier. São Paulo-sp. 1995.
- LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; DIMITRIADES, G.D.; BOND, J.; NEWSHOLM, E.A. 1989. **Effect of walker 256 carcinoma in rats on insulin-simulated glucose metabolism in soleus muscle in vitro.** *Biochem. Soc. Trans.* 17:1043-1044.
- LEMAIRE, P.; BERNARD, E.; MARTINEZ-PAN, J.A.; CHIM, L., 2002. **Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*.** *Aquaculture.* 209: 307-317.
- LIMA, A.G.; McNAMARA, J.C.; TERRA, W.R., 1997. **Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺/K⁺-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836)(Decapoda: Palaemonidae).** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 215: 81-91.
- LUCU, C.; DEVESCOVI, M., 1999. **Osmoregulation and branchial Na⁺,K⁺-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute sea water.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 291-304.

LUCU, C.; DEVESCOVI, M.; BOSKO, S.; KOZUL, V., 2000. **Gill Na,K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers: Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hiperregulation.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246: 163-178.

McNAMARA, J.C.; MOREIRA, G.S., 1987. **O₂ consumption and acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea: Decapoda): whole animal and tissue respiration.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 221-230.

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

NERY, L.E.M.; SANTOS, E.A., 1993. **Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda).** *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 747-753.

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

SPAARGAREN, D.H. **2A. Marine and brackish water animals.** in MALOIJ, G.M.O. **Comparative Physiology of Osmoregulation in animals.** Vol. 1. Academic Press. London. 1979. 677p.

VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C.R., 2002. **Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea).** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279: 61-72.