

CLARICE FOSTER

**CRUSTÁCEOS OSMOCONFORMADORES POSSUEM MAIOR CAPACIDADE
DE REGULAR O VOLUME DE SUAS CÉLULAS DO QUE CRUSTÁCEOS
OSMORREGULADORES?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Arruda O. Freire
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza
(Universidade Estadual de Londrina)

CURITIBA
2006

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^ª. Carolina Freire pela paciência e por incansavelmente ter me orientado durante todas as etapas deste trabalho. E, pelos momentos de aprendizado que me proporcionou durante a fase do mestrado.

A minha co-orientadora Prof^ª. Marta Marques de Souza que me auxiliou durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Cláudio Fernandes que sempre de forma muito gentil permitiu que eu usasse a balança de precisão de seu laboratório.

Ao Programa de PG em Biologia Celular e Molecular da UFPR pela oportunidade de cursar o Mestrado, e ao DAAD pela doação dos equipamentos ao laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Comparativa que propiciaram momentos agradáveis, em especial a Maristela por ter me auxiliado na compreensão de algumas metodologias e técnicas de laboratório.

Aos amigos que fiz durante o tempo de mestrado, em especial a Enelise Amado por ter me auxiliado durante todo o tempo que estive na UEL. Também a amiga Katheryne que sempre foi muito prestativa.

A amiga Valéria Togni por ter colaborado com o meu projeto, indo até o litoral e trazendo as espécies que usei para a execução do mesmo.

Aos meus pais por sempre me apoiar e compreender as minhas ausências. As minhas irmãs pelos momentos agradáveis. Também aos meus sobrinhos, Gustavo e Ana Julia, pelo carinho e amor demonstrado.

Ao Edson José Cordeiro, meu marido, que com sua calma me ensinou a ter mais paciência. Também, por nunca ter me cobrado os momentos que, por

motivos maiores, precisei me ausentar das tarefas de casa ou até mesmo quando não pude lhe dar a atenção que merecia.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O AMBIENTE AQUÁTICO E A OSMORREGULAÇÃO.....	1
1.2. OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS	4
1.3. REGULAÇÃO ANISOSMÓTICA EXTRACELULAR E REGULAÇÃO ISOSMÓTICA INTRACELULAR	9
1.3.1 Epitélios Responsáveis Pela Osmorregulação (RAE)	10
1.3.2 Mecanismos de Regulação de Volume Celular.....	13
1.4. MODELOS BIOLÓGICOS.....	15
1.4.1 O caranguejo marinho <i>Hepatus pudibundus</i>	16
1.4.2 Os caranguejos <i>Palaemon pandaliformis</i> (estuarino) e <i>Macrobrachium acanthurus</i> (dulcícola, próximo do litoral).....	16
1.4.3 O caranguejo dulcícola <i>Dilocarcinus pagei</i>	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. COLETA	20
3.2. EXPERIMENTOS.....	22
3.3. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE HEMOLINFA E DE TECIDOS.....	23
3.3.1 Dosagem das concentrações osmótica e iônica da hemolinfa	24

3.3.2 Dosagem do teor hídrico no tecido muscular e branquial e do teor de substâncias positivas a ninidrina (SPN) no tecido muscular.....	25
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. <i>Hepatus pudibundus</i>	28
4.2. <i>Palaemon pandaliformis</i>	32
4.3. <i>Macrobrachium acanthurus</i>	36
4.4. <i>Dilocarcinus pagei</i>	40
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Caranguejo marinho, <i>Hepatus pudibundus</i>	16
Figura 2. Camarão estuarino, <i>Palaemon pandaliformis</i>	17
Figura 3. Camarão dulcícola, <i>Macrobrachium acanthurus</i>	18
Figura 4. Caranguejo dulcícola, <i>Dilocarcinus pagei</i>	19
Figura 5. Osmolalidade, Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , <i>H. pudibundus</i>	30
Figura 6. Teor hídrico e SPN (NPS), <i>H. pudibundus</i>	31
Figura 7. Osmolalidade, e Cl ⁻ , <i>P. pandaliformis</i>	34
Figura 8. Teor hídrico e SPN (NPS), <i>P. pandaliformis</i>	35
Figura 9. Osmolalidade, Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , <i>M. acanthurus</i>	38
Figura 10. Teor hídrico e SPN (NPS), <i>M. acanthurus</i>	39
Figura 11. Osmolalidade, Na ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , <i>D. pagei</i>	41
Figura 12. Teor hídrico e SPN (NPS), <i>D. pagei</i>	42
Tabela 1. Salinidade controle e experimental (estresse salino) e tempos experimentais para cada espécie.....	22
Tabela 2. Osmolalidade e concentração de íons nas águas experimentais usadas para cada espécie.....	23
Tabela 3. Razão entre as variações absolutas máximas no teor hídrico muscular e na osmolalidade da hemolinfa.....	49
Tabela 4. Razão entre as variações máximas no teor hídrico e SPN musculares	51

RESUMO

A homeostase osmótica do líquido extracelular (LEC) é essencial para o funcionamento normal das células. Os animais que mantêm a homeostasia do seu LEC frente a variações na salinidade do meio são osmorreguladores, e realizam “Regulação Anisomótica Extracelular”, RAE. Os que têm o seu LEC acompanhando a variação do meio são osmoconformadores. As células apresentam mecanismos de ajustes denominados de “Regulação Isosmótica Intracelular”, RII. Os crustáceos ocupam ambientes aquáticos diferentes, desde água doce até lagoas hiper-salinas, apresentando grande variedade de estratégias osmorregulatórias. A hipótese central testada nesta dissertação é a de que crustáceos com maior capacidade de RAE teriam menor capacidade de RII. Os crustáceos escolhidos foram: o caranguejo *Hepatus pudibundus* (marinho, longe da costa), os camarões *Palaemon pandaliformis* (residente no estuário) e *Macrobrachium acanthurus* (água doce continental próxima ao litoral), e o caranguejo *Dilocarcinus pagei* (água doce longe do litoral). Os crustáceos foram expostos às seguintes salinidades experimentais, por até 24 horas: *H. pudibundus* 25‰, *P. pandaliformis* 2‰ e 35‰, *M. acanthurus* 30‰ e *D. pagei* 7‰. As salinidades controle foram as de seus habitats. Para *P. pandaliformis*, 12‰ foi a salinidade escolhida, como média para o estuário. Foram dosadas a osmolalidade e concentrações de sódio, cloreto, magnésio e cálcio na hemolinfa. Os tecidos muscular e branquial tiveram seu teor hídrico determinado. Foi determinada a concentração de substâncias positivas à ninidrina (SPN) no tecido muscular. *H. pudibundus* apresentou diminuição da osmolalidade da hemolinfa já a partir de 0,5h (comportamento tipicamente osmoconformador), porém sem apresentar ganho de água por seus tecidos. *P. pandaliformis* apresentou diminuição do teor hídrico no músculo em 35‰, com aumento da osmolalidade da hemolinfa. Em água 2‰ a osmolalidade foi transitoriamente reduzida (1h), mas depois retornou ao valor dos controles. Houve diminuição do teor hídrico no músculo de *M. acanthurus* a partir de 2h, com aumento das concentrações da hemolinfa. *D. pagei* apresentou redução no teor hídrico (somente nas brânquias) após 6h, sem alteração osmótica na hemolinfa. Todas as espécies (com exceção do camarão *P. pandaliformis*) parecem utilizar as substâncias positivas à ninidrina (aminoácidos) no controle da água tecidual, como típico de invertebrados aquáticos. Os resultados obtidos sustentam a hipótese levantada pelo projeto, pois o caranguejo marinho osmoconformador *H. pudibundus* de fato mostrou a maior capacidade de controle da água tecidual, mesmo diante de grande variação na sua hemolinfa.

ABSTRACT

Osmotic homeostasis of the extracellular fluid (ECF) is crucial for proper functioning of the cells. Aquatic animals that maintain the homeostasis of their ECF when faced with variations in the salinity of the external medium are called osmoregulators, they perform Extracellular Anisosmotic Regulation (EAR). Those whose ECF follow the variation of the external medium are called osmoconformers. Cells display mechanisms of osmotic adjustment called Intracellular Isosmotic Regulation (IIR). Crustaceans occupy a wide variety of aquatic habitats, from fresh water to hyper-saline ponds, thus displaying a vast array of osmoregulatory strategies. The central hypothesis tested in this dissertation was that crustaceans with a higher capacity of EAR would have a decreased capacity of IIR. In order to try to test this hypothesis 4 species of crustaceans have been chosen. The marine crab *Hepatus pudibundus*, the palaemonid shrimps *Palaemon pandaliformis* (estuarine species) and the freshwater *Macrobrachium acanthurus* (fresh water near to the coast), and the red crab *Dilocarcinus pagei* (continental fresh water distant from the coast). The crustaceans have been exposed to the following experimental salinities, for up to 24 hours: *H. pudibundus* 25‰, *P. pandaliformis* 2‰ and 35‰, *M. acanthurus* 30‰, and *D. pagei* 7‰. Control salinities were those of their habitats. For *P. pandaliformis*, 12‰ was the chosen salinity, as an average for the estuary. Osmolality, sodium, chloride, magnesium, and calcium have been assayed in the hemolymph. Muscle and branchial tissues had their water content determined. Ninhydrin positive substances (NPS) have been assayed in the muscle samples. *H. pudibundus* displayed hemolymph dilution already after 0.5 h (typical marine osmoconformer), but its tissues did not gain water. *P. pandaliformis* lost muscle water in 35‰, with concomitant increase in hemolymph concentrations. When in 2‰, ECF osmolality was transiently reduced (1h), but later recovered to control values. The muscle of *M. acanthurus* lost water after 2h, concomitant with increased hemolymph concentrations. *D. pagei* lost water only in branchial tissue after 6h, but its ECF was kept unaltered. All species (with the exception of *P. pandaliformis*) seem to use NPS (aminoacids) in the control of their tissue water, as typical of aquatic invertebrates. The results obtained support the hypothesis proposed by the project, as the marine osmoconformer, the crab *H. pudibundus*, in fact displayed a higher capacity to hold muscle tissue water, despite wide variations in hemolymph concentrations.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O AMBIENTE AQUÁTICO E A OSMORREGULAÇÃO

Muitos organismos multicelulares ao longo do processo evolutivo adquiriram a capacidade de manter seu meio interno estável frente às alterações do meio externo, o que possibilitou a sobrevivência dos mesmos em ambientes variáveis. A capacidade do animal em manter a homeostase osmótica do líquido que circunda suas células, o líquido extracelular (LEC), é essencial para a manutenção das suas funções orgânicas. Contudo, um dos grandes desafios dos animais aquáticos está em conseguir manter ou restaurar a composição dos seus fluidos corporais diante de variações que podem ocorrer no meio que habitam (PÉQUEUX, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996; RANDALL et al., 2002).

Os animais aquáticos podem ocupar ambientes com concentrações salinas diferentes. Os que habitam a água do mar encontram uma concentração de aproximadamente 3,5% de sal (35 g de sal / litro, 35 g. kg⁻¹). No entanto, esse valor pode sofrer variações devido a níveis elevados de precipitação ou com a entrada de água doce proveniente de rios locais ou ainda por acentuada evaporação em águas rasas (NYBAKKEN, 1988; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Os estuários (regiões litorâneas), habitados por muitos tipos de animais, apresentam concentrações salinas que podem variar durante o dia. Este ambiente apresenta variações na concentração salina devido à mistura da água doce com a água do mar. Estas variações ocorrem, principalmente, pelo ciclo das marés, mas também sazonalmente, de acordo com o índice pluviométrico de cada estação do ano (NYBAKKEN, 1988; MANN & LAZIER, 1991). Os animais que habitam água doce encontram uma concentração iônica e osmótica total muito menor do que os animais de ambientes marinhos e estuarinos. A água contém de 0,1 a 10 mM de

NaCl total, com distintos valores para o conteúdo de outros solutos, de acordo com o local e tipo de rocha perfundida pelas chuvas (NYBAKKEN, 1988; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Tanto na água do mar quanto nas águas diluídas ou continentais os elementos inorgânicos com maior presença são: sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}), enxofre (S) e cálcio (Ca^{2+}). O sódio e o cloreto (NaCl) são os íons de maior concentração tanto na água do mar como na água do mar diluída, sendo ainda os osmólitos quantitativamente mais relevantes do líquido extracelular de todos os animais (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). A água do mar apresenta 470 mmol de sódio e 550 mmol de cloreto por litro, chegando a aproximadamente 1.020 mOsm/ kg H_2O juntamente com outros íons abundantes como o magnésio e o sulfato (PROSSER, 1973).

O líquido extracelular e o intracelular dos animais apresentam diferenças quanto à concentração de solutos inorgânicos e orgânicos. O meio extracelular apresenta principalmente os íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), e o meio intracelular apresenta baixas concentrações de Na^+ e elevadas concentrações de K^+ , fosfato e proteínas. Contudo, a quantidade total de solutos osmoticamente ativos é basicamente a mesma entre os dois compartimentos. Como consequência, entre o meio extra- e o intracelular podem existir apenas pequenas e transitórias diferenças osmóticas. Diferenças osmóticas significativas geram imediatamente fluxos de água através da membrana celular.

Os epitélios de órgãos especializados são os responsáveis pela manutenção das diferenças osmóticas e iônicas entre o meio extracelular (meio interno do animal) e o meio (externo) ao qual o animal está exposto. Essas diferenças (gradientes) são sustentadas por transporte ativo realizado,

principalmente, pelo epitélio das brânquias, órgãos excretores e tubo digestivo (PÉQUEUX, 1995; RANDALL et al., 2002; FREIRE et al., 2006).

Os animais aquáticos que conseguem manter a homeostase osmótica do seu LEC e sustentar um gradiente osmótico/salino em relação ao meio (regulação anisomótica), mesmo diante de variações na salinidade do meio externo, são chamados de osmorreguladores. Dentre os animais osmorreguladores, os que mantêm o seu LEC mais concentrado do que o meio externo são denominados de hiper-reguladores. Aqueles que mantêm o seu LEC menos concentrado em relação ao meio são ditos hipo-reguladores. A capacidade osmorregulatória é obrigatória para as espécies que habitam água doce, e é comum nas espécies de estuário ou de entre-marés (GILLES & PÉQUEUX, 1981; PÉQUEUX, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Entre os animais aquáticos há aqueles que não impedem a variação na concentração do seu LEC, o qual acompanha as mudanças ocorridas no meio. Esses animais são ditos osmoconformadores, característica comumente observada entre invertebrados marinhos. Entre os animais osmoconformadores há espécies que regulam alguns íons específicos porque apresentam mecanismos para a eliminação e/ou absorção dos mesmos. Essas espécies são osmoconformadoras porém reguladoras iônicas (PÉQUEUX, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Outra característica das espécies aquáticas é a capacidade de tolerar variações na salinidade do meio. Aquelas espécies que toleram uma grande variação salina são denominadas eurihalinas (do Grego, eurys= amplo; halos=sal) e aquelas que toleram uma limitada variação na concentração do meio são ditas estenohalinas (do Grego, stenos= próximo) (PÉQUEUX, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

1.2. OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS

Dentre os artrópodes, o subfilo Crustacea é o único que apresenta animais aquáticos, sendo a maioria marinha, mas com muitas espécies vivendo em água doce e outras ocupando habitats semiterrestres ou terrestres. Contudo, mesmo os terrestres são bastante dependentes da proximidade com a água para seu desenvolvimento e reprodução (RUPPERT & BARNES, 1996). A diversidade dos crustáceos impede a descrição de uma forma típica da anatomia externa, sendo observáveis algumas características comuns ao subfilo. A cabeça apresenta cinco pares de apêndices: o par mais anterior é o primeiro par de antenas, seguido pelo segundo par de antenas, pelo par de mandíbulas (são pequenas e fortes, com superfície trituradora e mordedoras opostas) e posteriormente se encontram as primeiras e segundas maxilas. O tórax apresenta uma variação maior dentro do subfilo, e em vários grupos este é dividido em tórax e abdômen, porém o número de segmentos que cada um contém varia de grupo para grupo. Em muitos crustáceos, os três primeiros segmentos do tórax se fundem com a cabeça (cefalotórax) e um ou vários apêndices do tronco modificam-se para auxiliar na alimentação (chamados de maxilípedes). O cefalotórax em muitas espécies é revestido por uma carapaça dorsal (RUPPERT & BARNES, 1996).

Os crustáceos aquáticos podem ser encontrados em diferentes ambientes em termos de salinidade, o que permite observar todos os tipos de estratégias osmorregulatórias neste subfilo (PÉQUEUX, 1995). Há espécies tipicamente osmorreguladoras e espécies tipicamente osmoconformadoras, mas os limites entre as categorias não são sempre muito definidos. A maioria das espécies osmorreguladoras, dependendo da salinidade e do tempo de exposição a que foram experimentalmente expostas, passam de um padrão de osmorregulação

para osmoconformação (PÉQUEUX, 1995). Nos crustáceos marinhos osmoconformadores a osmolalidade total e a concentração de Na^+ e Cl^- da hemolinfa são próximos às da água do mar onde são encontrados. Esses crustáceos não gastam energia para regular a osmolalidade e concentração de NaCl do seu LEC (PÉQUEUX, 1995; RANDALL et al., 2002). Quando acontecem mudanças nas concentrações do LEC, devido a alterações no meio externo, podem ocorrer prejuízos às funções celulares do animal, podendo levá-lo a morte em poucas horas. Por exemplo, esta situação é observada com os caranguejos *Maja* sp e *Cancer pagurus*, que ao serem transferidos abruptamente da água do mar para água diluída ganham água e perdem íons inorgânicos; a morte ocorre em poucas horas, mesmo que o meio tenha sofrido poucas mudanças (5% a 10% de diluição) (PÉQUEUX, 1995). Estes dois caranguejos, portanto, são tipicamente estenohalinos e osmoconformadores marinhos. Contudo, existem crustáceos marinhos que toleram redução de salinidade; em geral são habitantes costeiros, eurihalinos e osmorreguladores. Esses crustáceos são capazes de manter a osmolalidade da hemolinfa mais ou menos constante em uma série de salinidades, hiper-regulando em meio diluído e hipo-regulando em água do mar ou até em meio salino mais concentrado do que a água do mar. Dois dos crustáceos mais estudados, dentro desta categoria, são os caranguejos *Callinectes sapidus* (NEUFELD et al., 1980; PÉQUEUX, 1995) e *Carcinus maenas* (SIEBERS et al., 1982; PÉQUEUX, 1995). Mesmo em espécies que controlam ativamente a concentração osmótica do seu LEC, a ocorrência de variações implica na necessidade de mecanismos para regular o volume celular de suas células em resposta a choques hipo- ou hiper-osmóticos. Como a membrana plasmática não sustenta gradientes osmóticos, fluxos difusivos de água

certamente acarretarão alterações de volume. Espécies osmoconformadoras eurihalinas necessariamente possuem grande capacidade celular de manter seu volume, pois suas células enfrentam amplas variações do seu LEC. Ao contrário, as espécies estenohalinas osmorreguladoras ou osmoconformadoras apresentam presumivelmente uma menor capacidade de regulação do volume celular de suas células, sendo esta limitação um dos motivos para a letalidade de certas variações na salinidade ambiente. Quando expostas a um choque hipo- ou hiper-osmótico, pelo controle insuficiente do volume celular, ocorre entrada ou saída de água das células, não compensadas, gerando lise ou murchamento irreversíveis (HERREIRA et al., 1989; DEATON, 1996).

Os crustáceos que habitam estuários apresentam diferentes estratégias para manter o conteúdo osmótico e iônico diante de mudanças na concentração salina do ambiente. Crustáceos destes ambientes são necessariamente eurihalinos, podendo no entanto ter capacidade osmorregulatória variável. As espécies de camarões palemonídeos do gênero *Palaemon*, estuarinas ou marinhas, apresentam comportamento hiper/hipo-regulador e capacidade de regular os íons Na^+ e Cl^- em uma grande extensão de salinidades (FREIRE et al., 2003). O camarão de estuário *Palaemon pandaliformis*, em salinidades altas, hipo-regula a osmolalidade de sua hemolinfa e em salinidades baixas (<0,5 - 6‰), hiperconforma. A espécie não sobrevive mais do que 3 horas em água doce (FREIRE et al., 2003). A mesma capacidade de regulação da hemolinfa é observada na espécie *Palaemon affinis*, com alta taxa de sobrevivência em salinidades de 5 a 43‰, mas pequena sobrevivência em água doce (KIRKPATRICK & JONES, 1985). Camarões de outra família (peneídeos) toleram

salinidades entre 3 e 50‰, hipo-regulando em águas marinhas e hiper-regulando quando a salinidade é reduzida (LIN et al., 2000).

A família Palaemonidae tem inúmeros representantes mais adaptados à água doce, essencialmente do gênero *Macrobrachium*. O fato de muitas espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* serem encontradas em bacias hidrográficas da América do Sul, principalmente em rios brasileiros, possibilita estudos comparativos que apontem para a evolução da capacidade de regulação osmo-iônica de espécies deste gênero, na transição da água do mar para a água doce (FREIRE et al., 2003). Dentro deste gênero, são observadas diferentes distribuições e capacidades de tolerância ao aumento de salinidade (FREIRE et al., 2003). Por exemplo, o camarão dulcícola adulto *Macrobrachium olfersii* tolera a exposição à água salobra, e suas larvas dependem de água salobra para completar o desenvolvimento. Contudo, o adulto exposto a salinidades aumentadas (~10-30‰) apresenta capacidade osmorregulatória deficiente, tendendo a hipo-conformação (FREIRE et al., 2003). O mesmo padrão osmorregulatório foi relatado para outras espécies dulcícolas eurihalinas deste gênero (MOREIRA et al., 1983; SMITH et al., 1995; BRAILOVSKY & GALERA, 1997; WILDER et al., 1998; HUONG et al., 2001). A espécie *M. potiuna* é outra espécie dulcícola e eurihalina desta família, ocorrendo em rios brasileiros até regiões próximas ao litoral (MOREIRA et al., 1983; FREIRE et al., 2003). *M. potiuna* e *M. brasiliense*, contudo, são espécies hololimnéticas, que não dependem da água salobra ou salgada para seu desenvolvimento. *M. potiuna* é uma espécie bastante eurihalina e osmorreguladora, mas *M. brasiliense*, cuja distribuição é restrita a regiões continentais mais internas, é bem estenohalina, mostrando mortalidade quando a salinidade chega a 20‰ (FREIRE et al., 2003).

Os crustáceos que habitam água doce distante do litoral são, na sua grande maioria, estenohalinos, como relatado acima para *Macrobrachium brasiliense*. Esta mesma caracterização pode ser aplicada ao caranguejo dulcícola *Dilocarcinus pagei*, espécie bem adaptada à vida na água doce e que habita águas continentais distantes do litoral (ONKEN & McNAMARA, 2002).

Animais dulcícolas apresentam necessariamente o seu líquido corporal hiper-osmótico em relação ao meio. Para manter esta condição diante da osmolalidade da água que não é, geralmente, maior do que $50 \text{ mOsm.kg H}_2\text{O}^{-1}$, os animais enfrentam pelo menos dois tipos de problema. O primeiro é a entrada de água para o interior de seu organismo em razão do gradiente osmótico. E o segundo problema é a constante perda de sais para o meio (RANDALL et al., 2002). Para contrabalançar estes fluxos difusivos, o animal apresenta mecanismos de absorção branquial e reabsorção de íons do filtrado no saco celômico da glândula antenal. Estes processos ativos consomem energia. O gasto energético pode ser reduzido diminuindo a permeabilidade à água e íons, apresentando significativa redução na concentração da hemolinfa e aumentando a afinidade dos sistemas para a absorção de sal (PÉQUEUX, 1995; RASMUSSEN & ANDERSEN, 1996; SANTOS & McNAMARA, 1996; RANDALL et al., 2002; FREIRE et al., 2006). Ao avaliar a permeabilidade à água verifica-se que esta é menor em espécies de água doce, quando comparadas com espécies marinhas (SMITH, 1967; LOCKWOOD et al., 1973). O lagostim dulcícola *Astacus astacus* apresenta permeabilidade aparente à água de aproximadamente $0,2 \text{ h}^{-1}$ e o caranguejo de água salobra *Carcinus maenas* $0,8 \text{ h}^{-1}$ (RASMUSSEN & ANDERSEN, 1996). Outros estudos mostram que a cutícula sensível (intestino posterior) ou a calcificada (carapaça) são 500 – 5000 vezes menos permeáveis

em crustáceos reguladores (*Eriocheir sinensis* e *Astacus leptodactylus*) do que em osmoconformadores (*Maia squinado* e *Homarus gammarus*). A cutícula destes tecidos apresenta menor permeabilidade quando comparada com a cutícula branquial. Mas, nos crustáceos reguladores a cutícula branquial é bem menos permeável que a carapaça de osmoconformadores (PÉQUEUX, 1995).

1.3. REGULAÇÃO ANISISMÓTICA EXTRACELULAR E REGULAÇÃO ISISMÓTICA INTRACELULAR

As células animais são vulneráveis às mudanças de volume devido à grande permeabilidade da sua membrana plasmática à água e por não apresentarem uma rígida parede celular, como as células vegetais e as bactérias (MONGIN & ORLOW, 2001). Diante de variações na osmolalidade do LEC a célula animal pode apresentar diferença de volume (inchaço ou encolhimento), o que pode comprometer suas atividades normais (BURTON & FELDMAN, 1982; SOUZA & SCEMES, 2000). As células, para manterem o seu meio intracelular em homeostase, apresentam mecanismos de ajuste de volume, propostos por FLORKIN (Revisão em PÉQUEUX, 1995) como Regulação Isosmótica do Fluido Celular (ou Regulação Isosmótica Intracelular, RII). Esta regulação implica em fluxos controlados de solutos, visando o controle e regulação de seu volume (fluxo de água), uma vez que o meio intracelular torna-se necessariamente isosmótico ao extracelular.

A manutenção da concentração extracelular aproximadamente constante diante de variações na salinidade do meio é a própria capacidade de osmorregulação, também denominada de Regulação Anisomótica do Fluido Corporal (ou Regulação Anisomótica Extracelular, RAE), termo também proposto

por FLORKIN (Revisão em PÉQUEUX, 1995). Os crustáceos que apresentam uma menor capacidade de osmorregulação do líquido extracelular (RAE) automaticamente impõem maior necessidade de regular o volume às suas células (RII), porque não mantêm a homeostase do líquido extracelular em limites tão estreitos (GILLES & PÉQUEUX, 1981).

Os mecanismos de RII, ou ajuste de volume celular, são altamente conservados e similares entre os tecidos, bem como, entre espécies distintas no processo evolutivo (GILLES, 1988). Com a mudança da osmolalidade do fluido extracelular a célula pode ganhar ou perder água através da membrana plasmática, dependendo da direção e da magnitude do gradiente osmótico. Durante a exposição do animal a um choque hipo-osmótico (= redução de salinidade), havendo diluição do LEC, a célula pode apresentar aumento de volume por entrada de água. Na RII esta célula irá ativar o efluxo de osmólitos, para perder água e retornar ao seu volume original. A restauração acontece devido a um processo chamado de Redução Regulatória de Volume, RVD ("Regulatory Volume Decrease") (DEATON, 1996; MONGIN & ORLOV, 2001). O processo oposto, em ocasião de aumento de salinidade e aumento na concentração do LEC, resulta no acúmulo de osmólitos e aumento de volume celular compensatório, em resposta ao encolhimento inicial, e chama-se Aumento Regulatório de Volume, RVI ("Regulatory Volume Increase") (DEATON, 1996; MONGIN & ORLOV, 2001).

1.3.1 Epitélios Responsáveis Pela Osmorregulação (RAE)

Os epitélios que realizam transporte de sal nos crustáceos osmorreguladores localizam-se essencialmente nas brânquias, no órgão excretor

(glândula antenal ou maxilar) e no intestino (PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2006). O órgão mais atuante na osmorregulação dos crustáceos é o epitélio branquial (PÉQUEUX, 1995). O tecido branquial apresenta diferentes funções, servindo para troca gasosa, transporte de íons, excreção de resíduos nitrogenados e regulação ácido-básica (TAYLOR & TAYLOR, 1992; PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2006). O tecido branquial apresenta diferenciações quando comparado entre diferentes crustáceos. Foram demonstradas diferenças das filobrânquias de camarões paleomonídeos em relação ao padrão básico já descrito para os caranguejos braquiúros (FREIRE et al., 2006). Nos camarões paleomonídeos não há um epitélio mais espesso nas brânquias posteriores para o transporte de sal. Suas lamelas branquiais apresentam um septo intralamelar contínuo que é sustentado por células pilares e preenchido quase que totalmente por mitocôndrias e dobramentos de membrana. O epitélio abaixo da cutícula é sempre bem fino, adequado para as trocas gasosas (FREIRE & McNAMARA, 1995; McNAMARA & LIMA, 1997; McNAMARA & TORRES, 1999). Nos caranguejos braquiúros as brânquias posteriores possuem epitélio espesso com membrana basolateral rica em interdigitações envolvendo abundantes mitocôndrias, e as brânquias anteriores possuem epitélio e cutículas bem finas, para permitir a troca gasosa (PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2006).

Em crustáceos hiper-reguladores, as brânquias são locais de ativa absorção de NaCl, compensando a perda passiva de NaCl em meio diluído (ONKEN & RIESTENPATT, 1988; RATHMAYER & SIEBERS, 2003; FREIRE et al., 2006). Quando caranguejos eurihalinos são transferidos da água do mar para águas de salinidades diminuídas, verifica-se aumento na atividade da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ em brânquias posteriores (LUCU et al, 2003). O mecanismo geral

envolve a participação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ localizada na membrana basolateral e da bomba de H^+ apical, ambas energizando a absorção de sal em baixas salinidades e a próton-ATPase principalmente em água doce. Os canais de Cl^- basolaterais, os canais de Na^+ e os trocadores de Na^+/H^+ e de ânions ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) apicais também participam da absorção de NaCl , assim como a enzima anidrase carbônica intracelular, ao gerar os íons H^+ e HCO_3^- (ONKEN, 1999; FREIRE et al., 2006). A absorção de sal em alguns hiper-reguladores (em baixas salinidades, mas não em água doce) não envolve a presença da próton-ATPase apical, mas sim do cotransportador $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$.

Em crustáceos hipo-reguladores a proteína mais atuante na secreção de sal é a $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ (PÉQUEUX, 1995; RUSSELL, 2000). O co-transportador $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$, quando envolvido na secreção de sal, encontra-se na membrana basolateral, e o fluxo de íons ocorre a favor do gradiente eletroquímico do Na^+ . O Na^+ entra na célula acoplado ao íon K^+ e dois íons Cl^- , em ciclo eletroneutro. O Na^+ sai da célula através da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, o K^+ sai por meio de canais e o Cl^- sai via canais apicais o que, geralmente, promove a saída do Na^+ via paracelular (PÉQUEUX, 1995; MONGIN & ORLOV, 2001; FREIRE et al., 2006).

O sistema excretor nos crustáceos é a glândula antenal ou maxilar, composta por um saco celômico ou saco terminal, um canal excretor de comprimento variável entre as espécies e um pequeno duto de saída abaixo da inserção da segunda antena ou segunda maxila. As paredes do saco celômico apresentam células semelhantes às dos glomérulos de vertebrados e é através delas que ocorre a filtração da hemolinfa para o lúmen do saco terminal. O processamento do filtrado, a secreção seletiva e/ou reabsorção ocorrem dentro do canal excretor (RUPPERT & BARNES, 1996; FREIRE et al., 2006). Há relatos de

aumentos na produção urinária quando crustáceos são expostos a meios mais diluídos, pelo menos em algumas espécies. Embora isso não seja considerado como regra geral, o volume da produção urinária de muitos caranguejos e/ou a taxa de produção urinária aumenta quase de forma linear com a diluição do meio em que se encontra (PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2006). Nos crustáceos osmorreguladores, assim como as brânquias são responsáveis pelo transporte e regulação do sódio e do cloreto, os órgãos excretores são responsáveis pelo transporte e regulação do cálcio - crucial durante o processo de muda para todos os crustáceos - e do magnésio (FREIRE et al., 2006).

1.3.2 Mecanismos de Regulação de Volume Celular

Em resposta ao estresse osmótico as células ou tecidos realizam a restauração do volume celular (via RVD ou RVI) através da liberação ou da captação de osmólitos (inorgânicos e/ou orgânicos) de forma bastante variável entre as espécies (CHAMBERLIN & STRANGE, 1989; HOFFMANN & DUNHAM, 1995; DEATON, 1996; SOUZA & SCEMES, 2000). A resposta observada logo após o choque (~minutos), tanto em RVI quanto em RVD envolve a perda ou ganho de íons inorgânicos pela célula por intermédio de canais, trocadores e/ou co-transportadores. Após um período maior de tempo a regulação de volume celular é dependente, principalmente, da perda ou acúmulo de osmólitos orgânicos (HOFFMANN & DUNHAM, 1995; SOUZA & SCEMES, 2000); dentre estes têm papel extremamente relevante os aminoácidos livres (AAL) (LANG & WALDERGGER, 1997).

As células apresentam estoques intracelulares de AAL e de outros solutos orgânicos utilizados na regulação de volume celular (GILLES, 1977; GOOLISH &

BURTON, 1988). O “pool” de AAL é mantido na célula através de três mecanismos básicos: 1) diferença entre a taxa de síntese e de oxidação destes compostos; 2) mudanças nas taxas de influxo e efluxo através da membrana celular; e 3) alteração do equilíbrio entre a degradação e síntese de proteínas (GILLES, 1977; GILLES & PÉQUEUX, 1981; NEUFELD & WRIGHT, 1996). A concentração iônica celular pode modular a direção da atividade de algumas enzimas que atuam na síntese ou degradação de aminoácidos (GILLES, 1979).

Na redução regulatória de volume – RVD ocorre perda de íons inorgânicos (preferencialmente Na^+ , K^+ , e Cl^-) e de alguns osmólitos orgânicos. Acompanhando a saída dos osmólitos, há a saída da água (GILLES, 1977; PÉQUEUX et al., 1979; SOUZA et al., 2000). Inicialmente, observa-se o decréscimo do conteúdo de K^+ intracelular, limitando o inchaço (GILLES, 1979; GILLES & PÉQUEUX, 1981; HOFFMANN & DUNHAM, 1995; DEATON, 1996). Os osmólitos orgânicos (substâncias positivas a ninidrina e os peptídeos) estão envolvidos tanto com a limitação do inchaço quanto com o reajuste de volume (GILLES & PÉQUEUX, 1981). Diversos transportadores têm sido relatados por seu envolvimento com a RVD, como os canais de Ca^{2+} , K^+ e Cl^- , os co-transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, K^+/H^+ , Na^+/Ca^+ e o co-transporte de Na^+ acoplado a solutos inorgânicos ou HCO_3^- , e também a bomba Na^+/K^+ -ATPase (GILLES, 1979; DEATON, 1996; SOUZA et al., 2000).

Quando o animal é submetido ao choque hiper-osmótico e seu LEC perde água, as suas células murcham devido à perda de água. O volume celular poderá ou não apresentar uma recuperação total através de RVI (GILLES, 1979; DEATON, 1996). Muitos estudos realizados com tecidos isolados de vertebrados e invertebrados detectam a não recuperação total do volume desses após a

desidratação da célula. Assim, a RVI pode ser um processo mais lento e complexo para a célula do que a RVD (KÉVERS et al., 1979). O que se observa é que a resposta típica de muitos invertebrados é um relativo aumento rápido (horas) na concentração intracelular de AAL após o choque (GILLES & PÉQUEUX, 1981; GOOLISH & BURTON, 1988). O estresse hiper-osmótico induz um rápido aumento na degradação de peptídeos séricos, e os AAL gerados são transportados ativamente da hemolinfa para os tecidos (GILLES, 1977; GILLES, 1979). Na maioria das células os transportadores envolvidos com o componente inorgânico da RVI são os co-transportadores K^+-Cl^- e $Na^+-K^+-2Cl^-$ e os trocadores K^+/H^+ , Na^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- (LANG et al., 1988; MOGIN & ORLOV, 2001).

1.4. MODELOS BIOLÓGICOS

As espécies de crustáceos foram escolhidas de forma a representar variadas estratégias de osmorregulação e ambientes distintos, desde o ambiente marinho até o ambiente dulcícola, o que reflete o processo evolutivo neste grupo de invertebrados. Embora as quatro espécies não pertençam a uma mesma família ou linhagem evolutiva, esta seqüência representa a evolução de crustáceos dulcícolas a partir de ancestrais marinhos (FREIRE et al., 2003). As espécies utilizadas neste estudo, seu habitat e algumas informações comportamentais e fisiológicas de cada espécie são fornecidas abaixo, na seqüência do caranguejo marinho, passando pelos camarões estuarino e dulcícola da ambiente próximo ao litoral e finalizando com o caranguejo dulcícola de ambiente distante do litoral.

1.4.1 O caranguejo marinho *Hepatus pudibundus*

O caranguejo *Hepatus pudibundus* Herbst, 1785 (Fig. 1) pertence à Infra-Ordem Brachyura, Super-Família Calappoidea, Família Calappidae, fazendo parte da Sub-Família Matutinae. Este animal pode ser encontrado no Atlântico ocidental (América Central e do Sul); no Brasil (do Amapá ao Rio Grande do Sul) e no Atlântico oriental (costa oeste africana). São animais que habitam, preferencialmente, fundos lamosos, arenosos e de conchas, de águas rasas até 160 metros. Em sua carapaça é comum encontrarem-se anêmonas e cirripédios (cracas), o que foi observado em alguns exemplares utilizados neste trabalho (MELO, 1996). Esta espécie foi escolhida como um dos modelos biológicos por ser marinha e, provavelmente, osmoconformadora e estenohalina. Não foram encontrados relatos sobre a fisiologia da osmorregulação desta espécie.



Figura 1. Exemplar do caranguejo marinho *Hepatus pudibundus*. Carapaça com aproximadamente 6 cm no seu maior diâmetro.

1.4.2 Os camarões *Palaemon pandaliformis* (estuarino) e *Macrobrachium acanthurus* (dulcícola, próximo do litoral)

Os camarões decápodes da família Palaemonidae (Infra-Ordem Caridea, Sub-Família Palaemoninae) incluem muitas espécies de águas rasas marinhas e salobras, tanto em regiões tropicais como temperadas, e há espécies de água

doce que podem habitar rios, córregos e lagoas (RUPPERT & BARNES, 1996). As espécies de água marinha e salobra apresentam em geral boa capacidade osmorregulatória (KIRKPATRICK & JONES, 1985; FREIRE et al., 2003). Diferentes estudos mostram que as espécies que invadiram com sucesso a água doce tinham como ancestrais animais de habitat marinho com alto grau de adaptação em meio com baixa salinidade (FREIRE et al.,2003). A população estudada da espécie *Palaemon pandaliformis* Stimpson, 1871 (Fig. 2) é encontrada em estuário com salinidade 3‰ a 29‰, mas na maior parte do tempo entre 8 e 10‰ devido aos movimentos da maré. A espécie foi escolhida como um dos modelos biológicos deste trabalho por ser residente no estuário (TEIXEIRA & SÁ, 1998; FREIRE et al., 2003), apresentar excelente capacidade osmorregulatória, sendo bastante eurihalina (FREIRE et al.,2003).



Figura 2. Exemplar do camarão estuarino *Palaemon pandaliformis*.

A outra espécie de camarão palemonídeo, *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836 (Fig. 3), é encontrada em água doce. A espécie foi escolhida por ser capaz de osmorregular em água doce e baixas salinidades (MOREIRA et al, 1983; BRAILOVSKY & GALERA, 1997). Habita água doce próxima ao litoral pois suas larvas dependem de água salobra para seu desenvolvimento, podendo

habitar regiões estuarinas de baixa salinidade (McNAMARA, 1987; TEIXEIRA & SÁ, 1998).



Figura 3. Exemplar de camarão dulcícola *Macrobrachium acanthurus*. Comprimento total de aproximadamente 8 cm.

1.4.3 O caranguejo dulcícola *Dilocarcinus pagei*

O *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 pertence à Infra-Ordem Brachyura, Super-Família Potamoidea, Família Trichodactylidae) (Fig. 4). É um decápode de água doce, também conhecido como caranguejo vermelho, nativo das bacias Amazônica e Paraguai/baixo Paraná, também sendo observado a sua presença nos estados de São Paulo e Paraná (bacia do rio Paranapanema) (ONKEN & McNAMARA, 2002). A espécie é abundante, porém há poucos estudos sobre sua capacidade osmorregulatória. Apesar de estritamente dulcícola (hololimnético), este caranguejo é razoavelmente eurihalino, e tem a capacidade de regular a osmolalidade do seu LEC em salinidades até 20‰ (AUGUSTO & McNAMARA, 2002). Contudo, outro estudo mostrou que a espécie em salinidade de 15‰ não manteve a osmolalidade da hemolinfa constante, ocorrendo mudanças nas primeiras 24h de exposição (AMADO et al., 2006). Este caranguejo também foi

escolhido como modelo biológico para este estudo por ser uma espécie de água doce que habita rios em locais distantes do litoral, não possuindo nenhuma dependência da água salina.



Figura 4. Exemplar do caranguejo vermelho *Dilocarcinus pagei*; carapaça com aproximadamente 5 cm de maior diâmetro. Fotografia de Horst Onken.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Confrontar a capacidade de regulação osmótica e iônica (regulação anisomótica extracelular – RAE, homeostase osmótica extracelular) com a manutenção do teor hídrico no tecido muscular e branquial nas quatro espécies escolhidas (*Hepatus pudibundus*, *Palaemon pandaliformis*, *Macrobrachium acanthurus* e *Dilocarcinus pagei*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a regulação anisomótica extracelular (RAE) para as quatro espécies escolhidas em condições de estresse salino;
2. Avaliar o curso temporal das concentrações da hemolinfa e do teor hídrico dos tecidos muscular e branquial das quatro espécies diante do estresse salino;

3. Estabelecer a relevância das substâncias positivas a ninidrina (SPN) para a manutenção do teor hídrico do tecido muscular das espécies estudadas, diante do estresse salino;
4. Concluir se as espécies que apresentam menor capacidade osmorregulatória do líquido extracelular (RAE) apresentam maior capacidade de regular o teor hídrico do seu tecido muscular (reflexo da RII).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA

O caranguejo *Hepatus pudibundus*, com aproximadamente 6 cm de comprimento, foi coletado na praia de Ipanema, Pontal do Paraná, Paraná (PR) (25° 34'S, 48° 21'W). A coleta foi feita com os pescadores, quando estes chegavam à praia, após o arrasto de camarão. A espécie é rejeito de pesca. O camarão *Palaemon pandaliformis*, de 2,5 a 4 cm, espécie estuarina, foi coletado no estuário do rio Perequê (8–24%), Pontal do Paraná, Paraná (PR) (25° 34'S, 48° 21'W). O camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* de 6 a 8 cm foi comprado de moradores de Pontal do Paraná, Paraná (PR) (25° 34'S, 48° 21'W) que os coletam no rio da Draga (no município de Pontal do Paraná, Estado do Paraná, Brasil) e revendem como “isca viva” para a pescaria. O caranguejo *Dilocarcinus pagei*, de 4 a 5 cm de largura de carapaça, foi coletado na Fazenda Doralice, localizada no município de Ibiporã, Norte do Paraná, nas coordenadas 23° 16'S e 51° 03'W, a 484m de altitude, e que tem como proprietário o Sr Pedro

Favoreto. Os animais foram encontrados em tanques, que tinham como finalidade a piscicultura, porém estão em desuso, e são ambientes lânticos abastecidos com água de poços da própria fazenda. Os animais foram coletados com o auxílio de uma malha fina ou mesmo com as mãos, durante a noite. A coleta destas espécies para este trabalho conta com a permissão do IBAMA (Autorização nº 010/2005).

Todos os animais foram acondicionados em galões de plástico, com aeração constante e transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação na Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná. Exceto o *D. pagei*, que foi transportado para o Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná. Os experimentos feitos com essa espécie também foram realizados na Universidade Estadual de Londrina.

Ao chegar no laboratório, em Curitiba ou Londrina, os animais foram mantidos em aclimatação em aquários ou tanques com água e temperatura entre 20 e 25° C. A aeração da água foi constante, a salinidade adequada ao local de coleta de cada espécie e a alimentação fornecida em dias alternados, sendo constituída de carne bovina moída ou fragmentos de filé de tilápia. A água era trocada em dias alternados, ou conforme a necessidade. O tempo médio de aclimatação às condições de laboratório foi de pelo menos uma semana.

3.2. EXPERIMENTOS

Os animais dos grupos controles foram retirados dos aquários de aclimação. O caranguejo marinho *H. pudibundus* ficou em aquário estoque de salinidade 33‰; o camarão de estuário *P. pandaliformis* em salinidade 12‰; o camarão *M. acanthurus* e o caranguejo *D. pagei* foram mantidos em água doce (< 0,5‰). Após o período de aclimação às condições de laboratório nas salinidades controles, exemplares de cada espécie foram expostos ao estresse salino por até 24h. A salinidade experimental foi diferente para cada espécie. A salinidade controle e experimental e os tempos experimentais para cada espécie estão mostrados na Tabela 1. A salinidade das águas foi medida e mantida constante com o uso do salinômetro refratômetro S-28 (Shibuya). As águas experimentais foram preparadas a partir de água do mar 33‰. As águas 2‰, 7‰, 12‰, 25‰ e 30‰ foram preparadas usando água doce (da torneira) filtrada. A água 35‰ foi preparada com o primeiro degelo da água do mar congelada. As concentrações iônicas, bem como da osmolalidade das águas experimentais são mostradas na Tabela 2. Os valores foram calculados baseando-se nos valores de água 34.33 ‰, fornecidos por PROSSER (1973).

Tabela 1. Salinidade controle e experimental (estresse salino) e tempos experimentais adotados para cada espécie.

Espécie	Salinidade Controle	Salinidade experimental	Tempos Experimentais (h)
Hepatus pudibundus	33 ‰	25 ‰	0,5; 1; 2; 6; 16
<i>Palaemon pandaliformis</i>	12 ‰	2 e 35 ‰	0,5; 1; 2; 6; 17
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	< 0,5 ‰	30 ‰	0,5; 1; 2; 6; 12; 16 a 24*
<i>Dilocarcinus pagei</i>	< 0,5 ‰	7 ‰	0,5; 1; 2; 6; 24

* Após 16 h de exposição a esta salinidade os camarões já apresentavam morbidade. Como alguns exemplares sobreviveram 24 h, foram todos reunidos em um único grupo experimental.

Tabela 2. Osmolalidade e concentração dos íons nas salinidades adotadas (‰) para as várias espécies utilizadas.

	35‰	33‰	30‰	25‰	12‰	7‰	2‰
[Osm] mOsm/kg H ₂ O	1050	990	900	750	360	210	60
[Na ⁺] mM	479,4	452	410,9	342,4	164,4	95,9	27,4
[Cl ⁻] mM	558,7	527	479,1	399,3	191,7	111,9	32
[Mg ²⁺] mM	54,6	51,5	46,8	39	18,7	10,9	3,1
[Ca ²⁺] mM	10,4	9,8	8,9	7,4	3,6	2,1	0,6

Para cada grupo controle e experimental foram usados de 5 a 10 animais, sendo que para a maioria dos grupos o número de animais (n) foi igual a 6. A variação aconteceu devido ao número de animais que foram conseguidos durante as coletas. *P. pandaliformis* foi uma exceção. Por seu pequeno porte, cada amostra de hemolinfa e de tecido muscular era um “pool” de 4 animais. As amostras dos animais controles foram obtidas após o período de aclimação às condições de laboratório. As amostras dos animais experimentais foram obtidas de animais submetidos ao estresse salino por período variável de tempo, conforma indica a Tabela 1. Os animais experimentais foram normalmente submetidos à salinidade experimental em recipientes individuais, raramente em duplas. Os espécimes destinados a um mesmo grupo experimental ou controle jamais foram processados em um mesmo dia. Houve aleatorização dos horários experimentais e da época do ano.

3.3. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE HEMOLINFA E DE TECIDOS

Os camarões foram anestesiados em gelo e a corda nervosa ventral foi seccionada entre a região do cefalotórax e do abdômen. Alíquotas de hemolinfa foram retiradas com auxílio de micropipeta regulável (P10 - 100µl) do coração,

inserindo-se a ponteira na junção do cefalotórax com o abdômen. Nos caranguejos, após a crioanestesia, a hemolinfa foi retirada com o auxílio de uma seringa (10ml), por punção através da membrana artrodial de um dos pereópodos. As amostras de hemolinfa foram em seguida congeladas a -20° C até serem feitas as dosagens das concentrações iônicas e de osmolalidade.

Após a obtenção da hemolinfa, retirou-se o tecido muscular com o auxílio de tesouras e pinças. Nos camarões o tecido muscular retirado foi o da região abdominal e nos caranguejos o músculo peniforme das quelas direita e esquerda. As filobrânquias destes decápodes também foram retiradas, com exceção do *P. pandaliformis*, devido ao pequeno porte dos representantes desta espécie. Parte do tecido muscular foi usado para a avaliação do teor hídrico e a outra parte foi armazenada a -20° C para as análises do teor de substâncias positivas a ninidrina (SPN). Do tecido branquial foram feitas apenas análises do teor hídrico.

3.3.1 Dosagem das concentrações osmótica e iônica da hemolinfa

A osmolalidade da hemolinfa foi medida diretamente em micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor VAPRO modelo 5520, em amostras não diluídas. Para as dosagens iônicas, as amostras precisaram ser devidamente diluídas, de forma a situarem-se na faixa de leitura dos métodos. Para a dosagem do teor iônico de sódio (Na^+), alíquotas da hemolinfa foram diluídas (1:200) e determinadas em fotômetro de chama (Analiser – 900). As concentrações dos íons cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) foram determinadas por métodos colorimétricos, utilizando-se kits Labtest. Todas as amostras foram diluídas conforme o protocolo dos fabricantes e a leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech. A

diluição ideal foi conhecida através de testes, cuidando-se para que a leitura das amostras permanecesse na faixa de linearidade de cada dosagem iônica. Os íons cloreto reagem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico, com leitura de absorvância a 470 nm. Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, com leitura de absorvância a 505 nm. Os íons cálcio formam um complexo corado com cresolftaleína em meio alcalino, com leitura de absorvância a 570 nm.

3.3.2 Dosagem do teor hídrico no tecido muscular e branquial e do teor de substâncias positivas a ninidrina (SPN) no tecido muscular

O teor hídrico (%) foi medido no tecido muscular e branquial de animais expostos às condições controle e salinidades experimentais por tempos determinados. As amostras de tecido muscular e branquial foram pesadas logo após a dissecação, obtendo-se assim o peso úmido do fragemento (Pu). As mesmas foram levadas a estufa a 60° C, por no mínimo 24 h, sendo novamente pesadas para a obtenção do peso seco (Ps). O teor de hidratação do tecido foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Th (\%)} = \frac{(\text{Pu} - \text{Ps})}{\text{Pu}} \times 100$$

A concentração de SPN foi determinada através do método colorimétrico adaptado de Clark (1968) (AMADO et al., 2006). Para cada espécie foi usada uma diluição, ficando esta entre 1:40 e 1:70 (massa:volume de água deionizada). O fragmento de tecido foi transferido para o homogenizador com a quantidade de

água deionizada proposta pela diluição, sendo macerado com um bastão de vidro. Do volume total de homogenizado foi retirada alíquota de 0,5 ml e este volume transferido para um tubo “ependorf”, o qual recebeu em seguida 1,25 ml de etanol 95%. Após alguns minutos, após a formação de precipitado floculento, a amostra foi levada para centrifugação por aproximadamente 1 min a 2.100xg. O sobrenadante era então retirado para ser usado para a reação de SPN. Tubos de ensaio recebiam 0,5 ml do volume do sobrenadante da amostra centrifugada, 0,25 ml de tampão citrato (CLARK, 1968) e 0,6 ml de reagente de ninidrina. Para preparar 12 ml de reagente de uso de ninidrina utilizava-se 1ml de solução estoque de ninidrina (solução saturada de ninidrina em etileno glicol), mais 0,4 ml de ácido ascórbico 1% e 10,6 ml etileno glicol. Os padrões foram preparados com o aminoácido glicina em concentração variando de 10 a 50 µg/ml. Esse aminoácido foi escolhido como padrão por ser o de maior concentração no músculo do camarão de água doce, *Macrobrachium olfersii* (AUGUSTO, 2000). Os tubos com as amostras, padrões e branco foram levados a banho-maria a 100° C por 20 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente por 5 min, adicionou-se 1,5 ml de etanol 60% a cada amostra. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech (570 nm).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados foram expressos nos gráficos como média ± erro padrão da média. Foram feitas análises de variância (ANOVA) de uma via para avaliar o efeito do tempo de exposição à salinidade experimental sobre cada parâmetro. O teste *post hoc* utilizado foi o de Tukey, para localizar as diferenças

significativas. Quando os dados não atendiam ao pré-requisito de normalidade e homogeneidade de variâncias, o programa estatístico (Sigma Stat para Windows, SPSS v. 2.0) automaticamente fazia o teste de Dunn's. O limite de significância para identificar diferenças entre grupos foi sempre de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. *Hepatus pudibundus*

A osmolalidade ([Osm]) da hemolinfa de *H. pudibundus* em situação controle foi de 962 ± 13 mOsm / kg H₂O, praticamente isosmótica à [Osm] do meio em que se encontrava, água do mar 33‰. Houve decréscimo em resposta ao choque hipo-osmótico (25‰), após 2h (Fig. 5A). Após 2h a hemolinfa estava isosmótica à água experimental (747 mOsm/kg H₂O) e após 6h a hemolinfa estava hipo-osmótica (684 ± 5 mOsm/kg H₂O) (Fig. 5A).

A concentração de sódio na hemolinfa dos animais expostos à salinidade reduzida apresentou o mesmo padrão da osmolalidade (Fig. 5B). Na hemolinfa dos animais controle o teor de Na⁺ foi de 426 ± 16 mM, verificando-se queda na concentração de Na⁺ após 1h de exposição ao choque hipo-osmótico. Novamente os animais do grupo de 6h apresentaram as maiores alterações, a concentração de Na⁺ decresceu para 331 ± 5 mM (Fig. 5B). Apesar do decréscimo relatado para a osmolalidade e Na⁺, não houve alterações na [Cl⁻] (Fig. 5B). Nos animais controle a concentração foi de 414 ± 16 mM e no grupo exposto por 6 h, o que apresentou o teor mais baixo, foi de 344 ± 17 mM (Fig. 5B), porém a redução não foi significativa.

A concentração de Mg^{2+} na hemolinfa da espécie é bastante alta. No grupo controle o valor de Mg^{2+} foi de 62 ± 3 mM, tendo um decréscimo na concentração a partir de 2 h de exposição (49 ± 3 mM) (Fig. 5C). Como observado para a [Osm] e da $[Na^+]$, os animais expostos por 6 h tiveram a menor concentração: 40 ± 08 mM (Fig. 5C). O íon Ca^{2+} na hemolinfa do *H.pudibundus* foi reduzido pela exposição ao meio diluído, diminuindo de 18 ± 1 mM nos controles em água do mar para $15 \pm 1,7$ após 0,5h (Fig. 5C), e novamente o valor mínimo após 6h: $10 \pm 0,5$ mM (Fig. 5C).

Nos tecidos, muscular e branquial, as dosagens de teor hídrico não mostraram nenhuma diferença durante a exposição dos animais à salinidade reduzida (Fig. 6A e 6B). A porcentagem de água no tecido muscular do grupo controle foi de 75 ± 2 % e de 77 ± 3 % no grupo exposto por 16h (Fig. 6A). No tecido branquial o grupo controle apresentou um teor hídrico de 87 ± 2 % e o grupo exposto por 16h à água 25‰ $89 \pm 0,4$ % (Fig. 6B). Quanto ao teor de osmólitos orgânicos positivos à ninidrina (SPN) dosados no tecido muscular, verificou-se um decréscimo durante a exposição dos animais ao choque hiposmótico. Os animais que apresentaram maiores alterações na [Osm] na hemolinfa foram os que apresentaram diminuição de osmólitos orgânicos no seu tecido muscular (Fig. 6C). No grupo controle o teor de SPN foi de $7 \pm 0,4$ $\mu g / g$ de peso úmido (pu); nos animais expostos por 6 horas a água 25‰ a concentração diminuiu para $4 \pm 0,4$ $\mu g / g$ pu (Fig. 6C).

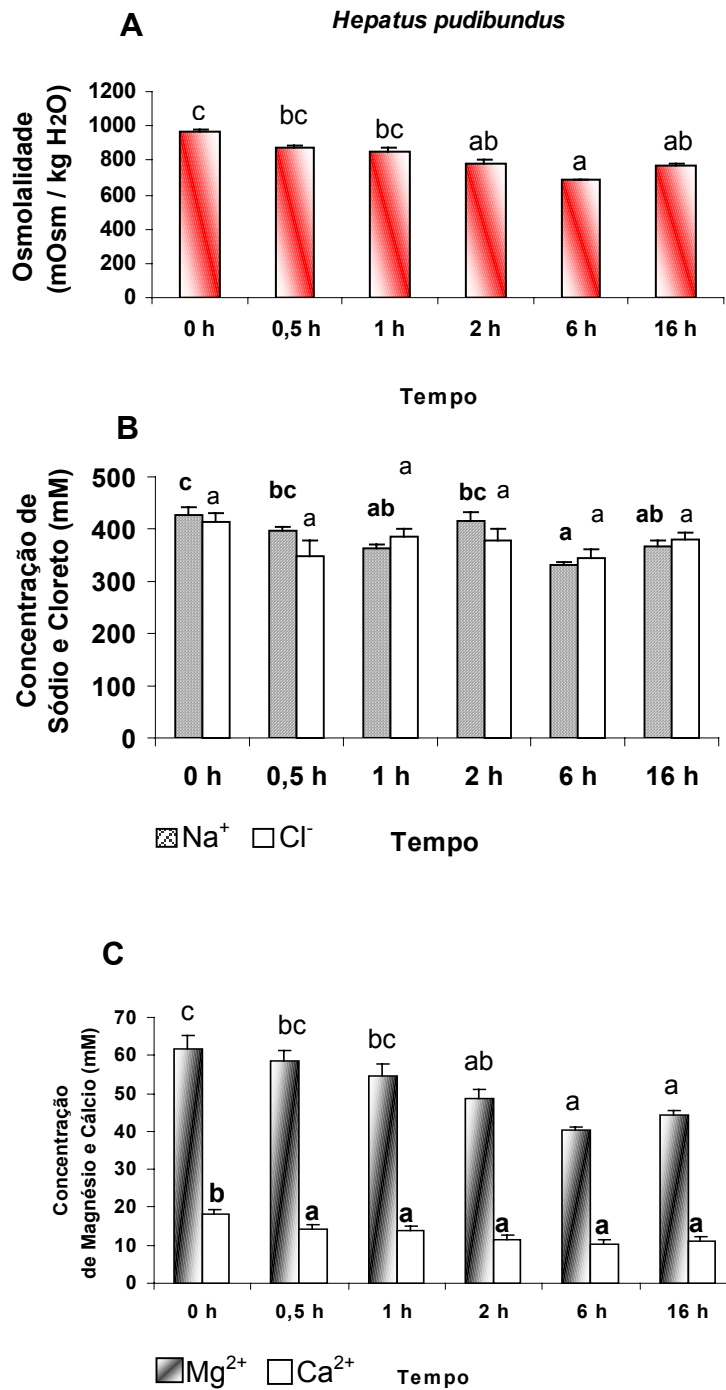


Figura 5: Osmolalidade (A), concentração de Na⁺ e Cl⁻ (B) e concentração de Mg²⁺ e Ca²⁺ (C) da hemolinfa de *Hepatus pudibundus* em situação controle (salinidade 33 ‰, 0 h) e em até 16 h de exposição à salinidade experimental (25 ‰). Barras com letras em comum de cada variável experimental não são estatisticamente diferentes.

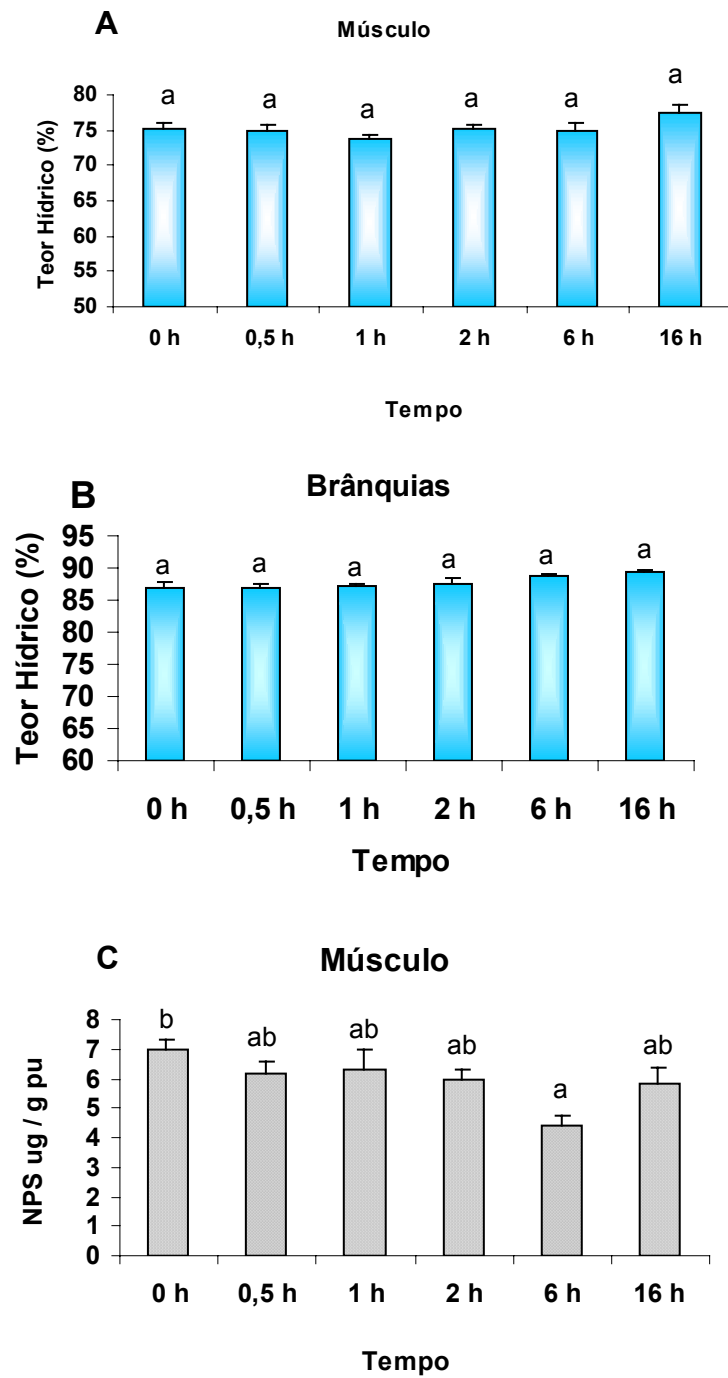


FIGURA 6: Teor hídrico do músculo (A) e das brânquias (B) e concentração de SPN muscular (C) de *Hepatus pudibundus* em situação controle (salinidade 33 ‰, 0 h) e em até 16 h de exposição à salinidade experimental (25 ‰). Barras com letras em comum não são estatisticamente diferentes.

4.2. *Palaemon pandaliformis*

A [Osm] da hemolinfa do *P. pandaliformis* foi de 423 ± 19 mOsm/kg H₂O, nos animais mantidos na salinidade controle, 12‰ (Fig. 7A). Os animais expostos ao choque hip-osmótico (2‰) apresentaram comportamento bifásico, a [Osm] decresceu em alguns tempos experimentais, noutros foi semelhante ao grupo controle (Fig 7A). O maior decréscimo foi no grupo exposto por 17h, 241 ± 36 mOsm / kg H₂O (Fig. 7A). A concentração de Cl⁻ ([Cl⁻]) na hemolinfa seguiu o mesmo padrão da [Osm], também foi no grupo exposto por 17h detectada a menor concentração: 71 ± 16 mM. No grupo controle a concentração foi de 136 ± 7 mM (Fig.7B). Os resultados de teor hídrico no tecido muscular não mostraram diferenças durante o tempo de exposição ao choque hip-osmótico (Fig 8A). No grupo controle a porcentagem de água foi $79 \pm 2\%$ e no grupo exposto por 17h, com as menores concentrações da hemolinfa, obteve-se $81 \pm 0,3\%$ (Fig. 8A). Quanto à concentração de substâncias positivas a ninidrina (SPN) houve bastante variação dentro dos grupos temporais com decréscimo significativo apenas após 17h ($2,6 \pm 0,3$ µg / g pu), em relação ao controle em 12‰ ($6,0 \pm 0,6$ µg / g pu) (Fig. 8B).

A [Osm] na hemolinfa dos animais submetidos ao choque hiper-osmótico (35‰) aumentou após 0,5h (Fig. 7C). No entanto, os animais mantêm a hemolinfa hip-osmótica a água (966 mOsm / kg H₂O) pois, no grupo exposto por 0,5h a [Osm] foi de 618 ± 24 mOsm / kg H₂O (Fig. 7C). A [Cl⁻] na hemolinfa também foi hip-regulada (Fig. 7D). O grupo com a maior concentração de cloreto após 6h, apresentou concentração de 260 ± 20 mM (Fig. 7D). No tecido

muscular verificou-se queda no teor hídrico a concentração de água nos animais expostos por 6h ($76 \pm 1\%$) quando comparado com o grupo controle $79 \pm 0,6\%$ (Fig. 8C). A concentração de SPN muscular dos camarões em 35‰ (Fig. 8D) também oscilou bastante, como nos camarões submetidos a 2‰ (Fig. 8B). No grupo controle a concentração foi de $6 \pm 0,6 \mu\text{g} / \text{g pu}$, chegando a $2 \pm 0,3 \mu\text{g} / \text{g pu}$ nos animais expostos por 6h (Fig. 8D).

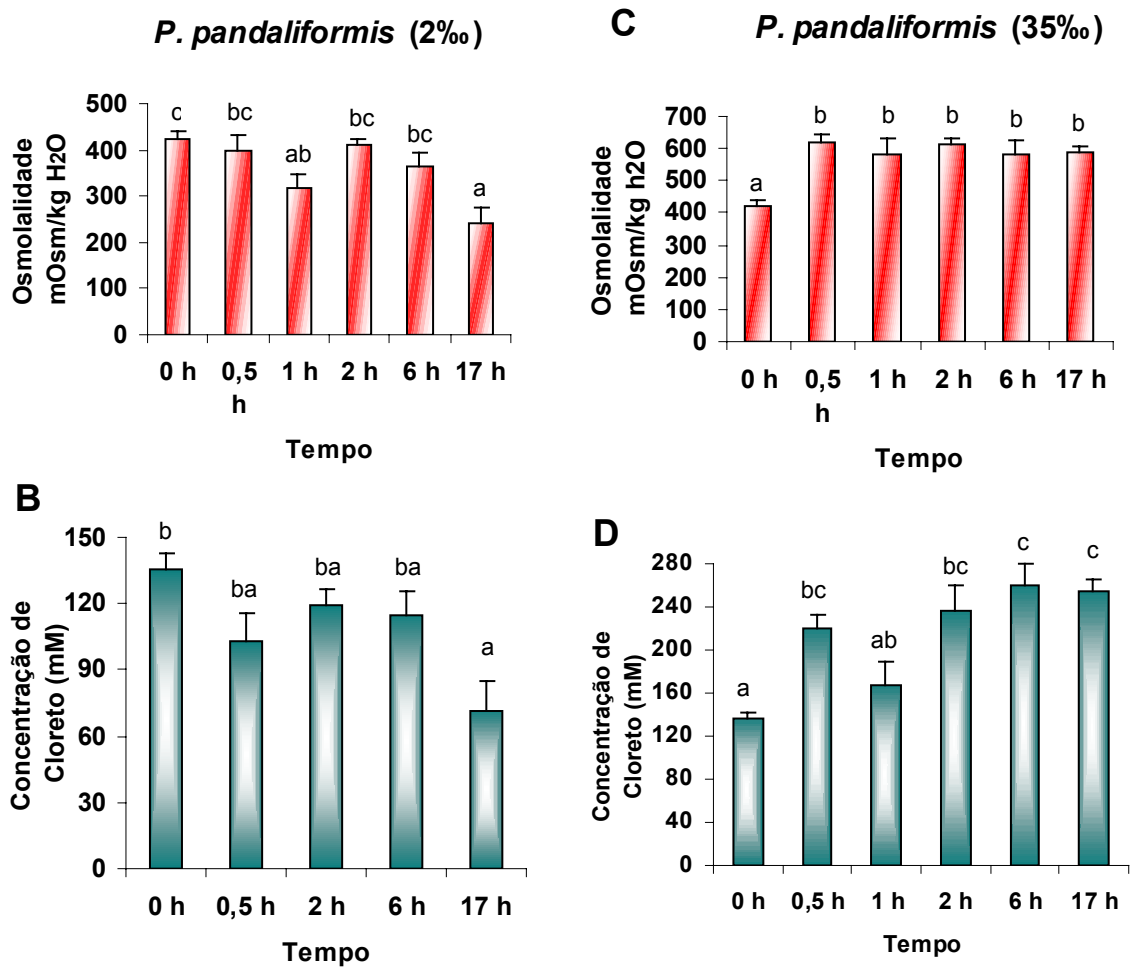


Figura 7. Osmolalidade (A) e concentração de Cl⁻ (B) em situação controle (salinidade 12‰, 0h) e em até 17h de exposição à salinidade experimental (2‰). Osmolalidade (C) e concentração de Cl⁻ (D) em situação controle (salinidade 12‰, 0h) e em até 17h de exposição à salinidade experimental (35‰). Barras com letras em comum não são estatisticamente diferentes.

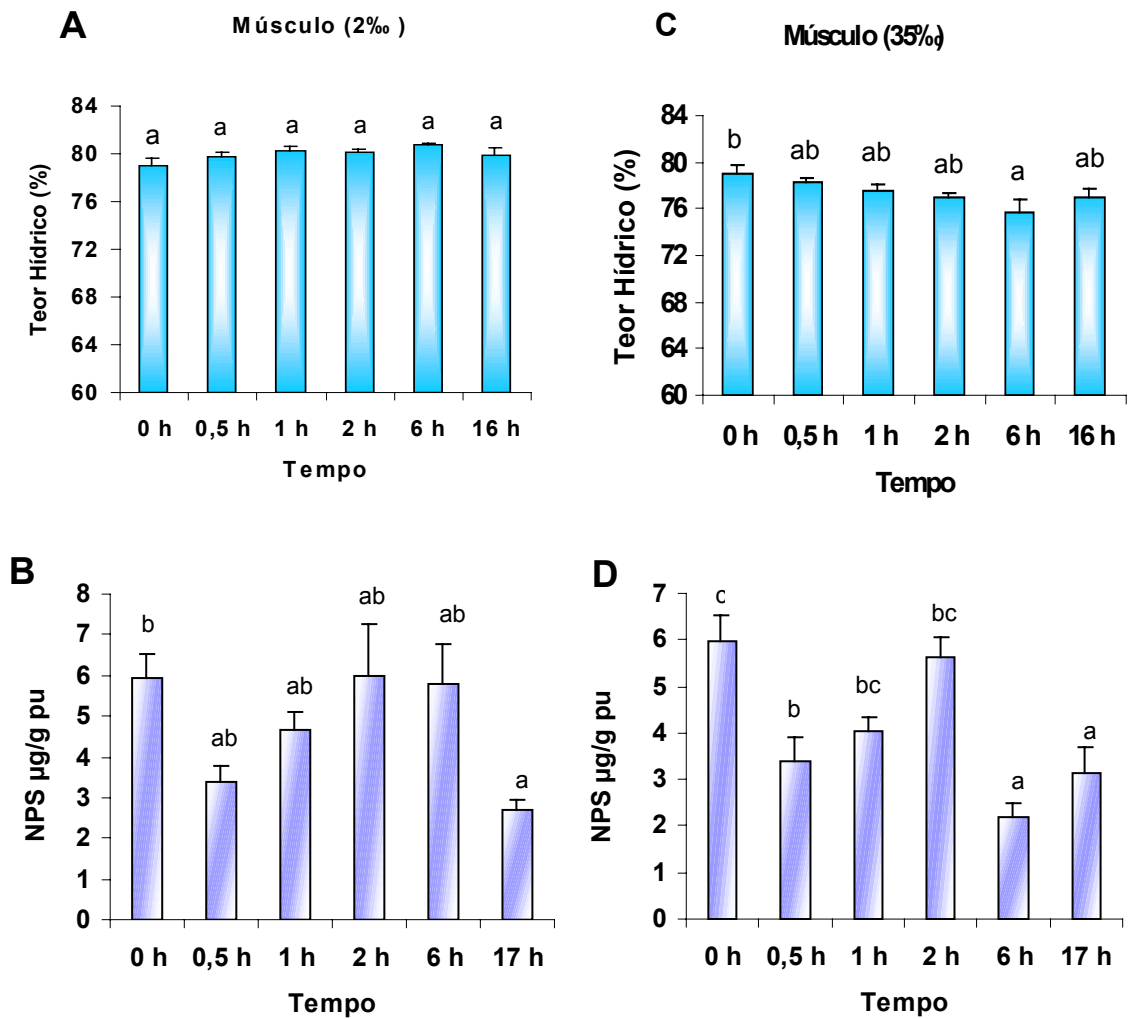


Figura 8. Teor hídrico do músculo (A) e concentração de SPN muscular (B) em situação controle (salinidade 12‰, 0h) e em até 17h de exposição à salinidade experimental (2‰). Teor hídrico do músculo (C) e concentração de SPN muscular (D) em situação controle (salinidade 12‰, 0h) e em até 17h de exposição à salinidade experimental (35‰). Barras com letras em comum não são estatisticamente diferentes.

4.3. *Macrobrachium acanthurus*

A [Osm] na hemolinfa de *M. acanthurus* foi de 378 ± 17 mOsm / kg H₂O em água doce (< 0,5 ‰). Os animais mantidos por mais de 2h na salinidade experimental (30‰) não conseguiram mantê-la constante (Fig. 9A). O grupo exposto por mais de 16h apresentou a [Osm] na hemolinfa de 806 ± 24 mOsm / kg H₂O, praticamente isosmótica a água do meio (896 mOsm / kg H₂O), um aumento de 213% em relação ao controle (Fig. 9A). As concentrações de Na⁺ e Cl⁻ ([Na⁺] e [Cl⁻]) apresentaram o mesmo padrão da [Osm] na hemolinfa (Fig. 9B). No grupo controle a [Na⁺] foi de 190 ± 9 mM, chegando a 405 ± 10 mM nos animais expostos por mais de 16h ao choque hiper-osmótico, um aumento também de 213% em relação ao controle (Fig. 9B). A [Cl⁻] aumentou a partir do grupo exposto por 6h, apresentando a maior concentração no grupo exposto por mais de 16h (Fig. 9B). Nos animais controle a concentração foi de 148 ± 4 mM, atingindo 388 ± 11 mM no grupo com maior concentração. Este aumento foi de 263% em relação ao controle (Fig. 9B). Houve também aumento nas concentrações dos íons Mg²⁺ e Ca²⁺ da hemolinfa (Fig. 9C). No grupo controle a [Mg²⁺] foi de $2 \pm 0,2$ mM e aumentou nos grupos expostos por 6 h ou mais chegando a 9 ± 1 mM após 12h (Fig. 9C). O maior aumento na [Ca²⁺] foi detectado no grupo exposto por 16 horas ($15 \pm 0,8$ mM); nos animais controle a concentração foi de $9 \pm 0,6$ mM (Fig. 9C).

As alterações nas concentrações da hemolinfa provocaram alterações no teor hídrico do tecido muscular (Fig. 10A). Nos animais controle o teor hídrico foi de $79 \pm 0,5\%$, decrescendo para $73 \pm 0,4\%$ no grupo de 12h exposto ao choque hiper-osmótico (Fig. 10A). Como ocorreu com os íons na hemolinfa o decréscimo de água iniciou-se no grupo exposto por 6h (Fig. 10A). Não ocorreram alterações no

teor hídrico do tecido branquial (Fig 10B). As células musculares apresentaram aumento de SPN nos camarões expostos à salinidade experimental, após 2h de exposição (Fig. 10C). A concentração destes osmólitos orgânicos no grupo controle foi de $5 \pm 0,2 \mu\text{g} / \text{g pu}$ e nos animais com maior concentração, os expostos por mais de 16 horas, foi de $8 \pm 0,5 \mu\text{g} / \text{g pu}$ (Fig. 10C).

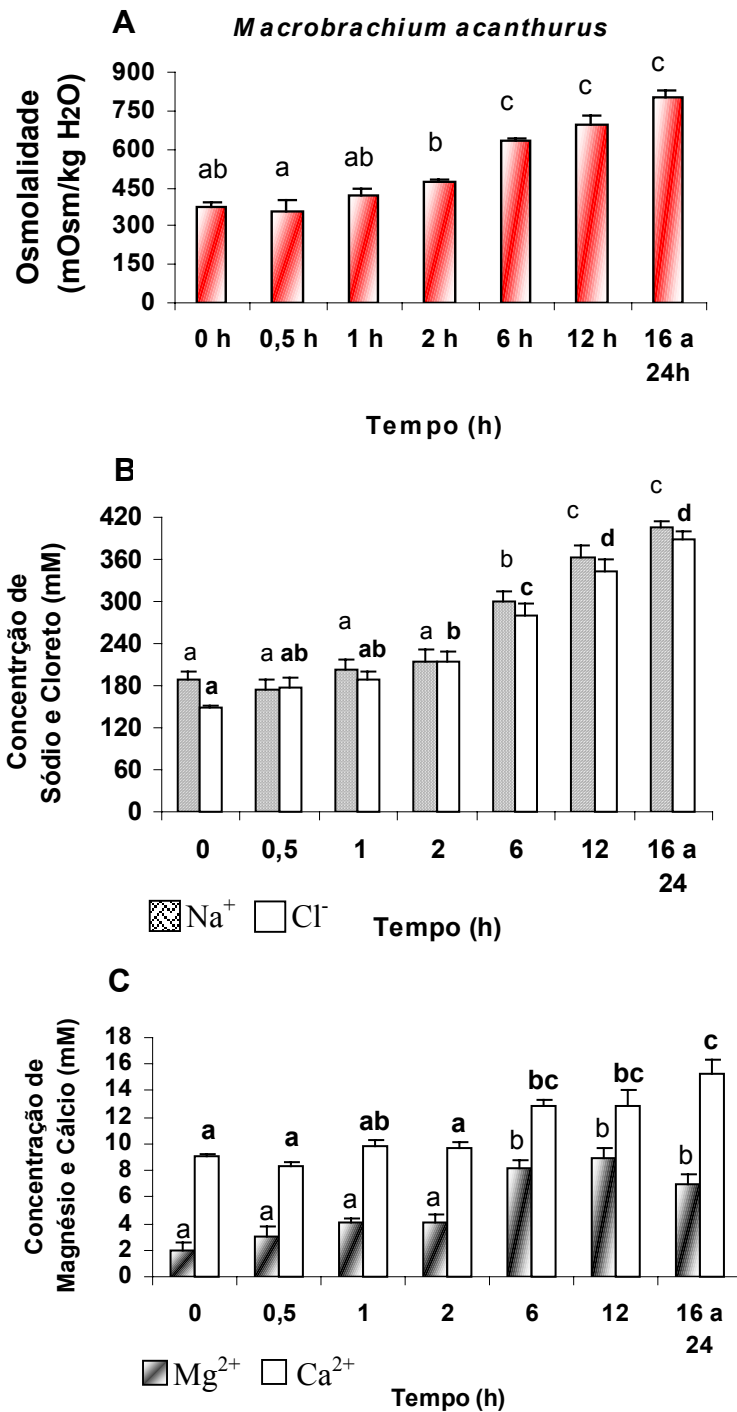


Figura 9. Osmolalidade (A) concentração de Na⁺ e Cl⁻ (B) e concentração de Mg²⁺ e Ca²⁺ da hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* em situação controle (salinidade < 0,5 ‰, 0h) e em até 24h de exposição à salinidade experimental (30‰). Barras com letras em comum, em cada variável experimental, não são estatisticamente diferentes.

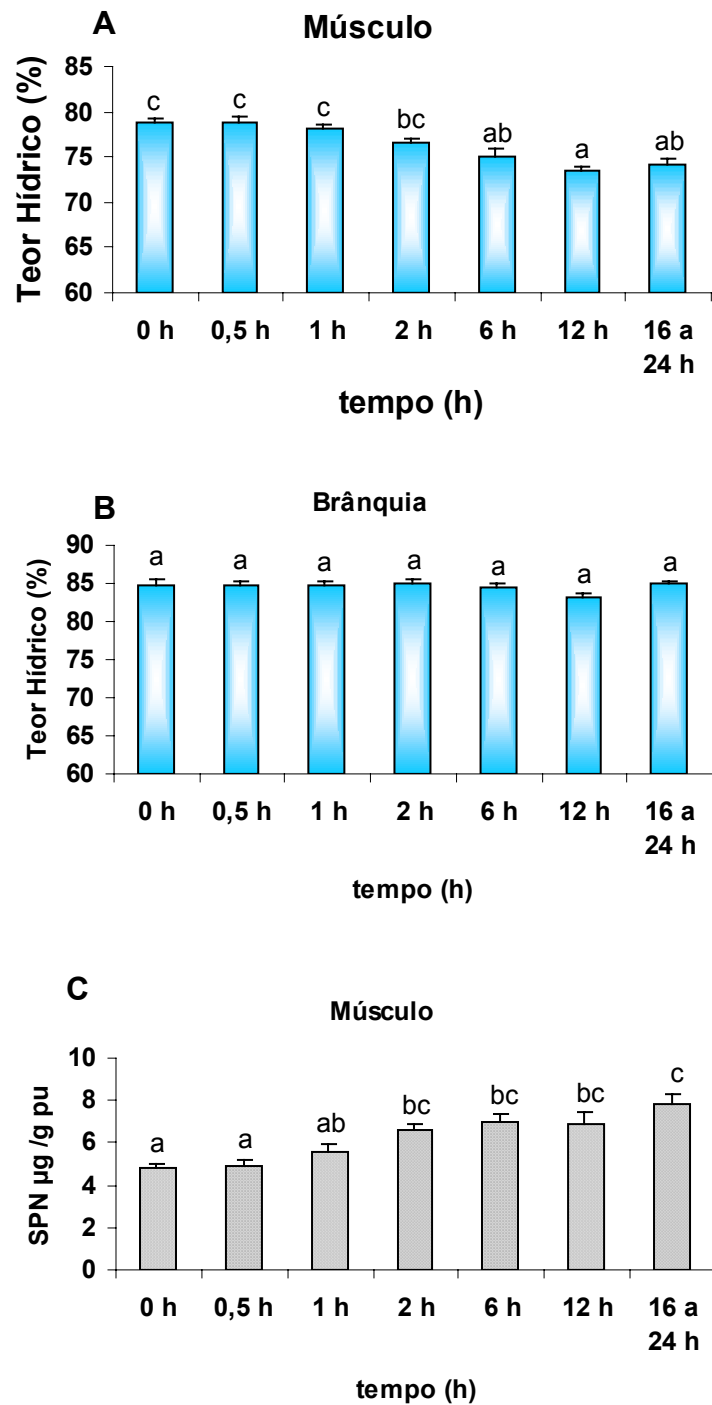


Figura 10. Teor hídrico do músculo (A) e das brânquias (B) e teor de SPN muscular (C) de *Macrobrachium acanthurus* em situação controle (salinidade < 0,5‰, 0h) e em até 24h de exposição à salinidade experimental (30‰). Barras com letras em comum não são estatisticamente diferentes.

4.4. *Dilocarcinus pagei*

A [Osm] na hemolinfa do *D. pagei* foi de 328 ± 17 mOsm / kg H₂O, quando em água doce (< 0,5‰). Não houve alterações em resposta ao choque hiperosmótico (7‰) (Fig. 11A). As concentrações de Na⁺ e Cl⁻ seguiram o mesmo padrão da [Osm] na hemolinfa, ou seja, não aconteceram alterações significativas (Fig. 11B). A concentração de Mg²⁺ foi diferente entre os grupos experimentais. A concentração nos animais expostos à salinidade experimental por 0,5h foi de $4,8 \pm 0,3$ mM, mas quando comparado com os animais expostos por 1h e 2h verificou-se decréscimo ($3,5 \pm 0,3$; $3,5 \pm 0,2$ mM, respectivamente), ficando próximo do teor do grupo controle, $3,8 \pm 0,2$ mM (Fig. 11C). A concentração de Ca²⁺ não foi alterada durante o curso temporal avaliado (Fig. 11C).

No tecido muscular as dosagens de teor hídrico não mostraram nenhuma diferença durante o tempo de exposição (Fig. 12A). No tecido branquial, detectaram-se alterações nos animais expostos por 6 horas, $90 \pm 0,5\%$, enquanto que no grupo controle o teor hídrico foi de $92 \pm 0,2\%$ (Fig. 12B). A concentração de SPN no grupo controle foi de $2,8 \pm 0,3$ µg / g pu, verificando-se aumento a partir de 1h na salinidade experimental, $3,9 \pm 0,3$ µg / g pu. Após 6h foi detectada a maior concentração de SPN: $4,7 \pm 0,2$ µg / g pu (Fig. 12C).

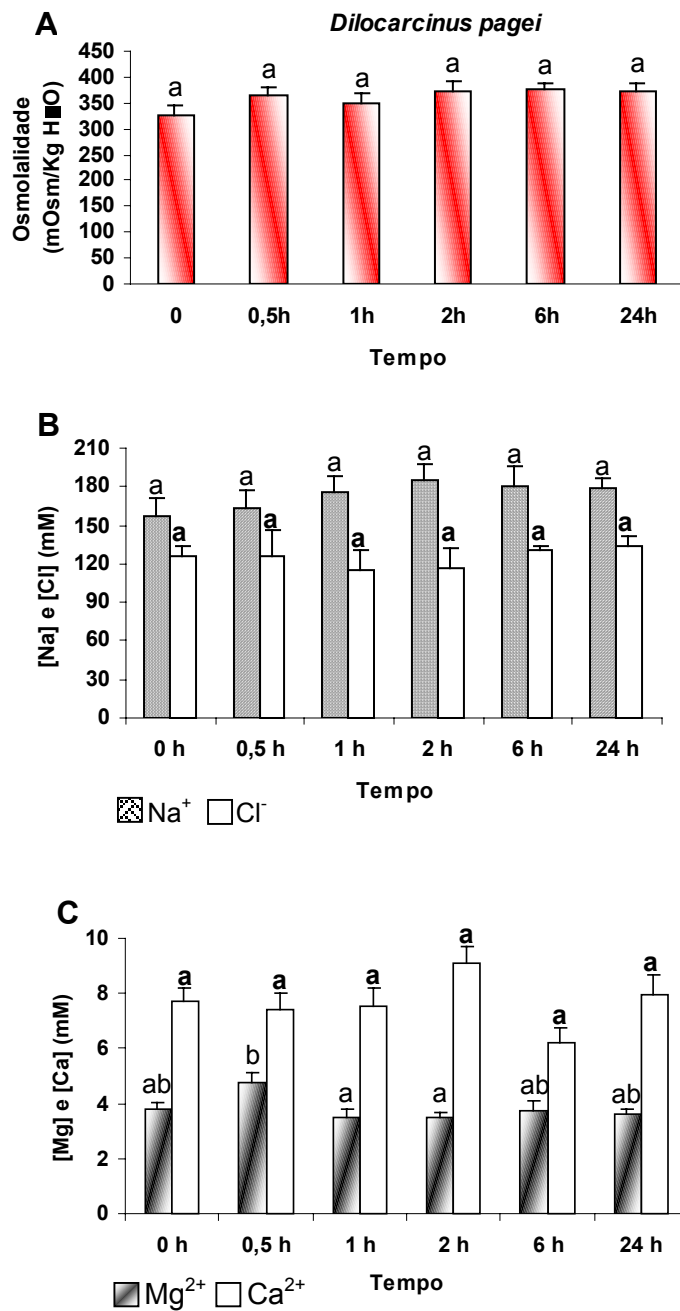


Figura 11: Osmolalidade (A), concentração de Na⁺ e Cl⁻ (B) e concentração de Mg²⁺ e Ca²⁺ (C) hemolinfa de *Dilocarcinus pagei* em situação controle (salinidade < 0,5 ‰, 0h) em até 24h de exposição à salinidade experimental (7‰). Barras com letras em comum de cada variável experimental não são estatisticamente diferentes.

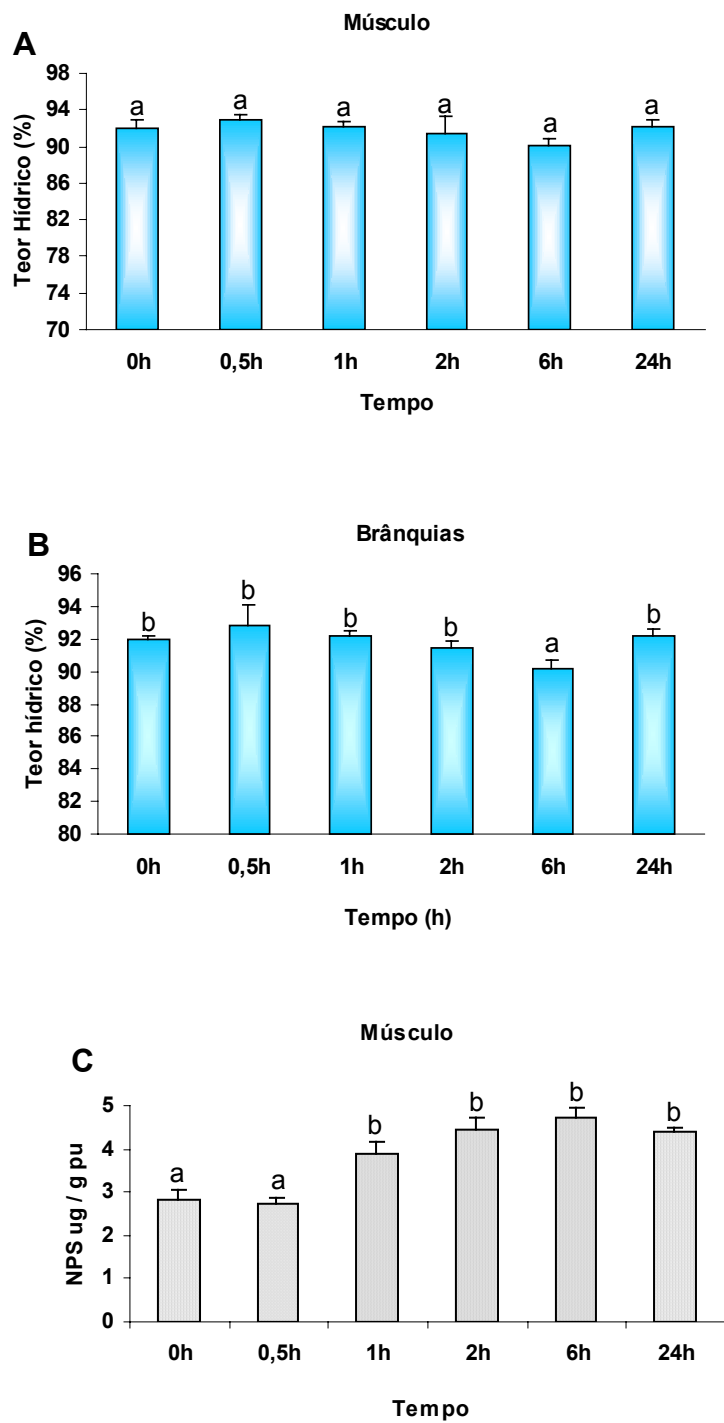


Figura 12: Teor hídrico (A) e (B) e teor de SPN (C) de *Dilocarcinus pagei* em situação controle (salinidade <math><0,5\text{‰}</math>, 0h) em até 24h de exposição à salinidade experimental (

5. DISCUSSÃO

O presente estudo revela modelos diferentes na regulação osmótica e iônica entre as espécies investigadas. A espécie marinha *Hepatus pudibundus*, diante do choque hipo-osmótico, apresentou decréscimo osmótico e iônico na hemolinfa. Em algumas horas a hemolinfa já se apresentava diluída como o meio externo ao qual a espécie foi submetida (25‰), em comportamento típico de um osmoconformador marinho (PÉQUEUX, 1995). Nos tecidos muscular e branquial o teor hídrico não apresentou alteração durante o tempo avaliado. O camarão *Palaemon pandaliformis*, espécie estuarina, diante do choque hipo-osmótico (2‰) apresentou um padrão bifásico na hemolinfa, esta permaneceu hiper-regulada tanto osmótica- quanto ionicamente, porém ocorrendo decréscimos osmóticos e iônicos significativos no LEC. Contudo, esta variação no LEC não se refletiu nas células musculares, pois o teor hídrico neste tecido não foi alterado, continuou praticamente o mesmo durante todo o período de exposição. Quando a mesma espécie foi submetida ao choque hiper-osmótico (35‰) detectaram-se alterações tanto na hemolinfa quanto no tecido muscular. Na hemolinfa a osmolalidade e a [Cl⁻] aumentaram, porém permanecendo abaixo dos valores da água. O tecido muscular do *P. pandaliformis* em 35‰ não conseguiu manter seu teor hídrico. O estresse salino imposto ao camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* (30‰) foi além da sua capacidade osmorregulatória, o que gerou grandes alterações no seu LEC. Estas mudanças foram tanto osmóticas quanto iônicas. A osmolalidade e concentração dos íons Na⁺ e Ca²⁺ praticamente atingiu os valores do meio externo. O drástico aumento nas concentrações do LEC foram suficientes para provocar redução no teor hídrico muscular. A desidratação destas células foi de 7% (percentual de variação considerando o controle como 100%), maior valor

de variação de teor hídrico entre as quatro espécies. O caranguejo *Dilocarcinus pagei*, dulcícola, manteve a osmolalidade e as concentrações iônicas da hemolinfa bastante estáveis, assim como o teor hídrico muscular.

O comportamento osmoconformador apresentado pelo caranguejo marinho *Hepatus pudibundus* é característico da maioria dos crustáceos marinhos. Para esses animais é interessante manter-se isosmótico a água, pois assim a difusão iônica e osmótica entre o fluido extracelular e o meio é mínima (PÉQUEUX, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). No entanto, não foi encontrada nenhuma literatura para esta espécie que possa ser comparada com os resultados apresentados. O mesmo comportamento apresentado pela espécie foi verificado com a lagosta *Palinurus elephas*. Esta apresentou decréscimo na osmolalidade e teor iônico da hemolinfa quando exposta ao meio diluído (LUCU et al., 2000). Quanto às concentrações iônicas do *H. pudibundus*, constataram-se reduções nas concentrações dos íons Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . A diluição do LEC, em consequência da entrada de água, promoveu a saída de íons Na^+ , resultando no decréscimo da [Osm] na hemolinfa. Contudo, não foi verificado o mesmo para a concentração de Cl^- , o íon foi fracamente regulado. A fraca hipo-regulação dos íons Cl^- também foi verificada na hemolinfa da lagosta *Palinurus elephas* (LUCU et al., 2000). O *H. pudibundus* apresentou-se iso-iônico para Mg^{2+} quando em água do mar controle. Esta alta concentração pode explicar a falta de agilidade da espécie, sendo conhecido como “dorminhoco” pelos pescadores. O íon Mg^{2+} age como um agente anestésico, deprimindo a transmissão neuromuscular, o que leva a baixa atividade nos crustáceos com elevadas concentrações do íon (MORRIT & SPICER, 1993; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). O caranguejo *Maia squinado* apresenta alta concentração de íons Mg^{2+} na hemolinfa, como o *H. pudibundus*, e

os seus movimentos são bastante lentos. No caranguejo *Pachygrapsus marmoratus* e na lagosta *Nephrops norvegicus* as concentrações do íon magnésio são bem hipo-reguladas em relação à água do mar, 34 e 24 mM, respectivamente, o que aparentemente justifica apresentarem movimentos ativos e rápidos (MORRIT & SPICER, 1993; SCHMIDT-NIELSEN, 1996; FREIRE et al., 2006). A concentração dos íons Ca^{2+} nos animais controle foi mantida hiper-iônica relação à água do mar. Nos grupos experimentais a concentração ficou bem abaixo do grupo controle e a partir de 6h na salinidade experimental um novo estado iônico foi estabelecido, mas mantendo-se hiper-osmótico em relação ao meio.

Os camarões *P. pandaliformis* e *M. acanthurus*, nas suas salinidades controle, mantiveram sua hemolinfa hiper-regulada. Mas, diante do estresse salino as respostas foram diferentes. O camarão de estuário *P. pandaliformis* diante de redução e aumento na salinidade apresentou capacidade de hiper/hipo-regulação da osmolalidade na hemolinfa. Quando a espécie foi submetida ao choque hipo-osmótico apresentou a osmolalidade e a concentração de cloreto acima dos valores da água. Valores estimados para água 2‰: Osm ~ 60 mOsm/kg H_2O e $[\text{Cl}^-]$ ~ 30 mM. Estudo anterior mostra esta capacidade do *P. pandaliformis* em manter a concentração na hemolinfa acima da concentração da água, em salinidades de <0,5-6‰. Mas este mesmo estudo mostra que a espécie não consegue sobreviver mais de 3h em água doce (FREIRE et al., 2003). E, em salinidade aumentada (35‰), a osmolalidade da hemolinfa e do íon cloreto foi fortemente hipo-regulada, como já relatado para a espécie (FREIRE et al., 2003). Mesmo tendo ainda mostrado capacidade regulatória, percebe-se que as salinidades de 2‰ e 35‰ já representam extremos de tolerância para o *P.*

pandaliformis, pois houve variação no LEC, e percebe-se que o aumento de salinidade foi mais prejudicial do que a redução de salinidade. O camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus*, como outras espécies do gênero *Macrobrachium*, apresenta a osmolalidade e o teor iônico do LEC hiper-regulados em água doce e em baixas salinidades (MOREIRA et al., 1983; LIMA et al., 1997; FREIRE et al., 2003). Entretanto, diante do choque hiper-osmótico (30‰) ao qual a espécie foi submetida, esta capacidade ficou comprometida. A osmolalidade da hemolinfa foi mantida apenas por poucas horas (até 2h). Após este período a concentração osmótica e iônica foi fortemente alterada. Os resultados da osmolalidade na hemolinfa mostram clara tendência para a osmoconformação, como visto para a espécie marinha (*H. pudibundus*) e como já previamente relatado para esta espécie (MOREIRA et al., 1983; BRAILOVSKY & GALERA, 1997). A deficiência em manter a osmolalidade da hemolinfa também ocorreu com *M. rosenbergii* quando este foi submetido a altas salinidades (980 mOsm/kg H₂O), sendo que poucos sobreviveram por mais de 24 horas (WILDER et al., 1998). No *M. acanthurus*, o Na⁺ mostrou maior tendência à conformação do que o Cl⁻, como já tinha sido relatado para o *H. pudibundus*. Quanto às análises da concentração de magnésio na hemolinfa do *M. acanthurus* verifica-se hiper-regulação quando em água doce. E, quando transferido para a salinidade experimental (30‰), *M. acanthurus* é capaz de hipo-regular fortemente a concentração deste íon na hemolinfa. A habilidade em manter o teor de magnésio hiper – regulado em baixa salinidade e água doce ou fortemente hipo-regulado em altas salinidades foi verificado em *P. pandaliformis*, *M. potiuna* e *M. olfersii* e é amplamente relatado para crustáceos reguladores (FREIRE et al., 2003). A regulação do Mg²⁺ da hemolinfa é resultado da ação da glândula antenal (FREIRE et al., 2006). A

manutenção do teor de Mg^{2+} é fundamental, pois este é o segundo cátion de maior representatividade intracelular e é requerido como co-fator por muitas enzimas (MacDERMOTT, 1990; GÜNZEL & GALLER, 1991). A concentração de Ca^{2+} foi mantida durante todo o curso temporal acima das concentrações da água experimental (30‰, estimado ~ 8,5 mM). Nos animais expostos por mais de 6h ao choque hiper-osmótico, as concentrações do íon foram fortemente hiper-reguladas. Manter as concentrações de Ca^{+} na hemolinfa é função da glândula antenal, sendo fundamental a sua participação durante o processo de muda (PÉQUEUX, 1995; FREIRE et al., 2006).

O caranguejo de água doce, *Dilocarcinus pagei*, que habita rios longe do mar apresentou a sua osmolalidade constante na salinidade experimental e durante todo o tempo de exposição. A concentração da hemolinfa (aproximadamente 330 mOsm / kg H₂O) é baixa quando comparada com outros crustáceos de água doce. Os caranguejos *Potamon niloticus* com [Osm] de 525 mOsm / kg H₂O e o lagostim *Astacus astacus* com 426 mOsm / kg H₂O deixam clara essa observação (ONKEN & McNAMARA, 2002). A redução na osmolalidade da hemolinfa para reduzir gradientes osmóticos em água doce é uma das estratégias dos animais bem sucedidos nestes ambientes (PÉQUEUX, 1995). Quando *D. pagei* foi submetido à salinidade de 15‰ a habilidade em manter a [Osm] na hemolinfa constante foi comprometida; nas primeiras 24h de exposição o aumento foi de 45% e durante 10 dias de exposição ao choque hiper-osmótico o animal não conseguiu retornar às concentrações iniciais (AMADO et al., 2006). No presente estudo, a manutenção da osmolalidade foi acompanhada pela concentração dos íons Na^{+} , Cl^{+} e Ca^{+} . Somente foram detectadas alterações na concentração de Mg^{2+} durante as 0,5 horas de exposição ao choque hiper-

osmótico. O retorno às concentrações iniciais provavelmente ocorreu pelo mecanismo de secreção do íon através da glândula antenal (FREIRE et al., 2006). A hiporegulação do íon Mg^{2+} em água 7‰ em um caranguejo estritamente dulcícola não deixa de ser um fato curioso, mas coloca em evidência a relevância fisiológica deste íon e da sua regulação.

As espécies apresentaram comportamentos osmorregulatórios diferentes quando submetidas à salinidade experimental. Diante das variações na [Osm] na hemolinfa as espécies conseguiram manter em maior ou menor grau o teor hídrico no tecido muscular. Para quantificar e ordenar as espécies quanto à capacidade em conservar a água tecidual muscular diante de certa variação no seu LEC foi feito um cálculo simples. Avaliou-se o maior aumento ou decréscimo do teor hídrico muscular em relação ao valor do controle, e dividiu-se este valor pela amplitude de variação na osmolalidade da hemolinfa. Para facilitar a comparação o valor foi multiplicado por 1000. O esperado por esse cálculo é que espécies com maior capacidade de regular o volume de água celular teriam menor variação do teor hídrico muscular diante de variações significativas no seu LEC. Assim, valores menores para esse parâmetro seriam esperados para as espécies com as maiores capacidades de regular a água tecidual (Tab. 3). Os resultados mostram que as duas espécies submetidas ao choque hipo-osmótico tiveram os melhores resultados. A espécie marinha, *H. pudibundus*, que osmoconformou (redução de 278 mOsm/kg H₂O na sua hemolinfa) manteve o teor hídrico do seu tecido muscular constante (2,2% de variação máxima) e o seu valor para a razão foi de 7,9 (Tab. 3). Quando a espécie *P. pandaliformis* foi exposta ao choque hipo-osmótico apresentou 1,7% de aumento máximo no seu teor hídrico muscular, diante da redução de 182 mOsm/kg H₂O na osmolalidade

da hemolinfa, gerando o valor 9,3 para o parâmetro (Tab. 3). Mas, diante do estresse hiper-osmótico, a espécie *P. pandaliformis* apresentou redução de 3,3% no teor hídrico muscular, para um aumento máximo de 195 mOsm/kg H₂O na osmolalidade do LEC, gerando o valor de 16,9 para o parâmetro (Tab. 3). A resposta apresentada pela espécie mostra que os animais conseguem lidar melhor quando a salinidade do meio decresce do que quando esta aumenta muito. Este é um resultado esperado, porque no seu habitat natural é esperado que a salinidade decresça devido ao ciclo das marés e não que chegue a 35‰. Quanto à capacidade de regular o teor de água das suas células musculares, em choque hiper-osmótico, por este parâmetro, o seu desempenho foi inferior ao do camarão de água doce, *M. acanthurus*. Esta espécie apresentou alterações expressivas na hemolinfa, que chegaram a ficar próxima da água. Com as alterações no fluido extracelular as células murcharam, ocorrendo fluxo passivo de água para a hemolinfa. Porém, as alterações de água ocorridas no tecido muscular foram proporcionalmente menores, não acompanhando o grau de alterações da hemolinfa: 5,3% de redução máxima no teor hídrico muscular diante de 429 mOsm/kg H₂O de aumento na osmolalidade da hemolinfa, gerando 12,4 para o parâmetro proposto (Tab. 3). Neste contexto, as células musculares conseguiram minimizar a perda de água durante o estresse salino e, assim, garantir uma perda menos significativa. A outra espécie reguladora de água doce, *D. pagei*, apresentou pouquíssima variação na hemolinfa porque o estresse salino oferecido foi plenamente tolerável: 49 mOsm/kg H₂O. Contudo, este estresse foi suficiente para provocar alterações no teor hídrico do tecido muscular (3%), de forma a gerar o maior valor para o parâmetro: 61, 2 (Tab. 3). Num outro experimento com a salinidade mais elevada, mostrou-se que a espécie diante de

choque hiper-osmótico de 15‰ teve aumento na [Osm] da hemolinfa e reduções expressivas no teor hídrico do tecido muscular (AMADO et al., 2006). Ordenando-se os valores das 4 espécies quando comparando sua capacidade em conservar a água tecidual diante de certa variação na [Osm] do LEC, obtém-se a seguinte classificação: *H. pudibundus* > *P. pandaliformis* (2‰) > *M. acanthurus* > *P. pandaliformis* (35‰) > *D. pagei*. Estes resultados foram compatíveis com a hipótese formulada; crustáceos osmoconformadores conseguem manter o teor hídrico de suas células musculares de maneira mais eficaz do que os osmorreguladores, diante de variações no seu LEC.

Tabela 3. Razão entre as variações absolutas máximas (em relação aos valores nos controles) no teor hídrico muscular e na osmolalidade da hemolinfa, nas espécies estudadas.

	Espécie e Salinidade Experimental				
	<i>H. pudibundus</i> (25‰)	<i>P. pandaliformis</i> (2‰)	<i>P. pandaliformis</i> (35‰)	<i>M. acanthurus</i> (30‰)	<i>D. pagei</i> (7‰)
Δ teor hídrico (TH)	2,2	1,7	3,3	5,3	3,0
Δ [Osm]	278	182	195	429	49
(ΔTH / Δ [Osm]) x 1000	7,9	9,3	16,9	12,4	61,2

O caranguejo osmoconformador, *H. pudibundus*, manteve o teor hídrico do tecido muscular constante diante do choque hipo-osmótico durante todo o curso temporal avaliado. A conservação de água neste tecido teve a participação de SPN. O decréscimo de SPN foi realmente quantitativo, pois a porcentagem de

decréscimo de SPN foi bem diferente (37% de redução) do aumento de 3% no teor hídrico (considerando-se o controle como 100%). A Tabela 4 mostra os valores de variação percentual de teor hídrico e variação percentual de SPN, para as maiores diferenças detectadas durante o curso temporal de exposição ao choque salino e considerando os valores dos controles como 100%. Com essa análise buscou-se demonstrar a participação da SPN na tentativa de controlar a água corporal nestes crustáceos. Se a alteração no teor de SPN fosse apenas devido à mudança no teor hídrico (uma vez que SPN são expressas por peso úmido do músculo), então as porcentagens de alteração seriam da mesma magnitude. Este claramente não foi o caso, como pode ser observado na Tabela 4. A variação percentual no teor hídrico foi de muito menor proporção quando comparada com a variação percentual nas SPN. Este resultado parece indicar modificação real no teor de SPN no tecido muscular de todas as espécies. As SPN não são os únicos efetores osmóticos na regulação de volume, mas são amplamente relatados como relevantes quando ocorrem mudanças na osmolalidade da hemolinfa de crustáceos devido a alterações na salinidade do meio (TUCKER et al., 1975; GILLES, 1970; PÉQUEUX, 1995). As espécies submetidas ao choque hipo-osmótico, *H. pudibundus* e *P. pandaliformis*, apresentaram decréscimo no teor de SPN, após algumas horas de exposição à salinidade reduzida. Realmente, a participação de osmólitos orgânicos na regulação de volume, neste caso RVD, ocorre após um período maior de tempo (GILLES, 1970; GILLES, 1977; FARMER & REEVE, 1978). Provavelmente proteínas celulares ou da hemolinfa (a própria hemocianina) servem como estoque de aminoácidos, que saem das células para perda de água na redução regulatória de volume após choque hipo-osmótico, ou entram nas células para

retenção de água no aumento regulatório de volume após choque hiper-osmótico (VICENT-MARIQUE & GILLES, 1970; GILLES, 1977; PÉQUEUX et al., 1979; GILLES & PÉQUEUX, 1981). Estudos com *M. rosenbergii* diante de choque hiper-osmótico ([Osm] da água 800 mOsm/kg H₂O) relatam alterações no metabolismo de proteínas da hemolinfa que aumentam a concentração de aminoácidos livres (AAL) (ARMSTRONG et al., 1981; TAN & CHOONG, 1981; HUONG et al., 2001). O trabalho de TAN & CHOONG (1981) mostrou aumento de aminoácidos livres e teor de SPN no tecido muscular, como o que foi mostrado no *M. acanthurus* neste estudo. O caranguejo *D. pagei* apresentou aumento no teor de SPN, mesmo com pouquíssima alteração na hemolinfa. O aumento de SPN já foi demonstrado num estudo anterior quando a espécie foi submetida à salinidade mais elevada (15‰) (AMADO et al, 2006). O *P. pandaliformis* quando em estresse hiper-osmótico não apresentou aumento no teor de SPN. Diferentemente da espécie *P. elegans* que em salinidade 20‰ manteve o conteúdo de AAL e o volume celular ficou mais ou menos constante, mas em salinidade de 40‰ apresentou aumento expressivo de AAL (55%), indicativo de hidrólise de proteínas (DALLA VIA, 1989). Os resultados do *P. pandaliformis*, principalmente no choque hiper-osmótico, foram os menos claros em relação à utilização de SPN como efetores osmóticos da manutenção da água tecidual.

Tabela 4. Razão entre as variações máximas (em porcentagem do respectivo valor controle) no teor hídrico e SPN musculares nas espécies estudadas.

	Espécie e Salinidade Experimental				
	<i>H. pudibundus</i> (25‰)	<i>P. pandaliformis</i> (2‰)	<i>P. pandaliformis</i> (35‰)	<i>M. acanthurus</i> (30‰)	<i>D. pagei</i> (7‰)
↑↓ % Teor hídrico (TH)	3	2	4	7	4
↑↓ % SPN	37	56	63	62	69
(%TH/%SPN) x 100	8,1	3,5	6,3	11,2	5,8

O tecido muscular, por estar em contato direto com a hemolinfa, foi o que realmente apresentou alterações no teor hídrico, diferentemente do tecido branquial. Durante o estresse salino, apenas o *D. pagei* apresentou decréscimo no teor hídrico nas brânquias, mas recuperando-o num período maior de tempo na salinidade experimental. Nenhum trabalho foi encontrado para corroborar com os resultados obtidos com a espécie.

6. CONCLUSÃO

A espécie marinha *H. pudibundus*, osmoconformadora, manteve o teor hídrico dos tecidos (indicação de regulação de volume celular) muscular e branquial diante das variações na hemolinfa. Enquanto as demais espécies osmorreguladoras (*P. pandaliformis*, *M. acanthurus* e *D. pagei*) apresentaram comprometimento na manutenção do teor hídrico tecidual (reflexo da “ineficiente” regulação de volume celular) frente às alterações no LEC. Assim, a pergunta

formulada para este trabalho foi respondida, pois a espécie osmoconformadora conseguiu manter o teor hídrico (i.e., regulou o volume celular) de suas células qualitativamente melhor do as espécies osmorreguladoras.

7. REFERÊNCIAS

- AMADO, E. M.; FREIRE, C. A.; SOUZA, M. M. Combined effects of inorganic lead and hyperosmotic stress on osmoregulation and tissue volume regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (CRUSTACEA, DECAPODA). Submetido em Dezembro de 2005 ao **Aquatic Toxicology**, 2006.
- AUGUSTO, A. S. A regulação isosmótica intracelular em estágios ontogenéticos selecionados do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* (Crustácea, Decapoda). Dissertação (Mestrado em Ciências) – **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto –USP, Ribeirão Preto**, 2000.
- AUGUSTO, A. S.; McNAMARA, J. C., 2002. Capacidade osmorregulatória do caranguejo hololimnético *Dilocarcinus pagei* e sua relação com a invasão dos crustáceos na água doce. In: **Congresso Brasileiro de Zoologia**, Itajaí: UNIVALI, 2002.
- ARMSTRONG, D. A.; STRANGE, K.; CROWE, J. KNIGHT, A.; SIMMONS, M. High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds. **Biological Bulletin**. 160: 349 – 365, 1981.
- BRAILOVSKY, G. S. P.; GALERA, E. S., 1997. Comportamiento osmorregulador de *Macrobrachium tenellum* y *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: Palaemonidae) en diferentes salinidades. **Revista de Biología Tropical**. 45 (3): 1085 -1091, 1997.
- BURTON, R. S.; FELDMAN, M. W., 1982. Changes in free amino acid concentrations during osmotic response in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 73: 441 – 445, 1982.
- CLARK, M. E. Free amino acid levels in the coelomic fluid and body wall of polychaetes. **Biological Bulletin**. 134: 35 – 47, 1968.

- CHAMBERLIN, M. E.; STRANGE, K. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. **American Journal Physiological**. 257: 159 – 173, 1989.
- DALLA VIA, G. The effect of salinity on free amino acids in the prawn *Palaemon elegans* (Rathke). **Arch. Hydrobiol**. 115: 125 – 135, 1989.
- DEATON, L. E. Comparative aspects of cellular volume regulation in cardiomyocytes. **Invited Perspectives in Physiological Zoology**. 70: 379 – 390, 1996.
- FAMER, L.; REEVE, M. R. Role of the free amino acid pool of the copepod *Acartia tonsa* in adjustment to salinity change. **Marine Biology**. 48: 311 – 316, 1978.
- FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimps *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. **Journal of Crustacean Biology**. 15: 103 -116, 1995.
- FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C. Involvement of the central nervous system in neuroendocrine mediation of osmotic and ionic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). **General and Comparative Endocrinology**. 88, 316-327, 1992.
- FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; McNAMARA, J. C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Submetido em fevereiro de 2006 ao **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2006.
- FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino acid concentration in the hemolymph. **General and Comparative Endocrinology**. 100, 83-91, 1995.

- FREIRE, C. A.; CAVASSIN, F.; RODRIGUES, E. N.; TORRES, A. H.; McNAMARA, J.C. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A, 136: 771-778, 2003.
- GILLES, R. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 56: 109 – 114, 1997.
- GILLES, R. Intracellular organic osmotic effectores. In “Mechanisms of osmoregulation in animals. Maintenance of cell volume” (R. Gilles, Ed), Wiley. 1: 111 – 154, 1979.
- GILLES, R.; PÉQUEUX, A.; BIANCHINI, A. Physiological aspects of NaCl movements in the gills of the euryhaline crab *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 90: 201 – 207, 1988.
- GILLES, R.; PÉQUEUX, A. Cell volume regulation in Crustaceans: relationship between mechanisms for controlling the osmolality extracellular and intracellular fluids. **Journal of Experimental Zoology**. 217: 351-362, 1981.
- GOOLISH, E. M.; BURTON, R. S. Exposure to fluctuating salinity enhances free amino acid accumulation in *Tigriopus californicus* (Copepoda). **Journal of Comparative Physiology B**. 158: 99-105, 1988.
- HERRERA, F. C.; LÓPEZ, I.; EGEA, R.; ZANDERS, P. Short-term osmotic responses of cells and tissues of the sea anemone, *Condylactis gigantean*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 92: 377-384, 1989.
- HOFFMANN; DUNHAM, P. B. Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation. In Kwang WJ, ed. **International Review of Cytology**. 161: 172-262, 1995.

- HUONG, D. T. T.; YANG, W. J.; OKUNO, A.; WILDER, M. N. Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 128: 317-326, 2001.
- KAMEMOTO, F. I.; Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. **Zoological Science**. 8: 827-833, 1991.
- KÉVERS, C.; PÉQUEUX, A.; GILLES, R. Effects of hypo- and hyperosmotic shocks on the volume and ion content of *Carcinus maenas* isolated axons. **Comparative Biochemistry Physiology**. A 64: 427 – 431, 1979.
- KIRKPATRICK, K.; JONES, M. B. Salinity tolerance and osmoregulation of a prawn, *Palaemon affinis* Milne Edwards (Caridea: Palaemonidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 93: 61-70, 1985.
- LANG, F.; WALDEGGER, S. Regulating cell volume. **American Scientist**. 85: 456 – 463, 1997.
- LANG, M. A. Correlation between osmoregulation and cell volume regulation. **American Physiological Society**. 1988.
- LIMA, A. G.; McNAMARA, J. C. TERRA, W. R. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na⁺, K⁺ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1936) (Decapoda Palaemonidae). **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**. 215: 81 – 91, 1997.
- LIN, S.; LIOU, C.; CHENG, J. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 127: 121 – 129, 2000.

- LOCKWOOD, A. P. M.; INMAN, C. B. E.; COURTENAY, T. H. The influence of environmental salinity on the water fluxes of the amphipod crustacean *Gammarus duebeni*. **Journal Experimental Biology**. 58: 137 – 148, 1973.
- LUCU; TOWLE, 2003. Na⁺ + K⁺ -ATPase in gill of aquatic crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 135: 195-214, 2003.
- MacDERMOTT, M. The intracellular concentration of free magnesium in extensor digitorum longus muscles of the rat. **Experimental Physiology**. 75: 763 – 769, 1990.
- MANN, K. H.; LAZIER, J. R. N. Dynamics of marine ecosystems. **Biological Physical Interactions in the Oceans**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991
- McNAMARA, J. C. The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Experimental Marine Biology e Ecology**. 107: 245 - 251, 1987.
- McNAMARA, J. C.; LIMA, A. G. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. **Biology Bull**. 192: 321 – 331, 1997.
- McNAMARA, J. C.; TORRES, A. H. Ultracytochemical location of Na⁺ / K⁺ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea Decapoda). **Journal of Experimental Zoology**. 284: 617 - 628, 1999.
- MELO, G.A.S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro - São Paulo: **Plêiade/FAPESP**, 1996.

- MONGIN, A. A.; ORLOV, S. N. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. **Pathophysiology**. 8: 77 – 88, 2001.
- MOREIRA; MCNAMARA, J. C. The Effect of Salinity of the Upper Thermal Limits of survival and Metamorphosis During Larval Development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**. 50: 231-238, 1986.
- MOREIRA, G. S.; MCNAMARA, J. C., SHUMWAY, S. E. & MOREIRA, P. S.: Osmoregulation and Respiratory Metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 74: 57 – 62, 1983.
- MORRIT, D.; SPICER, J. I. Mini review: a brief reexamination of the function and regulation of extra-cellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropods. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 106: 19 – 23, 1993.
- NEUFELD, D. S.; WRIGHT, S. H. salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa*. **The Journal of Experimental Biology**. 199: 1619 - 1630, 1996.
- NEUFELD, G. J.; HOLLIDAY, C. W.; PRITCHARD, J. B. Salinity adaption od gill $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{--ATPase}$ in crab *Callinectes sapidus*. **Journal Experimental Zoology**. 211: 215 – 224, 1980.
- NYBAKKEN, J. W. Marine Biology: An Ecological Approach. 2^a Ed. **Harper Collins Publishers**, 1988.
- ONKEN, 1999. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gill of Chinese crabs (*Eriocheir sinensis*) adapted to different salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A 123: 377-384, 1999.

- ONKEN, H.; McNAMARA, J.C. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. **The Journal of Experimental Biology**, Vol 205: 167-175, 2002.
- ONKEN; RIESTENPATT, 1998. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 119: 883-893, 1998.
- PÉQUEUX, A.: Osmotic Regulation in Crustaceans. **Journal Crustacean Biology**. 5: 1 – 50, 1995.
- PÉQUEUX, A.; VALLOTA, A. C. & GILLES, R.: Blood Proteins as Related to Osmoregulation in Crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, A 64: 433 – 435, 1979.
- PROSSER, C. L. Comparative Animal Physiology. 3rd ed. Philadelphia: **W. B. Saunders Co.**, 1973.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Fisiologia Animal: mecanismos e adaptação. 4. Ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 2002.
- RASMUSSEN, A. D.; ANDERSEN, O. Apparent water permeability: a physiological parameter in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. 199: 255-2564, 1996.
- RATHMAYER, M.; SIEBERS, D. Net uptake of chloride across the posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 137: 51 – 55, 2003.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. 6. ed. São Paulo: **Ed. Roca**, 1996.

- RUSSELL, J. M. Sodium-Potassium-Chloride cotransport. **Physiological Reviews**, U.S.A., Vol. 80: 211-276, 2000.
- SANTOS; McNAMARA, J.C., 1996. Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). **Journal of Experimental Marine Biology e Ecology**, 206: 109-120, 1996.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente. 5 ed. São Paulo: **Editora Santos**, 1996.
- SIEBERS, D.; LEWECK, K.; MARKUS, H.; WINKLER, A. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. **Marine Biology**. 69: 37 – 43, 1982.
- SMITH, 1967. Osmotic regulation and adaptive reduction of water permeability in a brackish-water crab, *Rhithropanopeus harrisi* (Brachyura, Xanthidae). **Biology BullIN**. 133, 1967.
- SMITH , R. L.; THOMPSON, L. J.; MAGUIRE, M. E. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg²⁺ transporter from *Bacillus firmus* OF4. **Journal of Bacteriology**. 177: 1233 – 1238, 1995.
- SOUZA M. M. BOYLE R. T. & LIEBERMAN M. Different physiological mechanisms control isovolumetric regulation and regulatory volume decrease in chick embryo cardiomyocytes. **Cell Biology International**. 24: 713-721, 2000.
- SOUZA, M. M.; SCEMES, E. Volume changes in cardiac ventricles from *Aplysia brasiliensis* upon exposure to hyposmotic shock. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 127: 99-111, 2000.

- TAN, C. H.; CHOONG, K. Y. Effect of hiperosmotic stress on hemolymph protein, muscle ninhydrin-positive substances and free aminoacids in *Macrobrachium rosenbergii* (de man). **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 70: 485 - 489, 1981.
- TAYLOR, H. H.; TAYLOR, E. W. Gill and lungs: the exchange of gases and ions. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. 10: 203 – 293, 1992.
- TEIXEIRA, R. L.; SÁ, H. S. Abundância de macrocrustáceos decápodos nas áreas rasas do Complexo Lagunar Mundaú/Manguaba, AL. **Revista Brasileira de Biologia**, 58 (3): 393-404, 1998.
- TUCKER, R. K.; COSTLOW, J. D. Free amino acid changes in normal and eyestalkless megalopa larvae of the blue crab *Callinectes sapidus*, during the course of molt cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 51: 75 – 78, 1975.
- VINCENT-MARIQUE, C.; GILLES, R. Modification of the amino acid pool in blood and muscle of *Eriocheir sinensis* during osmotic stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 35: 479 - 485, 1970.
- WILDER N. M., IKUTA K., ATMOMARSONO M. HATTA T. & KOMURO K.: Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. **Comparative Biochemistry and Physiology**. A 119: 941-950, 1998.