

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HUGO ULTRAMARI BATISTA

OSMORREGULAÇÃO E ATIVAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE POR
ALTERAÇÃO DE SALINIDADE NAS ESPÉCIES DE CARANGUEJOS *Uca maracoani*
(LATREILLE, 1802-1803), *Uca thayeri* (RATHBUN, 1900) E *Uca mordax* (SMITH, 1870)

CURITIBA
2010

HUGO ULTRAMARI BATISTA

OSMORREGULAÇÃO E ATIVAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE POR
ALTERAÇÃO DE SALINIDADE NAS ESPÉCIES DE CARANGUEJOS *Uca maracoani*
(LATREILLE, 1802-1803), *Uca thayeri* (RATHBUN, 1900) E *Uca mordax* (SMITH, 1870)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

Orientadora: Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA
2010

Termo de aprovação

**OSMORREGULAÇÃO E ATIVAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE POR
ALTERAÇÃO DE SALINIDADE NAS ESPÉCIES DE CARANGUEJOS *Uca
maracoani* (LATREILLE, 1802-1803), *Uca thayeri* (RATHBUN, 1900) E *Uca
mordax* (SMITH, 1870)**

por

Hugo Ultramari Batista

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores


Dra. Carolina de Arruda Oliveira Freire - UFPR
Presidente e Orientadora


Dra. Flávia Pinheiro Zanotto - MACKENZIE


Dr. Paulo da Cunha Lana - UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Ciências Biológicas – UFPR, por possibilitar a extensão da minha formação acadêmica, além do conhecimento científico adquirido ao longo desses dois anos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire, pela excelente orientação, pelo apoio e valiosa contribuição na elaboração e execução deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Helena Cristina Silva de Assis pelo aceite na colaboração com o segundo capítulo deste trabalho, além de fornecer a estrutura de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À equipe do Laboratório da Fisiologia Comparativa da Osmorregulação do Setor de Ciências Biológicas – UFPR pela disposição e apoio.

Ao Doutorando César Silva, do programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da UFPR, pela enorme ajuda nos ensaios executados para o segundo capítulo desta dissertação, além das grandes risadas que demos juntos durante as tardes dos experimentos.

Ao pescador “Seu Fatia” pela ajuda nas coletas dos caranguejos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o período de realização do curso.

Aos meus pais, Ari Batista e Carmem Lúcia Ultramari Batista, por minha vida e por me ensinarem bons valores.

Aos meus verdadeiros amigos, pelos sinceros votos de sucesso.

À Deus, por tudo que tem feito na minha vida.

“Há coisas que um bom espírito não estuda, mas as que ele estudar não devem ser abandonadas antes que ele as conheça bem. Há coisas sobre as quais ele não medita, mas se o faz não as abandona sem lhes encontrar explicação. Há coisas sobre as quais ele não as interroga, mas se o faz não as abandona sem antes as haver compreendido. Há coisas que ele não procura distinguir, mas as que ele quer distinguir não as abandona sem que lhes tenha fixado a diferença”.

Confúcio

RESUMO GERAL

A função da osmorregulação e o sistema de proteção antioxidante trabalham para a manutenção da homeostase interna dos crustáceos. A sua atuação conjunta e harmônica contribui para a sobrevivência do animal. Portanto, a função da osmorregulação, aliada à ativação do sistema de proteção antioxidante, foi investigada em caranguejos do gênero *Uca*. O objetivo foi verificar a interação entre habitat, osmorregulação e estresse oxidativo nas espécies *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax*. As hipóteses deste estudo avaliaram: 1. relações entre distribuição espacial e osmorregulação e 2. a influência da salinidade sobre o sistema de proteção antioxidante. As coletas foram realizadas na Baía de Guaratuba, Paraná, entre dezembro/2008 a julho/2009, em locais de salinidade distinta. Em laboratório, os caranguejos foram submetidos por 8 horas a salinidades que variavam de 0 a 40‰, e tinham a hemolinfa e as vísceras retiradas para dosagens osmo-iônicas e para ensaios do sistema antioxidante, respectivamente. A comparação dos valores de osmolalidade e sódio das três espécies revelou *U. thayeri* como a espécie com menor capacidade de regulação. Portanto, sua eurihalinidade pode ser explicada, provavelmente, por uma maior capacidade de regulação isosmótica intracelular, ou regulação de volume celular. Somente para o cloreto, *U. thayeri* mostrou uma maior capacidade regulatória. *Uca mordax* mostrou-se distinta das duas outras espécies. Magnésio e potássio foram regulados em todas as salinidades, pelas três espécies: magnésio sempre hiporregulado (exceção em 0‰) e potássio sempre hiper-regulado. Nestes chama-marés observou-se capacidade osmorregulatória, principalmente nas salinidades intermediárias empregadas, porém com algumas diferenças, associadas aos seus habitats. No sistema de proteção antioxidante, a enzima glutathione peroxidase (GPx), quando comparada com a glutathione reductase (GR) e o substrato GSH, apresentou-se bem sensível às mudanças de salinidade, demonstrando ser um biomarcador efetivo para este fator abiótico. A atividade da GPx em *U. maracoani* e *U. thayeri* foi menor nas salinidades extremas (0 e 40‰), nas quais estas espécies tenderam a osmoconformação ou regulação mais fraca da hemolinfa. Uma provável redução metabólica e de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode explicar a baixa atividade da GPx nestas salinidades. *Uca mordax* apresentou atividade mínima da GPx em 10‰, sendo isto relacionado com o fato da espécie viver em regiões mais hiposalinas. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LPO) se mantiveram estáveis ao longo das salinidades em *U. maracoani* e *U. thayeri*, mas mostraram correlação com a salinidade em *U. mordax*. Portanto, evidências de relação entre a função da osmorregulação e a ativação do sistema antioxidante foram encontradas neste trabalho.

Palavras-chave: Chama-marés, Salinidade, Regulação osmo-iônica, Sistema antioxidante, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The function of osmoregulation, connected to the activation of the antioxidant system, was investigated in the semi-terrestrial fiddler crabs of the genus *Uca*. The study aimed at verifying any interaction between habitat of the species, osmoregulatory behaviour, and potential oxidative stress induced by different salinities. The crabs were obtained in Guaratuba Bay, State of Paraná, between December 2008 and July 2009, in different places with respect to the salinity regime of the Bay. Three species of fiddler crabs occur in Guaratuba Bay, State of Paraná. The salinity of the habitats of *Uca maracoani*, *Uca thayeri*, and *Uca mordax* is of respectively, 14-32‰, 4-32‰, and 0-6‰. These species have been submitted for 8 hours to water of different salinities (0, 10, 20, 30, and 40‰). Hemolymph was sampled for osmo-ionic determinations, and soft tissues (except gills) were dissected for the assays of the antioxidant system. Osmolality and the concentrations of the ions chloride and sodium in the hemolymph of the 3 species have been regulated, mainly, between 10 and 30‰, but derived to hypo-conformation in 40‰, and hyper-conformation in 0‰ (*U. maracoani* and *U. thayeri*). *U. mordax*, the species that ranges in the most dilute waters, also regulated in fresh water (0‰). The ions magnesium and potassium were precisely regulated in all salinities, by the 3 species: magnesium always hypo-regulated (exception in 0‰), and potassium always hyper-regulated. The exposure of these fiddler crabs to a wide range of salinities for a short period has shown their osmotic and ionic regulatory capacity, but with differences among the species, compatible with the habitats they occupy. The specific activity of the enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), besides the quantification of the antioxidant substrate GSH, and the levels of lipidic hydroperoxides (LPO) have been assayed in the soft tissues of the crabs. The enzyme GPx displayed the most evident relationship with the salinity of exposure of the different crabs. GPx activity in *U. maracoani* and *U. thayeri* was higher in the intermediary salinities, and decreased in the extreme salinities (0 e 40‰). *U. maracoani* occupies areas of higher salinities, and *U. thayeri* is considered the most euryhaline of the 3 species, ranging in widely varied habitats in terms of salinity. *U. mordax*, which lives in the most internal areas of the Bay, of lower salinities, displayed minimal GPx activity in 10‰; in the highest salinity (40‰), GPx could not prevent the high level of LPO. The saline challenge was not sufficient to cause oxidative damage (LPO) in the soft tissues of the two crabs of more saline habitats. In the salinities where the species *U. maracoani* and *U. thayeri* have shown osmoconforming behaviour (0‰ and 40‰), there was a probable decrease in metabolic activity, and consequent reduction in the generation of reactive oxygen species, thus resulting in reduction in GPx activity. On the contrary, *U. mordax* has shown activation of GPx in the higher salinities, when it has also shown osmoconforming behavior. Thus, a relationship between the function of osmoregulation and the activation of the antioxidant system has become apparent.

Keywords: Fiddler crabs, Salinity, Ion-osmotic regulation, Antioxidant system, Oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PREFÁCIO

- Fig. 1- *Uca thayeri*. Quela de um dos quelípodos em tamanho avantajado, característica do gênero. Fonte: <http://www.labec.com.br/biodigital/>. Barra de escala: 1 cm.....12
- Fig. 2- O caranguejo *Uca maracoani*. Barra de escala: 1 cm.....14
- Fig. 3- O caranguejo *Uca thayeri*. Barra de escala: 1 cm.....14
- Fig. 4- O caranguejo *Uca mordax*. Barra de escala: 1 cm.....15

CAPÍTULO I

- Fig. 1- Osmolalidade da hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isosmótica. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças significativas no valor da osmolalidade entre as três espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média31
- Fig. 2- Concentração de sódio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoiônica. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.....32

Fig. 3- Concentração de cloreto na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoiônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças significativas entre as três espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.....34

Fig. 4- Concentração de magnésio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoiônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.....35

Fig. 5- Concentração de potássio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoiônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.....36

CAPÍTULO II

Fig. 1- Efeito da salinidade sobre a atividade da GPx nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativo). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.....52

Fig. 2- Efeito da salinidade sobre a atividade da GR nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativo). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.....53

Fig. 3- Concentração do substrato antioxidante GSH ao longo das salinidades experimentais nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativo). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.....54

Fig. 4- Concentração dos hidroperóxidos lipídicos (LPO) ao longo das salinidades experimentais nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativo). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.....55

SUMÁRIO

PREFÁCIO GERAL	12
OBJETIVOS GERAIS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO I – OSMORREGULAÇÃO DE TRÊS CARANGUEJOS DO GÊNERO <i>UCA</i> (OCYPODIDAE) DE AMBIENTES DISTINTOS, DIANTE DE EXPOSIÇÃO DE CURTO PRAZO A SALINIDADES VARIANDO DE ÁGUA DOCE A ÁGUA HIPER-SALINA	25
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO II – EXPOSIÇÃO DE CURTO-PRAZO A ÁGUA DOCE E HIPER-SALINA E A DEFESA ANTIOXIDANTE EM CARANGUEJOS SEMI-TERRESTRES (<i>UCA</i>, OCYPODIDAE)	44
RESUMO	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	59
CONCLUSÕES GERAIS	62

Prefácio Geral

Gênero Uca

Caranguejos popularmente conhecidos como chama-marés (Decapoda, Ocypodidae, *Uca* spp.) são braquiúros que comumente habitam manguezais ao longo de estuários protegidos, em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Crane 1975; Barnwell e Thurman 1984). Nos manguezais, podem ocupar substratos lamosos ou arenosos, nos quais cavam tocas que servem de local de abrigo contra possíveis predadores e como locais de cópula. Além disto, as tocas servem para a proteção contra variações ambientais extremas (altas temperaturas, salinidades extremas, etc) (Powers e Cole 1976). Estes caranguejos caracterizam-se por serem simpátricos (várias espécies ocupando uma mesma área), gregários, diurnos e ativos durante as marés baixas (Crane 1975).

A presença de quelas gigantes nos machos é também um fator bem característico das espécies deste gênero (Fig. 1). Esta quela gigante não ocorre nos estágios iniciais dos machos e tem um crescimento alométrico (cresce em maior proporção que outras estruturas) após a muda puberal juvenil, a qual marca o início da maturação sexual dos machos (Yamaguchi 1977). Portanto, esta estrutura não está associada com o mecanismo de alimentação, mas sim com o processo reprodutivo dos machos, sendo utilizada principalmente nos acenos sexuais para com as fêmeas, além de também servir para interações agonísticas com outros machos (Crane 1975; Masunari e Swiech-Ayoub 2003).



Fig. 1 *Uca thayeri*. Quela de um dos quelípodos em tamanho avantajado, característica do gênero. Fonte: <http://www.labec.com.br/biodigital/>. Barra de escala: 1 cm.

Estes caranguejos são onívoros e ingerem principalmente algas e protozoários que estão no substrato. Matéria orgânica também pode ser consumida por estes animais por ocasião da maré alta (Crane 1975).

O ciclo reprodutivo dos chama-marés está relacionado com variações latitudinais, foto período, nutrientes e temperatura. Assim, o período reprodutivo é bastante diversificado nas espécies, devido às diferentes distribuições geográficas e à própria fisiologia destes animais. Em geral, os chama-marés de regiões tropicais se reproduzem durante o ano todo, apresentando recrutamento contínuo de juvenis e taxas constantes de mortalidade larval (Macintosh 1989). Para aqueles de regiões subtropicais e temperadas, a reprodução acontece principalmente na primavera, provavelmente por ser a estação menos rigorosa na temperatura.

A importância ecológica destes animais reside no fato deles escavarem o sedimento para fazerem as tocas. Estas remoções de sedimento mudam a dinâmica dos compostos orgânicos no interior do solo, trazendo-os para a superfície e beneficiando o crescimento de algas marinhas e bactérias. Estas, por sua vez, reciclam compostos inorgânicos importantes para outros seres vivos daquele ambiente (Genoni 1985).

Até o momento, já foram descritas cerca de 100 espécies do gênero em todo o mundo. Ao longo do litoral brasileiro existem 10 espécies de chama-marés, que ocupam tanto áreas tropicais quanto subtropicais. No sul do país (região subtropical), estes caranguejos ocorrem nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No Paraná, as espécies encontradas são *Uca burgersi*, *Uca leptodactyla*, *Uca maracoani*, *Uca mordax*, *Uca rapax*, *Uca thayeri*, *Uca uruguayensis* e *Uca vocator* (Melo 1996; Masunari 2006).

As espécies-alvo deste trabalho foram as seguintes: *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax*, as quais são encontradas ao longo do interior da Baía de Guaratuba, PR, Brasil. A espécie *U. maracoani* possui uma ampla distribuição geográfica na costa oeste do Oceano Atlântico, ocorrendo nas Antilhas, Venezuela e Guianas, e ao longo do costa brasileira, desde o Maranhão até Santa Catarina (Melo 1996; Branco 1990). Este chama-maré caracteriza-se por ocupar substratos lodosos em regiões próximas da entrada de baías, onde a salinidade é alta e varia em torno de 18‰ a 33‰ (Hirose e Negreiros-Fransozo 2008; Masunari 2006; Crane 1975). *Uca thayeri* e *U. mordax* também distribuem-se ao longo da costa ocidental do Oceano Atlântico e são encontrados desde a região do Golfo do México até o estado de Santa Catarina, no Sul do Brasil (Melo 1996; Branco 1990). Estas espécies diferenciam-se em relação aos locais que habitam dentro de baías, *U. thayeri* ocupa bordas lamacentas de manguezais e ocorre ao longo de toda a extensão de baías, suportando variações de

salinidades de 4‰ até 31‰. Em contraste, *U. mordax* habita regiões com baixas salinidades, bem perto da desembocadura de rios, onde a salinidade varia entre 0‰ e 6‰ (Melo 1996; Crane 1975) (Figs. 2, 3 e 4).



Fig. 2 O caranguejo *Uca maracoani*. Barra de escala: 1 cm.



Fig. 3 O caranguejo *Uca thayeri*. Barra de escala: 1 cm.



Fig. 4 O caranguejo *Uca mordax*. Barra de escala: 1 cm.

Homeostase osmótica em crustáceos

A regulação osmo-iônica caracteriza-se como um processo ativo efetuado por todos os animais que mantêm concentrações osmóticas distintas do meio. Vários íons são assim mantidos em concentrações diferentes daquelas encontradas no ambiente, pois muito frequentemente as concentrações internas diferem bastante daquelas encontradas no meio externo (Randall et al. 1999; Schmidt-Nielsen 2002). Esta homeostase extracelular é chamada de RAE, Regulação Anisomótica Extracelular (Pequéux 1995; Kirschner 1991; Freire et al. 2008b). A RAE é efetuada pelas brânquias de caranguejos braquiúros, principalmente pelas lamelas branquiais posteriores, e pela glândula antenal, o órgão excretor. Um complexo mecanismo de captação e extrusão de íons através da ação conjunta de bombas iônicas (ATPases), cotransportadores e canais iônicos ocorre nos epitélios do tecido branquial e da glândula antenal, transportando os íons entre a água externa e a hemolinfa (líquido extracelular) (ver revisões em Péqueux 1995 e Freire et al. 2008a).

Os crustáceos que realizam a RAE são chamados de osmorreguladores. Os osmorreguladores incluem a maioria dos crustáceos (terrestres, semi-terrestres e aquáticos). Nos aquáticos, podem-se distinguir dois tipos de osmorreguladores, os hiper-osmorreguladores, a grande maioria, e os hipo-osmorreguladores. A hiper-osmorregulação é caracterizada quando o animal se mantém internamente mais concentrado que o meio onde está, mantendo a osmolalidade da hemolinfa praticamente constante. Estes podem ainda ser considerados osmorreguladores fracos ou fortes. Fracos são os que entram em estuários, tendo

capacidade de absorver sal de água salobra, mas não conseguem absorver sal da água doce. Fortes são os que vivem em água doce, e que, para conseguir absorver sal da água doce, necessitam da força motriz gerada pela H^+ -ATPase apical (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a). A hipo-osmorregulação, apesar de ser rara em invertebrados e crustáceos, também pode ser realizada por alguns branchiópodos, isópodos, copépodos e alguns decápodos (Péqueux 1995; Freire et al. 2008a).

A maioria dos crustáceos marinhos, como por exemplo braquiúros de regiões sublitorais, são osmoconformadores e morrem em poucas horas quando em águas muito diluídas. Nestes crustáceos, a concentração osmótica da hemolinfa é muito parecida com a da água do mar, e os epitélios não realizam transporte de sal de forma significativa. A sobrevivência e grau de tolerância à variação de salinidade externa (grau de eurihalinidade) destes animais depende fortemente da regulação isosmótica intracelular (RII), ou regulação de volume das células (Randall et al. 1999; Kirschner 1991; Freire et al. 2008b; Foster et al. 2010).

Contudo, é importante ressaltar que crustáceos osmorreguladores, quando desafiados além dos seus limites de regulação anisosmótica, podem apresentar comportamento osmoconformador (desafiando suas células a apresentar RII) (Péqueux 1995, Freire et al. 2003; Freire et al. 2008b). Por exemplo, crustáceos estuarinos quando em água doce, deixam de regular a hemolinfa de maneira eficiente e passam a conformá-la, sobrevivendo por apenas algumas horas (Freire et al. 2003). A este tipo de conformação podemos chamar de hiper-osmoconformação, pois o animal mantém-se hiper-osmótico em relação ao meio onde está, entretanto, a hemolinfa se dilui conforme a variação do meio externo, não sendo mais regulada. Outro extremo também pode ser exemplificado, quando se coloca um crustáceo de água doce ou estuarino em água do mar, com o animal passando de um osmorregulador para um conformador em água marinha. Neste tipo de conformação o animal realiza hipo-osmoconformação, pois mantém-se hipo-osmótico em relação ao meio onde está, mas a hemolinfa varia osmoticamente conforme a variação do meio (Freire et al. 2003; 2008b).

Estudos sobre a osmorregulação de caranguejos do gênero *Uca* têm sido realizados já há muitas décadas. Um trabalho pioneiro realizado por Jones (1941) sobre a regulação osmótica de muitas espécies de caranguejos da costa oeste do Oceano Pacífico demonstrou a grande capacidade osmorregulatória (hipo ou hiper-osmorregulação) da espécie *Uca crenulata*. Também, Green et al. (1959), estudando as espécies *Uca pugnax* e *Uca pugilator*, demonstraram experimentalmente que os principais locais de entrada de íons nos chamamés são as brânquias e o estômago e que a osmorregulação é realizada, principalmente,

pelas brânquias e pela glândula antenal. Além destes, estudos mais recentes realizados por Thurman (2002; 2003a,b; 2005) comparam, em relação à capacidade osmorregulatória, várias espécies de chama-marés na região do Golfo do México e da Costa Oeste Norte Americana do Oceano Atlântico. Em seus trabalhos, Thurman relaciona a salinidade do local onde a espécie é encontrada com a capacidade (maior ou menor) da espécie em hipo/hiper-regular a hemolinfa. A partir disto, o autor faz inferências a respeito da evolução e da capacidade de invasão de um novo habitat por um determinado caranguejo chama-maré.

No Brasil, estudos sobre a osmorregulação de *Uca* são inexistentes, além de ainda não existir nenhum trabalho sobre a osmorregulação da espécie *U. maracoani*. Os estudos realizados até o momento, citados acima, focalizaram em grandes períodos de exposição (dias ou semanas) destes animais a salinidades extremamente altas ou baixas, não refletindo exatamente a condição natural em que vivem.

Estresse oxidativo e o sistema de proteção antioxidante

Estresse oxidativo caracteriza-se como um processo celular que ocorre quando há um balanço desproporcional entre agentes oxidantes e antioxidantes intracelulares, tendo os agentes oxidantes potencialidade para danificar organelas e DNA (Halliwell e Gutteridge 1999). Define-se antioxidante como qualquer substância que, mesmo estando em concentrações mais baixas que o substrato oxidável, impeça ou retarde a oxidação deste substrato. Como exemplo, podem ser citadas as enzimas e os substratos antioxidantes intracelulares (Halliwell 1997). Substância oxidante é aquela com potencial de oxidar moléculas celulares, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (EROs).

Enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase, glutathione *S*-transferase) e alguns compostos de baixo peso molecular, tais como a glutathione, o α -tocoferol e o ácido ascórbico são exemplos de moléculas intracelulares capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge 1999; Nowakowska et al. 2009). O ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) são importantes espécies reativas de oxigênio com potencial de oxidar e danificar as organelas da célula (Hermes-Lima 2004). Estas moléculas originam-se a partir do metabolismo aeróbio da respiração celular e são decorrentes da redução incompleta do oxigênio até a molécula de água, durante o processo de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (Storey 1996; Halliwell e Gutteridge 1999). Apesar de seu potencial oxidante, as EROs também são importantes como

moléculas sinalizadoras e mediadoras dos processos de dano celular, tais como a apoptose e a necrose celular (Lesser 2006).

Os biomarcadores são moléculas, células ou fluidos corporais que fornecem uma resposta biológica quando um determinado organismo está fora de suas condições fisiológicas normais, seja devido à presença de poluentes ou devido a modificações físico-químicas de seu habitat (Livingstone 1993; Amorim 2003). Podem ser classificados como biomarcadores de exposição e de efeito. Os biomarcadores de exposição são caracterizados por serem moléculas que atuam de forma atípica quando o animal não está em seu estado fisiológico normal. Estas moléculas podem aumentar ou diminuir suas atividades e isto pode ser quantificado e interpretado. As enzimas antioxidantes Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR) e os substratos (GSH/GSSG) são exemplos de biomarcadores de exposição e podem dar respostas parciais sobre a adaptação do animal em condições de estresse (Regoli e Winston 1998; Winston et al. 1998). Biomarcadores de efeito são definidos como qualquer alteração bioquímica ou fisiológica no organismo que pode afetar o bem estar do animal, em consequência à sua exposição a algum poluente ou fonte de estresse. Como exemplo, podem ser citados os níveis de lipoperóxidos na célula (LPO) e o dano ao DNA, entre outros (Monserrat et al. 2003).

Dentre os biomarcadores de exposição citados acima, as enzimas e substratos envolvidos no mecanismo de atuação da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) podem dar uma resposta parcial de como está o processo de adaptação do animal à nova condição que lhe foi imposta. Glutathione Peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante tetramérica, com um peso molecular de 84 kD e encontrada em animais, plantas e muitas bactérias anaeróbias (Lesser 2006). Ela atua sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros hidroperóxidos orgânicos, reduzindo estas moléculas a formas menos nocivas para a célula. Para sua atuação esta enzima utiliza a forma reduzida de um tripeptídeo (GSH) como co-substrato oxidando-o para a forma GSSG. Esta forma oxidada é novamente reduzida através de uma enzima chamada Glutathione Redutase (GR), que utiliza como doador de elétrons uma molécula de NADPH (Yu 1994; Halliwell e Gutteridge 1999).

A lipoperoxidação (LPO) é um processo que ocorre naturalmente nas células e tem como função a renovação das membranas internas, assim como a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos (Meneghini 1987). Entretanto, quando este processo de lipoperoxidação está elevado, devido principalmente ao estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio, danos podem ocorrer nas membranas celulares. Danos que

envolvem principalmente modificações na fluidez e seletividade das membranas, assim como, alterações na função das proteínas de transporte e canais iônicos que estão ali presentes (Yu 1994). Portanto, a quantificação dos produtos finais do processo de peroxidação lipídica serve como um bom indicador final (biomarcador de efeito) do nível de adaptação do animal a uma certa condição, pois indica a ocorrência ou não de dano oxidativo celular.

Estudos sobre estresse oxidativo em animais são realizados enfatizando-se as respostas das defesas antioxidantes para poluentes aquáticos. Doyotte et al. (1997), estudando o bivalve de água doce *Unio tumidus*, avaliaram a potencial utilidade de parâmetros antioxidantes (enzimas e substratos) como indicadores de exposição ao cobre. Nesta pesquisa, eles observaram que as enzimas GPx, GR e o substrato GSH foram os mais sensíveis a esta exposição. Trabalhos de Livingstone et al. (1990) analisaram o aumento de espécies reativas de oxigênio em moluscos sob condições normais ou sob a exposição ao poluente benzopireno. Neste estudo, os autores observaram aumentos das enzimas antioxidantes, assim como ocorrência de dano oxidativo, nas células da glândula digestiva destes moluscos quando expostos ao poluente. Outros trabalhos de Livingstone também focalizaram na expressão de enzimas antioxidantes em invertebrados expostos a poluentes (Livingstone et al. 1986; Livingstone 1988).

Ainda há pouquíssimos registros de estudos sobre a interação do sistema antioxidante dos animais e a salinidade ou a função da osmorregulação. Kong et al. (2008) estudaram a relação entre as estações do ano e a resposta do sistema de defesa antioxidante no caranguejo *Scylla serrata*, relatando a existência de variações sazonais nas atividades das enzimas antioxidantes e na quantidade de produtos da peroxidação lipídica. Estas variações refletiriam processos fisiológicos adaptativos do organismo para situações de mudanças de temperatura e salinidade que ocorrem ao longo das estações do ano (Kong et al. 2008). A relação entre o sistema antioxidante e a salinidade em animais estuarinos também já foi abordada. Em siris do gênero *Callinectes*, observou-se alta atividade constitutiva da GPx e da catalase em espécie que utiliza o estuário (*C. danae*), e baixa atividade constitutiva, porém aumento da atividade destas enzimas diante de exposição de 2 horas a água hipersalina, em espécie mais restrita ao ambiente marinho (*C. ornatus*) (Togni, Hermes-Lima, Freire, em preparação).

Outros trabalhos realizados entre a relação enzimas antioxidantes e condições abióticas envolvem a interação da anóxia com o estresse oxidativo. Hermes-Lima e Storey (1996), estudando a rã leopardo (*Rana pippiens*), observaram haver um aumento na atividade das enzimas antioxidantes quando estes animais estavam em anóxia. Isto seria uma

característica de animais que passam por períodos temporários de privação de oxigênio, e serviria como uma forma do animal se proteger contra o possível estresse oxidativo decorrente da reperfusão com o oxigênio. Com braquiúros, o trabalho de Oliveira et al. (2005) demonstrou a efetividade e a variedade das respostas antioxidantes no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, quando este era exposto experimentalmente à anóxia ambiental e a diferentes períodos de reoxigenação.

Como já foi demonstrado que alguns braquiúros apresentam respostas do sistema de proteção antioxidante quando são expostos a estresses ambientais (Kong et al. 2008, Oliveira et al. 2005). Esta avaliação também pode fornecer respostas sobre como o animal reage em condições hipo ou hiper-salinas, e se realmente estes desafios osmóticos afetam de forma decisiva a homeostase interna destes caranguejos

Objetivos Gerais

Objetivo 1: Avaliar o comportamento osmorregatório e de regulação iônica das espécies *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax*, diante de exposição por um curto período de tempo (8 horas) a diferentes salinidades experimentais, variando de água doce a água hipersalina.

Objetivo 2: Avaliar as respostas antioxidantes nos órgãos viscerais destes caranguejos quando são expostos por 8 horas a diferentes salinidades experimentais.

Objetivo 3: Avaliar a interação da osmorregulação com o sistema de proteção antioxidante.

Referências Bibliográficas

- Amorim LCA (2003) Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6: 158-170.
- Barnwell FH, Thurman CL (1984) Taxonomy and Biogeography of the fiddler crabs (Ocypodidae, Genus *Uca*) of the Atlantic and Gulf Coasts of Eastern North-America. *Zoological Journal of the Linnean* 81: 23-87.
- Branco JO (1990) Aspectos ecológicos dos Brachyura (Crustacea, Decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC. *Revista Brasileira de Zoologia* 7: 165-179.
- Crane J (1975) Fiddler crabs of the world, Ocypodidae: genus *Uca*. Princeton University, Princeton.
- Colpo KD, Negreiros-Fransozo ML (2004) Comparison of the population structure of the fiddler crab *Uca vocator* (Herbst, 1804) from three subtropical mangrove forests. *Scientia Marina* 68: 139-146.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39: 93-110.
- Foster C, Amado EM, Souza MM, Freire CA (2010) Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A* 313 (2) DOI: 10.1002/jez.575
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC (2003). Adaptative patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 136: 771-778.
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008a) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151: 272-304.
- Freire CA, Amado EM, Souza LR, Veiga MPT, Vitule JRS, Souza MM, Prodocimo V (2008b) Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 149: 435-446.
- Genoni GP (1985) Food limitation in salt marsh fiddler crabs *Uca rapax* (Decapoda, Ocypodidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 87: 97-110.
- Green JW, Harsch M, Barr L, Prosser CL (1959) The regulation of water and salt by the fiddler crabs *Uca pugnax* and *Uca pugilator*. *Biological Bulletin* 116: 76-87.

- Halliwell B (1997) Antioxidants: The Basis – What they are and how to evaluate them. In: Sies H (ed) Antioxidants in diseases: Mechanisms and therapy. Academic Press, California.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.
- Hermes-Lima M, Storey KB (1996) Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology 271: R918-R925.
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Hirose GL, Negreiros-Fransozo LM (2008) Population biology of *Uca maracoani* Latreille 1802-1803 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) on the south-eastern coast of Brazil. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3: 373-383.
- Jones LL (1941) Osmotic regulation in several crabs of the Pacific coast of North America. Journal of Cellular Comparative Physiology 18: 79-92.
- Kirschner LB (1991) Water and Ions. In: Prosser CL (Ed) Environmental and Metabolic Animal Physiology. Comparative Animal Physiology. Wiley-Liss, New York.
- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. Journal of Experimental Biology 207: 1439-1452.
- Kong X, Wang G, Li S (2008) Seasonal variations of ATPase and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). Marine Biology 154: 269-276.
- Lesser MP (2006) Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. Annual Review of Physiology 68: 253-278.
- Livingstone DR, Stickle WB, Kapper M, Wang S (1986) Microsomal detoxication enzyme responses of the marine snail, *Thais haemastoma*, to laboratory oil exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 36: 843-850.
- Livingstone DR (1988) Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. Marine Ecology Progress Series 46: 37-43.
- Livingstone DR, Garcia Martinez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Winston GW (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. Functional Ecology 4: 415-424.

- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring use of molecular biomarker in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57: 195-211.
- MacIntosh DJ (1989) The ecology and physiology of decapods of mangrove swamps. *Symposium Zoological Society* 59: 315-341.
- Masunari S, Swiech-Ayoub BP (2003) Crescimento relativo em *Uca leptodactyla* Rathbun (Crustacea Decapoda Ocypodidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 487-491.
- Masunari S (2006) Distribuição e abundância dos caranguejos *Uca* Leach (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 901-914.
- Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade/FAPESP, São Paulo.
- Meneghini R (1987) A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 5: 57-62.
- Montserrat JM, Geracitano LA, Bianchini A (2003) Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology* 9: 255-269.
- Negreiros-Fransozo ML, Fransozo A, Bertini G (2002) Reproductive cycle and recruitment period of *Ocypode quadrata* (Decapoda, Ocypodidae) at a sandy beach in southeastern Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 22: 157-161.
- Nowakowska A, Swiderska-Kolacz G, Rogalska J, Caputa M (2009) Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 150: 481-486.
- Oliveira UO, Araújo ASR, Belló-Klein A, Silva RSM, Kucharski LC (2005) Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 140: 51-57.
- Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15: 1-60.
- Powers LW, Cole JF (1976) Temperature-variation in fiddler crab microhabitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 21: 141-157.
- Randall DJ, Burggren W, French K (1999) *Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Regoli F, Winston GW (1998) Application of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Marine Environment Research* 46: 439-442.

- Schmidt-Nielsen K (2002) Fisiologia animal – Adaptações e Meio Ambiente. Editora e Livraria Santos, São Paulo.
- Storey K (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1715-1733.
- Thurman CL (2002) Osmoregulation in Six Sympatric Fiddler Crabs (genus *Uca*) from the Northwestern Gulf of Mexico. *Marine Ecology* 23: 269-284.
- Thurman CL (2003a) Osmoregulation by six species of fiddler crabs (*Uca*) from the Mississippi delta area in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291: 233-253.
- Thurman CL (2003b) Osmoregulation in fiddler crabs (*Uca*) from temperate Atlantic and Gulf of Mexico coasts of North America. *Marine Biology* 142: 77-92.
- Thurman CL (2005) A comparison of osmoregulation among subtropical fiddler crabs (*Uca*) from southern Florida and California. *Bulletin of Marine Science* 77: 83-100.
- Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RKH (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 148: 1-80.
- Winston GW, Regoli F, Dugas Jr AJ, Fong JH, Blanchard KA (1998) A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 480-493.
- Yamaguchi T (1977) Studies on the handedness of the fiddler crab *Uca lactea*. *Biological Bulletin* 152: 424-436.
- Yu PB (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74: 139-162.

Capítulo 1

Osmorregulação de três caranguejos do gênero *Uca* (Ocypodidae) de ambientes distintos, diante de exposição de curto prazo a salinidades variando de água doce a água hiper-salina.

Resumo. Três espécies de caranguejos "chama-marés" ocorrem na Baía de Guaratuba, estado do Paraná. A variação salina dos ambientes onde as espécies *Uca maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax* foram coletadas é de respectivamente, 15-25‰, 19-27‰, 0-2‰. As espécies foram submetidas por 8 h a água de diferentes salinidades (0, 10, 20, 30 e 40‰). A osmolalidade e as concentrações dos íons cloreto e sódio na hemolinfa das três espécies foram reguladas, principalmente, entre as salinidades 10‰ e 30‰, mas tenderam a hipo-conformação em 40‰, e hiper-conformação em 0‰ (*U. maracoani* e *U. thayeri*). *Uca mordax*, de ambiente menos salino, manteve a regulação em 0‰. Magnésio e potássio foram regulados em todas as salinidades, pelas 3 espécies: magnésio sempre hiporregulado (exceção em 0‰) e potássio sempre hiper-regulado. A exposição destes chama-marés a salinidades hipo ou hiper-salinas por um curto período de tempo evidenciou capacidade osmo- e íon-regulatória - porém com algumas diferenças - nestes caranguejos de ambientes distintos.

Abstract. Three species of fiddler crabs occur in Guaratuba Bay, State of Paraná. The salinity of the habitats of *Uca maracoani*, *Uca thayeri*, and *Uca mordax* is respectively, 14-32‰, 4-32‰, and 0-6‰. These species have been submitted for 8 hours to water of different salinities (0, 10, 20, 30, and 40‰). Osmolality and the concentrations of the ions chloride and sodium in the hemolymph of the 3 species have been regulated, mainly, between 10 and 30‰, but derived to hypo-conformation in 40‰, and hyper-conformation in 0‰ (*U. maracoani* and *U. thayeri*). *U. mordax*, the species that ranges in the most dilute waters, also regulated in fresh water (0‰). The ions magnesium and potassium were precisely regulated in all salinities, by the 3 species: magnesium always hypo-regulated (exception in 0‰), and potassium always hyper-regulated. The exposure of these fiddler crabs to a wide range of salinities for a short period has shown their osmotic and ionic regulatory capacity, but with differences among the species, compatible with the habitats they occupy.

¹ Artigo formatado conforme normas da revista Marine Biology

Introdução

Caranguejos do gênero *Uca* Leach, 1814 (conhecidos como chama-marés) são crustáceos abundantes em estuários de regiões tropicais e subtropicais do mundo (Crane 1975; Masunari 2006). São animais simpátricos, gregários e que possuem atividade de alimentação e reprodução principalmente durante as marés baixas (Crane 1975). Ao longo da costa marinha brasileira existem cerca de 10 espécies de chama-marés, das quais 7 ocorrem no litoral do Estado do Paraná: *Uca burgersi* Holthuis, 1967, *Uca leptodactyla* Rathbun, 1898, *Uca maracoani* Latreille, 1802-1803, *Uca mordax* Smith, 1870, *Uca rapax* Smith, 1870, *Uca thayeri* Rathbun, 1900 e *Uca uruguayensis* Nobili, 1901 (Melo 1996, Masunari 2006).

Ao longo da Baía de Guaratuba, no litoral paranaense, as espécies de chama-marés *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax* ocupam biótopos com distintas salinidades. *U. maracoani* ocorre na costa brasileira desde o Estado do Maranhão até Santa Catarina e habita substratos lodosos em áreas próximas da entrada de baías, onde a salinidade durante as marés cheias mantém-se alta, em torno de 21‰ (Branco 1990; Melo 1996; Masunari 2006; Hirose 2008). A espécie *U. thayeri* distribui-se mais amplamente que *U. maracoani*, ocorrendo desde o Golfo do México até o Estado de Santa Catarina no Brasil. Este chama-maré ocupa as bordas lamacentas dos manguezais estuarinos, sendo encontrado ao longo de vários biótopos nas baías, suportando variações de salinidade de 4‰ a 31‰ (Branco 1990; Melo 1996; Masunari 2006). Por fim, *U. mordax* apresenta a mesma distribuição geográfica que *U. thayeri*, mas habita regiões com baixas salinidades, bem perto da desembocadura de rios, onde a salinidade varia entre 0‰ a 6‰ (Crane 1975; Melo 1996; Masunari 2006).

Estudos sobre a osmorregulação realizados com este gênero foram feitos principalmente nas regiões subtropicais na costa leste do Oceano Atlântico, no Golfo do México (Baldwin e Kirschner 1976ab; D’Orazio e Holliday 1984; Thurman 2003ab; Thurman 2005). Zanders e Rojas (1996) e Lin et al. (2002) também estudaram algumas espécies deste gênero nas costas venezuelana e asiática, respectivamente. A maioria destes trabalhos focalizou em grandes períodos de exposição das espécies (dias ou semanas) a salinidades experimentais extremamente altas ou baixas, 0‰ a 90‰, simulando situações as quais raramente as espécies enfrentariam em condições naturais. Nestas condições, algumas espécies de chama-marés (*Uca speciosa*, *U. rapax*, *Uca pugilator*, *Uca crenulata*, *U. thayeri*, *Uca formosensis*, *Uca lactea*) se mostraram excelentes osmorreguladores, tanto hiper, quanto hipo-reguladores. Thurman (2005), expondo por cinco dias, em águas hiper ou hiposalinas,

espécies de *U. thayeri* da costa da Flórida e Califórnia, observou a adaptação desta espécie para águas de salinidade baixa ou moderada. Schmidt-Nielsen et al. (1968) examinaram a estrutura e a função das glândulas antenais de espécies de *U. mordax* adaptadas a águas hipo e hiper-salinas, e observaram que a grande habilidade de osmorregulação nesta espécie não é devido à glândula antenal, mas sim a outro tecido corporal. Até o momento nenhum trabalho foi realizado sobre a capacidade osmoregulatória de *U. maracoani*.

Como a capacidade osmoregulatória está relacionada com a salinidade do habitat, formulou-se a hipótese de que a espécie de maior distribuição ao longo da Baía (*U. thayeri*) teria maior capacidade de regulação osmótica que as outras. Além disto, a regulação osmótica a curto prazo em *Ucas* seria diferente daquela já observada a longo prazo? Neste contexto, também é importante mencionar que ainda não existe informação alguma acerca da manutenção da homeostase osmótica em *U. maracoani*. Portanto, este estudo possui dois objetivos principais. Primeiro, observar se há existência da relação entre a salinidade do habitat onde as espécies são coletadas com sua capacidade osmoregulatória. Segundo, observar como os animais se comportam na manutenção da homeostase osmótica durante as primeiras 8 horas de exposição a águas hipo ou hiper-salinas. Estes objetivos buscam mostrar a fisiologia da osmorregulação nestes caranguejos quando completamente submersos por 8 horas, situação que pode ser encontrada por estes animais nas regiões estuarinas, durante as marés altas.

Resultados do presente trabalho não irão somente fornecer novos dados científicos a respeito da regulação osmótica das espécies, mas também ajudarão no entendimento das características fisiológicas das espécies *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax* para as mudanças de salinidade. Além disto, a comparação fisiológica entre *ucas* de águas mais salinas com aqueles de águas menos salinas favorece o entendimento da capacidade de invasão destas espécies a um novo ambiente, por exemplo: a água doce (Freire et al. 2003; 2008b). Análises de tais respostas permitem ainda a compreensão sobre a transição da espécie ancestral de *Uca* para o ambiente terrestre e sobre os diferentes níveis de terrestrialidade encontrados neste gênero.

Materiais e Métodos

Local de estudo

A Bacia Hidrográfica de Guaratuba possui cerca de 1.393 km² de extensão e constitui um dos mais importantes sistemas fluviais da zona litorânea do Estado do Paraná. Ela é formada por rios afluentes que nascem no primeiro planalto paranaense e por dois rios litorâneos, o Descoberto e o Boguaçu (Maack 1968). Nesta respectiva Bacia localiza-se a Baía de Guaratuba, situada entre as coordenadas 48°30'W, 25°50'S e 48°45'W, 25°54'S, e com aproximadamente 40 km². Esta Baía é margeada por manguezais com um bom estado de preservação, além de também possuir baixios e marismas, que são bancos lodosos constituídos pela espécie *Spartina alterniflora* (Poaceae) e que emergem durante a maré vazante. No fundo desta Baía, ocorrem matas de restinga (Masunari 2006).

Coletas dos animais

Caranguejos adultos das espécies *U. thayeri*, *U. maracoani* e *U. mordax* (Decapoda, Ocypodidae) foram capturados à mão, por remoção das tocas, na Baía de Guaratuba, PR, durante as marés baixas de sizígia. A espécie *U. maracoani* foi capturada em um baixio (banco de areia ou lodo que somente fica emerso durante as marés baixas) localizado próximo à área urbana da Baía e denominado popularmente de Baixio-Mirim (48°36'28,9"W e 25°52'23,8"S) (variação da salinidade: 15‰ a 25‰). Exemplos de *U. thayeri* foram coletados em áreas de manguezais em uma região denominada de Ponto de Venda (48°35,205'W e 25°51,213'S) localizada próxima do começo da Baía (variação da salinidade: 19‰ a 27‰). Apesar da espécie *U. thayeri* ter sido coletada em uma região de salinidade elevada, ela difere de *U. maracoani*, pois é encontrada ao longo de toda a baía. Por fim, a espécie *U. mordax* foi coletada em áreas de mata de restinga em uma região chamada de Ilha do Chapeuzinho (48°43'51,9"W e 25°51'21,7"S) localizada bem no interior da Baía (variação da salinidade: 0‰ a 2‰). Os valores das variações da salinidade foram obtidos do trabalho de Masunari (2006).

Após as coletas, os animais eram transportados para o laboratório em Curitiba em caixas de isopor contendo água e lodo do local de coleta de cada espécie. O transporte durava em média 4 horas. Em laboratório, os caranguejos eram aclimatados por 2 ou 3 dias em

aquários que internamente dividiam-se em duas regiões: uma região contendo o lodo dos locais de coleta de cada espécie e uma outra contendo somente água. A salinidade da água utilizada nestes aquários foi de 15‰ para as espécies *U. thayeri* e *U. maracoani* e de 4‰ para a espécie *U. mordax*. A escolha da salinidade 15‰ foi devido ao fato das espécies *U. maracoani* e *U. thayeri* serem estuarinas, e para *U. mordax*, espécie encontrada mais ao interior da baía, a salinidade 4‰ não representaria um fator estressante. Os animais foram alimentados a cada dois dias com uma mistura de camarão seco e flocos de comida de peixe. Durante o período de aclimatação houve poucas mortes de caranguejos, média de quatro a cada 30 animais.

A partir de uma água com salinidade 60‰, obtida através de adição salina em uma água 30‰, foram feitas diluições, com água doce sem cloro (filtrada em carvão ativado e celulose), para se obter as águas de salinidades 10, 20, 30 e 40‰. A água doce (salinidade 0‰) utilizada era água doce da torneira, filtrada (filtros de celulose e carvão ativado). Grupos de 6 caranguejos de cada espécie eram colocados dois a dois em aquários menores (capacidade de três litros) contendo as águas experimentais (0 até 40‰). Após 8 h de exposição nos aquários experimentais, os caranguejos tinham a hemolinfa retirada da hemocele ventral via punção da membrana artropodial da base do último par de pereiópodos com uma seringa. O ciclo de marés na baía é de 6 h e a escolha de 8 h de exposição em nossos experimentos deve-se ao fato de eventualmente ocorrerem ciclos de marés de 8 h na mesma.

A osmolalidade da hemolinfa e das águas experimentais usadas foi determinada em um micro-osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, Logan, EUA). As concentrações dos íons cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{++}) da hemolinfa das espécies foram determinadas por métodos colorimétricos, utilizando-se Kits Labtest e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech. Para os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+), as dosagens foram realizadas em fotômetro de chama monocanal Celm FC 180. Os íons Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} e K^+ presentes nas águas experimentais não tiveram seus valores medidos, mas estes foram estimados proporcionalmente, com base no valor medido de salinidade da água, assumindo-se diluição simples, e tomando como referência as concentrações iônicas da água do mar padrão de Prosser (1973).

Os resultados foram expressos na forma de média e erro padrão. As médias foram comparadas e tiveram suas diferenças testadas por ANOVA ou pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Para o ordenamento das diferenças foi utilizado o teste *pos hoc* de Tukey ou

o teste de Dunn's quando os dados não atendiam ao pré-requisito de normalidade e homogeneidade de variâncias. Diferenças significativas foram aceitas quando $p < 0,05$.

Resultados

Osmolalidade da hemolinfa

A osmolalidade da hemolinfa de *U. maracoani* se manteve constante nos tratamentos 10, 20 e 30‰, havendo queda na osmolalidade em água doce, e aumento quando os caranguejos estavam em água de salinidade 40‰ (Fig. 1A). O valor isosmótico (ISO) para esta espécie, a concentração do meio que iguala com a osmolalidade da hemolinfa, foi estimado em 757 mOsm. Em *U. thayeri*, o valor da osmolalidade da hemolinfa dos caranguejos manteve-se constante ao longo das salinidades 0, 10, 20 e 30‰, mas teve um aumento na salinidade 40‰ (Fig. 1B). O valor estimado da ISO para esta espécie foi de aproximadamente 666 mOsm. Por fim, *U. mordax* manteve o valor constante da osmolalidade da hemolinfa nas salinidades 0‰, 10‰ e 20‰, apresentando um aumento deste valor nas salinidades 30 e 40‰ (Fig. 1C), com o valor da ISO sendo aproximadamente 631 mOsm. Fazendo uma comparação entre as espécies, *U. maracoani* apresentou o valor da osmolalidade da hemolinfa maior do que as outras duas espécies nas salinidades 10 e 20‰.

Sódio

Uca maracoani apresentou pouca variação de sódio na hemolinfa ao longo das salinidades experimentais, enquanto que em *U. thayeri* houve um aumento gradual (Figs. 2A e 2B). Nestas espécies, os valores isoiónicos foram respectivamente, 260 e 268 mM. Em *U. mordax*, o valor deste íon na hemolinfa manteve-se constante nas salinidades 0, 10, 20 e 30‰, mas aumentou quando os animais foram expostos à salinidade 40‰ (Fig. 2C). O valor isoiónico para esta espécie foi de 216 mM. Fazendo a comparação entre as espécies, *U. maracoani* e *U. thayeri*, na salinidade 20‰, tiveram maiores valores de sódio na hemolinfa do que *U. mordax*. Em 30‰, *U. maracoani* apresentou uma maior concentração iônica do que *U. thayeri* (Fig. 2).

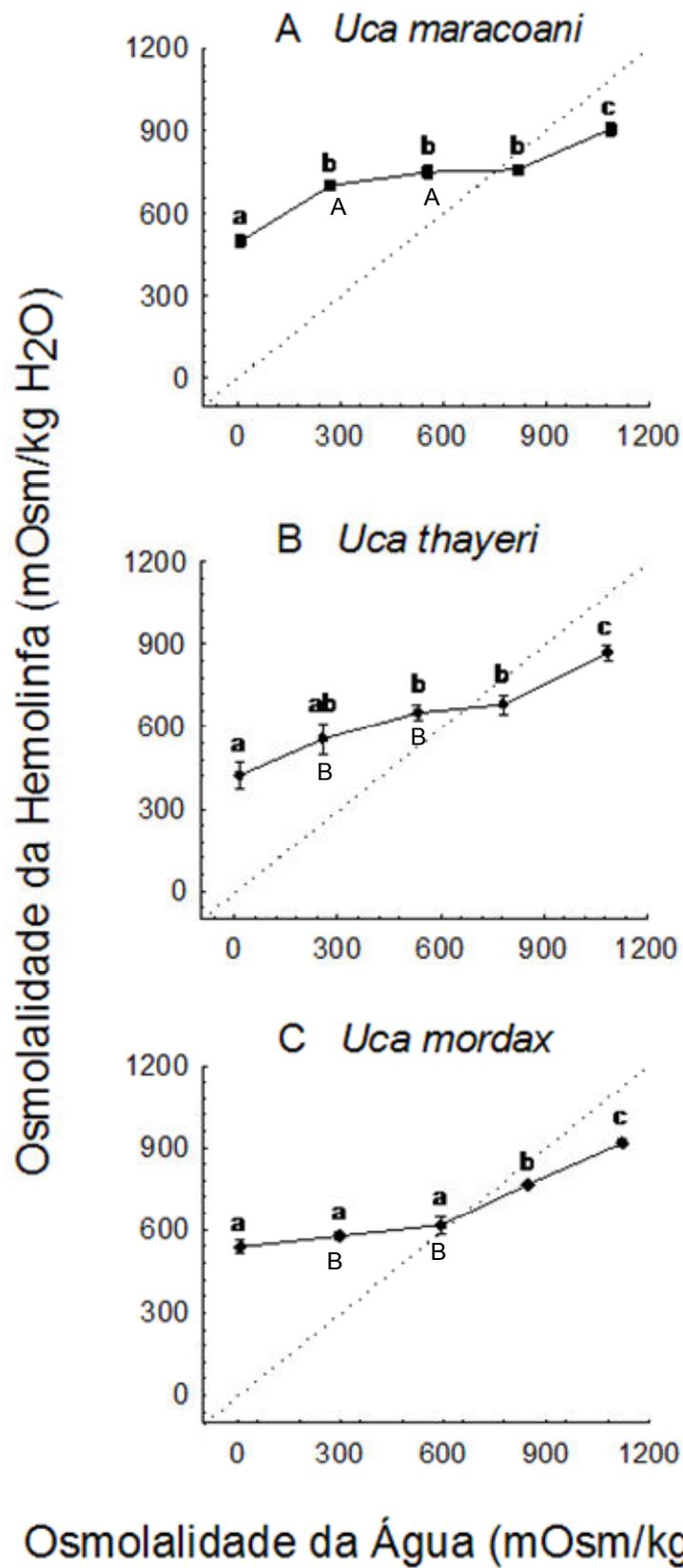


Fig. 1 Osmolalidade da hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isomótica. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças significativas no valor da osmolalidade entre as três espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.

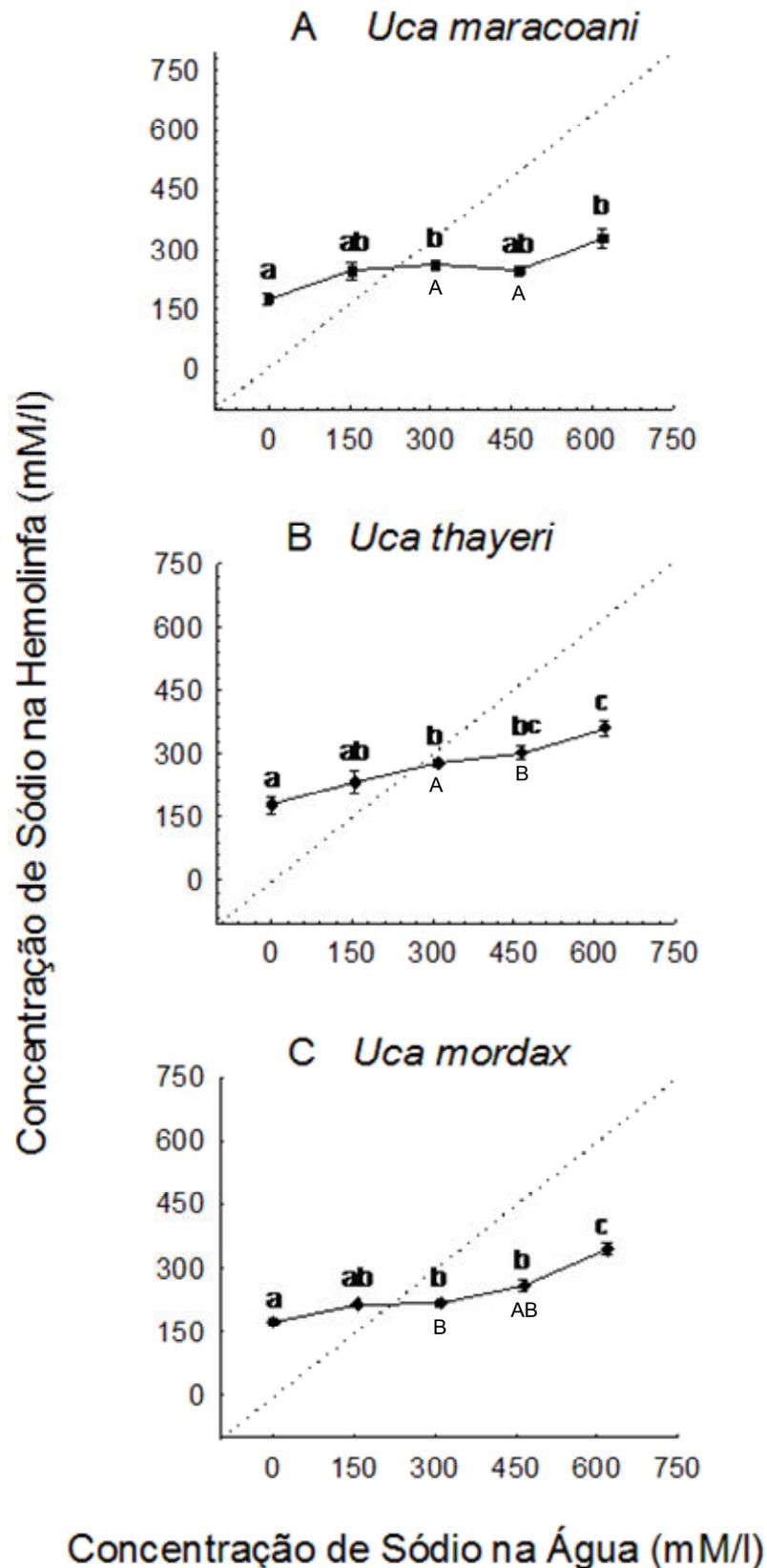


Fig. 2 Concentração de sódio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoiônica. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.

Cloreto

O cloreto da hemolinfa das espécies *U. maracoani* e *U. thayeri* se manteve constante nos tratamentos 10‰, 20‰ e 30‰, havendo queda na concentração deste íon em água doce, e aumento quando os caranguejos estavam em água 40‰ (Figs. 3A e 3B). Nestas espécies, os valores iso-iônicos foram, respectivamente, os seguintes: 337 e 249 mM. *Uca mordax* manteve os valores de cloreto nas salinidades 0‰, 10‰ e 20‰, mas aumentou a concentração iônica em 30‰ e 40‰ (Fig. 3C). Para este caranguejo o valor iso-iônico do cloreto foi 235 mM. Na comparação entre as espécies, nas salinidades 10‰ e 20‰, *U. maracoani* apresentou maior concentração de cloreto na hemolinfa (Fig. 3).

Magnésio

As três espécies variaram pouco na concentração iônica da hemolinfa ao longo das salinidades experimentais, com valores acima da linha iso-iônica apenas em 0‰. Os valores iso-iônicos observados para este íon foram os seguintes: 17 mM para *U. maracoani*, 13 mM para *U. thayeri* e 16 mM para *U. mordax*. Comparando-se entre as espécies, *U. thayeri* apresentou menor valor iônico do que *U. mordax* na salinidade 0‰; e em 30‰, *U. maracoani* teve maiores concentrações de magnésio do que *U. thayeri* (Fig. 4).

Potássio

O potássio, nas três espécies, foi mantido com valores que variaram pouco entre as salinidades, e sempre acima da linha iso-iônica. Observou-se em *U. thayeri* uma tendência ao aumento na concentração deste íon ao longo das salinidades. Na comparação entre os camarões na mesma salinidade, em 0‰ e 20‰, *U. maracoani* apresentou níveis iônicos menores do que *U. mordax* (Fig. 5).

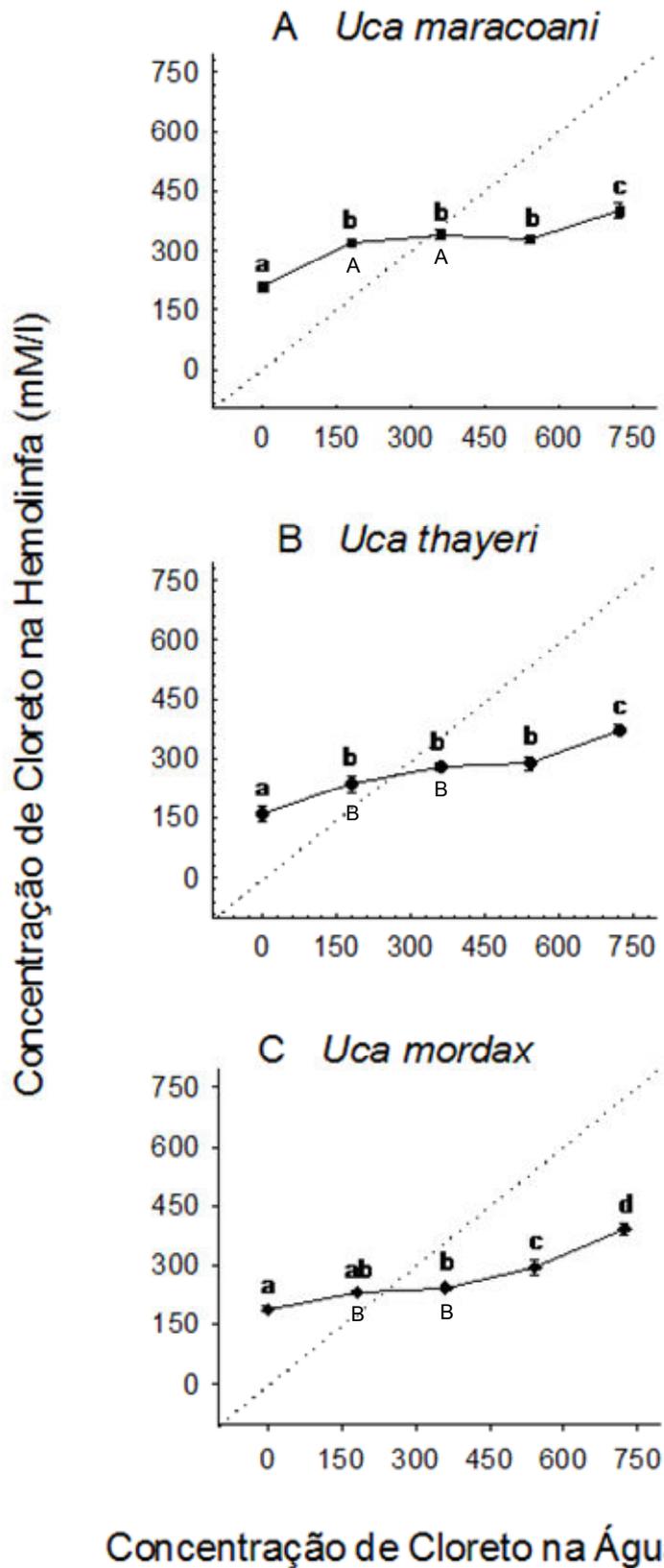


Fig. 3 Concentração de cloreto na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras diferentes maiúsculas indicam diferenças significativas entre as três espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.

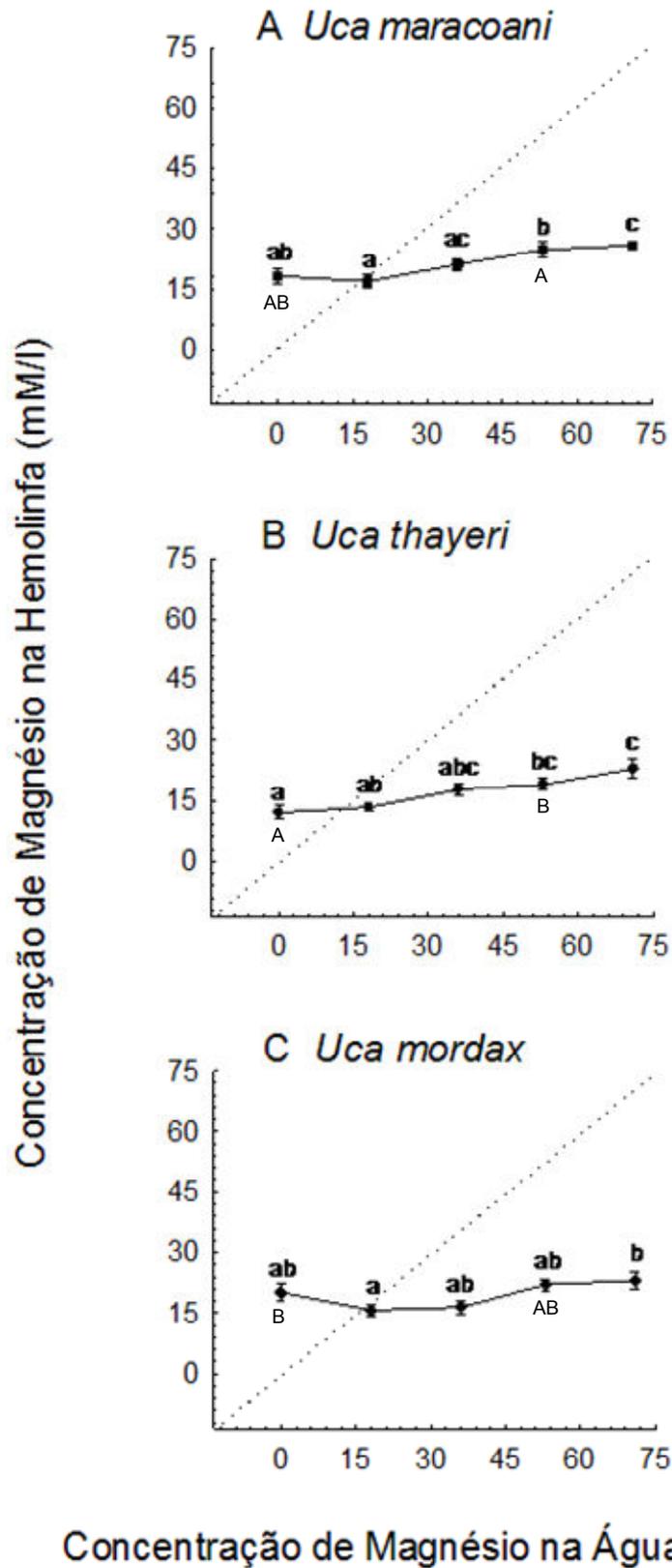


Fig. 4 Concentração de magnésio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40%. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.

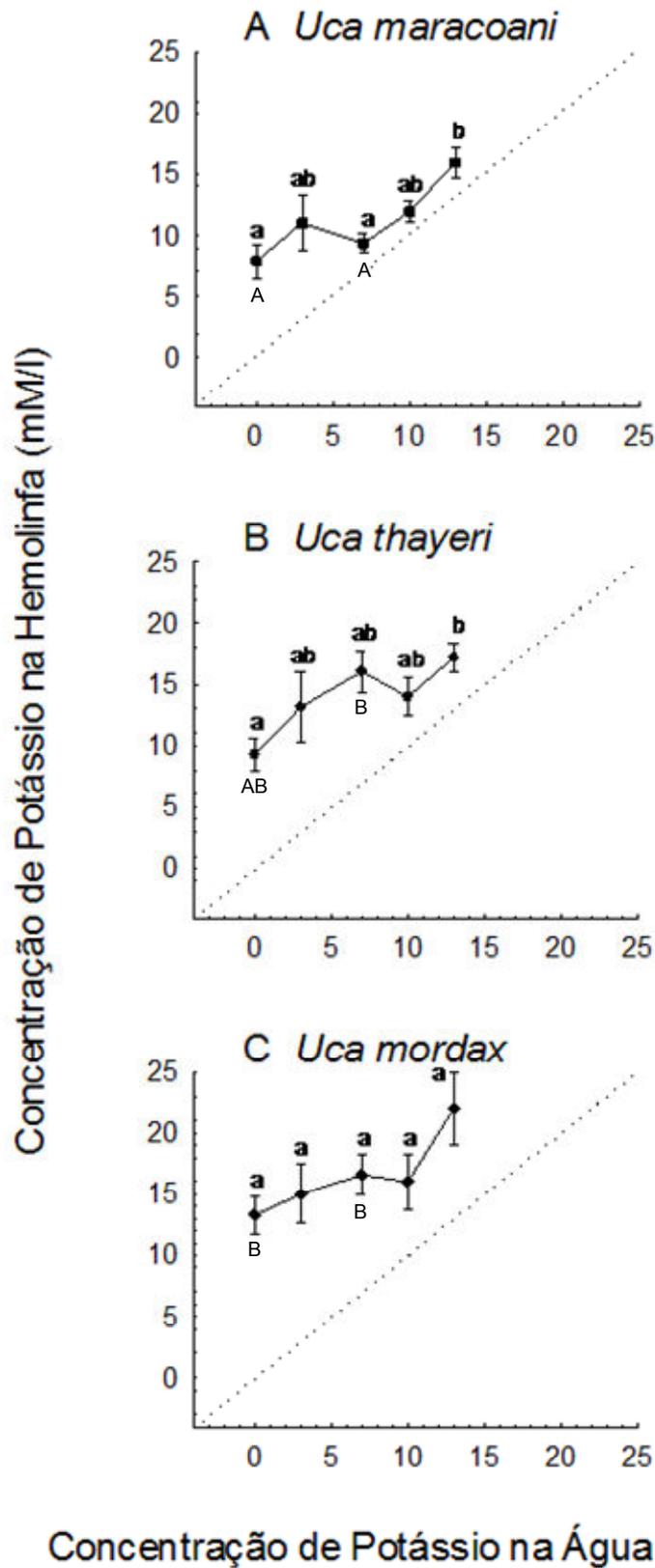


Fig. 5 Concentração de potássio na hemolinfa dos caranguejos chama-marés mantidos por 8 hs nas águas experimentais de salinidade 0, 10, 20, 30 e 40‰. N=12 para cada salinidade experimental. A linha diagonal pontilhada representa a linha isoônica. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas na mesma espécie comparando-se as 5 salinidades. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as espécies na mesma salinidade. Linhas verticais representam erro padrão da média.

Discussão

A osmorregulação de muitas espécies do Subfilo Crustacea, na sua vasta maioria representantes da Ordem Decapoda, tem sido amplamente estudada e revisada (Kirschner 1979; 1991; 2004; Mantel e Farmer 1983; Greenaway 1988; Péqueux 1995; Freire et al. 2008a). Trabalhos sobre a manutenção da homeostase osmótica em caranguejos marinhos conformadores (ex: *Maja* sp e *Cancer pagurus*), em lagostins dulcícolas (ex: *Astacus fluviatilis*) e nas espécies eurialinas *Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus* e *Eriocheir sinensis* permitiram o conhecimento da maioria dos mecanismos de regulação osmótica e iônica nestas espécies, generalizáveis para outros decápodos (Pequeux 1995).

As salinidades das águas a que foram expostas as três espécies de chama-marés variavam, aproximadamente, de 11-1090 mOsm (0‰-40‰). Em *U. maracoani*, ao longo das exposições experimentais, a hemolinfa variou entre 502-906 mOsm, com o animal mantendo a concentração osmótica interna constante entre 10 e 30‰, sendo bem nítida a queda em 0‰ e a elevação em 40‰. Para *U. thayeri*, a osmolalidade da hemolinfa variou entre 422-869 mOsm, e o animal efetuou a regulação osmótica entre as salinidades 0 e 30‰, entretanto com uma aparência de elevação gradual diante do aumento de salinidade, o que pode indicar uma menor capacidade de regulação osmótica nesta espécie. Por fim, *U. mordax* teve a osmolalidade da hemolinfa variando entre 537-917 mOsm, realizando a regulação osmótica entre as salinidades 0 e 20‰.

Zanders e Rojas (1996) observaram a osmorregulação de *U. rapax* entre as salinidades 9‰ e 99‰ quando esta espécie era submetida ao aumento ou diminuição salina gradual. Thurman (2003a), estudando espécies do Golfo do México, demonstrou que os chama-marés *U. spinicarpa*, *U. minax*, *U. panacea*, *U. pugilator*, *U. longisignalis* e *U. rapax* osmorregulam a hemolinfa entre as salinidades 1‰ e 47‰, quando expostos por 7 dias e sendo abruptamente transferidos da salinidade controle para a experimental. Por fim, Lin et al. (2002), observaram que as espécies *U. arcuata*, *U. formosensis*, *U. vocans* e *U. lactea* osmorregularam a hemolinfa entre as salinidades 0 e 60‰, quando estes caranguejos eram expostos por um curto período (0, 1 e 4 h), mas a maioria dos animais regulava a hemolinfa somente entre 0 e 35‰ durante a exposição a longo prazo (dias e semanas). Neste trabalho, observou-se que os animais regularam menos a hemolinfa do que as espécies de estudos anteriores. Este resultados pode ser atribuído a diferenças entre espécies, e possivelmente também ao fato do procedimento experimental ter sido diferente, pois em nosso experimento

os animais foram transferidos de forma abrupta para as salinidades experimentais, ficaram completamente submersos e foram expostos somente por 8 h. Sendo assim, pode-se observar que a regulação osmótica no gênero *Uca* varia conforme o tempo (horas ou dias) e o tipo de transferência (abrupta ou gradual) para uma nova condição. Além disto, como demonstrado por D'Orazio e Holliday (1984), manter os caranguejos completamente submersos nas salinidades experimentais influencia negativamente nas suas capacidades osmorregulatórias, principalmente no mecanismo de hipo-osmorregulação.

Observou-se também, neste trabalho, tendência à hipo-osmoconformação da hemolinfa quando estes chama-marés foram expostos a águas hipersalinas, acima de 30‰. A hipo-osmoconformação aparece quando o animal é submetido aos limites superiores de sua capacidade de regulação ativa (Kirschner 1991; Randall et al. 2000; Freire et al. 2003). A partir de uma salinidade alta, por exemplo 40‰, alguns crustáceos podem deixar de osmorregular a hemolinfa e passam a osmoconformá-la, aumentando o valor da concentração osmótica interna conforme a variação do meio. Como isto se processa em salinidades altas, diz-se hipo-osmoconformação, pois apesar do animal osmoconformar, ele ainda mantém valores internos de concentração osmótica significativamente menores que os valores externos.

Contudo, a maioria dos trabalhos que lidaram com osmorregulação de chama-marés demonstraram que estes crustáceos são excelentes hipo-osmorreguladores (Green et al. 1959; Baldwin e Kirschner 1976ab; D'Orazio e Holliday 1984; Wright et al. 1984; Holliday 1985; Zanders e Rojas 1996; Lin et al. 2002; Thurman 2002, 2003ab, 2005). Jones (1941) e Thurman (2002) inferiram que a hipo-osmorregulação foi de grande importância para o desenvolvimento da terrestrialidade nestes animais, pois ela manteria a pressão osmótica interna constante durante a exposição ao ar. Além disto, em relação à evolução do gênero, Baldwin e Kirschner (1976a) propuseram que o provável ancestral do gênero habitava alguma porção de água marinha diluída e que desenvolveu ao longo das gerações, devido ao processo evolutivo e adaptativo, baixas concentrações iônicas nos fluidos corpóreos. Esta característica resultou em uma diminuição do gradiente de concentração entre a hemolinfa e o meio externo, favorecendo aos animais terem uma maior economia energética, pois o gasto com a osmorregulação seria diminuído. Esta capacidade de manter a hemolinfa com uma baixa osmolalidade (hipo-osmorregulação) teria se mantido conforme as espécies foram se irradiando e se adaptando a áreas mais hipersalinas. Portanto, o fato de caranguejos do gênero

Uca realizarem hipo-osmorregulação em águas mais salinas, pode ser um indicativo de um ancestral de águas hiposalinas.

A hipo-osmoconformação observada nos chama-marés do presente estudo evidenciou haver nestas espécies outras adaptações fisiológicas, além da regulação osmótica, as quais provavelmente ocorrem quando o animal está submerso dentro de sua toca, durante um ciclo de maré alta em seu ambiente natural. Thurman (2005) comparando diferentes populações de *U. speciosa*, no Sul da Flórida e Califórnia, observou diferenças na capacidade osmorregulatória entre uma população que ocorria em águas estuarinas e uma outra em águas hipersalinas. Durante uma exposição de 5 dias em salinidades que variavam de 26 a 3550 mOsm, Thurman observou que a população que vivia nas águas estuarinas (salinidade entre 10 e 20‰) demonstrava uma maior capacidade de tolerância para um estresse hiposalino do que a população das regiões hipersalinas. Com isso, Thurman concluiu que *U. speciosa* possui a habilidade para modificar a permeabilidade e os sistemas de transporte de membrana em adaptação para um crônico estresse osmótico de 5 dias. Entretanto, para somente 8 h de exposição como neste estudo, talvez, o primeiro mecanismo de adaptação destas espécies seja a diminuição do metabolismo e a não realização do processo de hipo-osmorregulação. O fechamento das câmaras branquiais, locais de grande permeabilidade no animal, pode ser o principal mecanismo fisiológico realizado nestas condições (Willmer et al. 2000). Corroborando esta idéia, a observação de mínima movimentação dos chama-marés nos aquários com águas 40‰, durante os experimentos, pode ser um indicativo de menor taxa metabólica. Nos outros aquários (10‰ a 30‰), os animais se mostravam agitados e sempre tentando alcançar a superfície da água. Portanto, o tempo de exposição às salinidades experimentais mostrou-se uma variável de grande importância para o tipo de estratégia de manutenção da homeostase osmótica apresentada pelos chama-marés. São necessárias mais pesquisas sobre a adaptação destes crustáceos expostos a salinidades hipo ou hipersalinas por um curto período de tempo, principalmente estudos que envolvam medidas de taxas respiratórias, os quais podem ser realizados com os animais completamente submersos em água ou não.

Houve estatisticamente um maior valor da osmolalidade nas salinidades 10‰ e 20‰ de *U. maracoani* quando comparado com os outros dois chama-marés. Os valores isosmóticos das três espécies foram os seguintes: 750 mOsm para *U. maracoani*, 657 mOsm para *U. thayeri* e 630 mOsm para *U. mordax*. Portanto, os valores isosmóticos foram coerentes com a distribuição das espécies ao longo do interior da Baía e com a hipótese de redução do

gradiente osmótico entre a hemolinfa e o meio externo. Thurman (2005) estudando uma população de *U. thayeri* ao sul da Flórida, encontrou um valor isosmótico relativamente alto para esta espécie (820 mOsm), entretanto sugeriu sua preferência por águas de salinidade baixa ou moderada, entre 0 e 20‰.

As três espécies mantiveram o íon sódio em concentrações mais altas nas salinidades 0‰ e 10‰. *Uca maracoani* mostrou um padrão de regulação iônica ao longo de todas as salinidades, diferindo do padrão observado para a osmolalidade. Isto pode significar algum mecanismo de regulação específica deste osmólito para esta espécie. Mais estudos devem ser realizados, a fim de se esclarecer este padrão apresentado por *U. maracoani*. *Uca thayeri* apresentou um modelo de regulação similar ao da osmolalidade, com regulação iônica nas salinidades 20 e 30‰. Por fim, *U. mordax* também apresentou um modelo parecido ao da osmolalidade, entretanto, demonstrando uma fraca regulação nas salinidades mais baixas, 0, 10, 20‰ e tendendo a conformação a partir da salinidade 30‰. Estes resultados já eram esperados, já que o íon sódio, juntamente com o cloreto, representam os osmólitos de maior concentração nos fluidos extracelulares dos animais e, portanto, seguem o padrão observado na osmolalidade.

Uca maracoani e *U. thayeri* apresentaram regulação iônica de cloreto entre as salinidades 10 e 30‰, seguindo basicamente o padrão observado para a regulação da osmolalidade. Isto já era esperado, pois o cloreto é um dos íons de maior concentração na hemolinfa destes animais. *Uca mordax* apresentou uma menor capacidade de regulação deste íon, mostrando uma baixa regulação entre as salinidade 0 e 20‰ e tendência a hipo-conformação a partir de 20‰. Estes resultados também são coerentes com a distribuição espacial destes chama-marés ao longo da Baía de Guaratuba, pois o fato de *U. mordax* apresentar tendência à hipo-conformação do cloreto a partir da salinidade 20‰ e uma fraca regulação nas salinidades mais baixas (0 e 10‰) é um indicativo de adaptação desta espécie para regiões menos salinas.

As três espécies hiper-regularam o magnésio somente na salinidade 0‰ e hipo-regularam nas salinidades 20‰ até a 40‰. Esta forte hipo-regulação é similar ao resultado encontrado por Wright et al. (1984) para as espécies *Uca minax*, *Uca pugnax* e *Uca pugilator*. Além disto, este modelo de regulação do magnésio também é característico de muitos outros crustáceos, envolvendo a ultrafiltração do íon pela glândula antenal e sua secreção dentro da urina (Riegel e Lockwood 1961; Gross e Capen 1966; Zanders 1978, 1980; Freire et al

2008a). Este íon serve de cofator para muitas enzimas intracelulares e, portanto sua variação é controlada ao máximo a fim de manter a homeostase do animal (Freire et al. 2003; 2008a).

O íon potássio na hemolinfa das três espécies foi hiper-regulado em todos os tratamentos. Estes resultados concordam com os achados de Wright et al. (1984), que observaram em *U. pugilator* e *U. minax* concentrações hiper-iônicas de potássio em relação ao meio externo, ao longo de uma ampla variação de salinidade. De acordo com Roy et al. (2007), a manutenção do equilíbrio deste íon dentro do corpo do animal (regulação iônica) é necessária para o adequado funcionamento dos potenciais de membrana celulares. Além disto, a hiper-regulação observada nas espécies em todas as salinidades testadas pode ser devido à função cardíaca, pois estudos com mamíferos demonstram que a hipocalemia (baixos teores de potássio no sangue) interferem nos batimentos do coração e podem levar à morte (Helfant 1986; Romano 2007). Observou-se também, em *U. maracoani*, uma menor concentração de potássio durante a exposição às salinidades 0‰ e 20‰ quando comparado com as outras duas espécies. A partir destes resultados, mais estudos devem ser realizados sobre a regulação do potássio em caranguejos do gênero *Uca*, pois ainda conhece-se pouco da relação da concentração iônica na hemolinfa com o ambiente e habitat dos animais.

Antes do presente estudo, havia muito pouca informação sobre a regulação osmo-iônica em *U. mordax*, existindo apenas o trabalho de Schmidt-Nielsen et al. (1968), o qual demonstrou a estrutura e função das glândulas antenais desta espécie. Nossos resultados, apesar de refletirem a distribuição espacial das espécies ao longo da Baía, demonstraram que as diferenças entre a regulação osmótica de *U. mordax* e as outras duas espécies são sutis, indicando que a maior penetração de *U. mordax* em águas hiposalinas pode não ser devido a um superior poder osmorregulatório, pois as outras duas espécies não morreram quando expostas à salinidade 0‰ (pelo menos após 8 h), mas sim hiper-osmorregularam ou hiper-osmoconformaram a hemolinfa. Além disto, o padrão de regulação osmótica e iônica demonstrado pela espécie *U. thayeri* indica que esta espécie é um osmorregulador fraco e que talvez a maior invasão aos habitats mais hiposalinos seja devido a fatores ecológicos, ou então a maior capacidade de realizar regulação isosmótica intracelular (RII).

Referências

- Baldwin G, Kirschner LB (1976a) Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 175% sea water. *Physiological Zoology* 49: 158-171.
- Baldwin G, Kirschner LB (1976b) Sodium and chloride regulation in *Uca* adapted to 10% sea water. *Physiological Zoology* 49: 172-180.
- Branco JO (1990) Aspectos ecológicos dos Brachyura (Crustacea, Decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC. *Revista Brasileira de Zoologia* 7: 165-179.
- Crane J (1975) Fiddler crabs of the world, Ocypodidae: genus *Uca*. Princeton University, Princeton.
- D'Orazio SE, Holliday CH (1984) Gill Na, K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiological Zoology* 58: 364-373.
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC (2003) 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.
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008a) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151: 272-304.
- Freire CA, Amado EM, Souza LR, Veiga MPT, Vitule JRS, Souza MM, Prodocimo V (2008b) Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 149: 435-446.
- Greenaway P (1988) Ion and water balance. In: Burggren WH, McMahon BR (eds) *Biology of the land crabs*. Cambridge University, New York, pp 211-248.
- Green JW, Harsch M, Barr L, Prosser CL (1959) The regulation of water and salt by the fiddler crabs *Uca pugnax* and *Uca pugilator*. *Biological Bulletin* 116: 76-87.
- Gross WJ, Capen RL (1966) Some functions of the urinary bladder in a crab. *Biological Bulletin (Woods Hole)* 131: 272-291.
- Helfant RH (1986) Hypokalemia and arrhythmias. *American Journal of Medicine* 80: 13-22.
- Hirose GL, Negreiros-Franozo LM (2008) Population biology of *Uca maracoani* Latreille 1802-1803 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) on the south-eastern coast of Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3: 373-383.
- Holliday CW (1985) Salinity-induced changes in gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *Journal of Experimental Zoology* 23: 199-208.
- Jones LL (1941) Osmotic regulation in several crabs of the Pacific coast of North America. *Journal of Cellular Comparative Physiology* 18: 79-92.
- Kirschner LB (1979) Control mechanisms in crustaceans and fishes. In Gilles R (ed) *Mechanisms of osmoregulation in animals*. Wiley Interscience, New York, pp 157-222.
- Kirschner LB (1991) Water and Ions. In: Prosser CL (Ed) *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Comparative Animal Physiology. Wiley-Liss, New York.
- Kirschner LB (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology* 207: 1439-1452.
- Lin H-C, Su Y-C, Su S-C (2002) A Comparative Study of Osmoregulation in Four Fiddler Crabs (Ocypodidae: *Uca*). *Zoological Science* 19: 643-650.
- Maack R (1968) *Geografia física do Estado do Paraná*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Mantel LH, Farmer LL (1983) Osmotic and ionic regulation. In: Bliss DE (ed) *The Biology of Crustacea: internal anatomy and physiological regulation*, vol 5. Academic, New York, pp 53-161.

- Masunari S (2006) Distribuição e abundância dos caranguejos *Uca* Leach (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 901-914.
- Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. Plêiade/FAPESP, São Paulo.
- Péqueux A (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15: 1-60.
- Prosser CL (1973) *Comparative Animal Physiology*. WB Saunders Co, Philadelphia.
- Randall D, Burggren W, French K (2000) *Fisiologia animal: mecanismos e adaptação*. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro.
- Riegel JA, Lockwood APM (1961) The role of the antennal gland in the osmotic and ionic regulation of *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology* 38: 491-499.
- Romano N, Zeng C (2007) Effects of potassium on nitrate mediated alterations of osmoregulation in marine crabs. *Aquatic Toxicology* 85: 202-208.
- Roy LA, Davis DA, Saoud IP, Henry RP (2007) Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. *Aquaculture Nutrition* 13: 104-113.
- Schmidt-Nielsen B, Gertz KH, Davis LE (1968) Excretion and ultrastructure of the antennal gland of the fiddler crab *Uca mordax*. *Journal of Morphology* 125: 473-496.
- Thurman CL (2002) Osmoregulation in Six Sympatric Fiddler Crabs (genus *Uca*) from the Northwestern Gulf of Mexico. *Marine Ecology* 23: 269-284.
- Thurman CL (2003a) Osmoregulation by six species of fiddler crabs (*Uca*) from the Mississippi delta area in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291: 233-253.
- Thurman CL (2003b) Osmoregulation in fiddler crabs (*Uca*) from temperate Atlantic and Gulf of Mexico coasts of North America. *Marine Biology* 142: 77-92.
- Thurman CL (2005) A comparison of osmoregulation among subtropical fiddler crabs (*Uca*) from southern Florida and California. *Bulletin of Marine Science* 77: 83-100.
- Willmer P, Stone G, Johnston I (2000). *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science, Oxford.
- Wright DA, Zanders IP, Pait A (1984) Ionic regulation in three species of *Uca*: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 78: 175-179.
- Zanders IP (1978) Ionic regulation in the mangrove crab *Goniopsis cruentata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 60A: 293-302.
- Zanders IP (1980) The control of magnesium and sulphate in *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 66A: 293-302.
- Zanders IP, Rojas WE (1996) Osmotic and ionic regulation in the fiddler crab *Uca rapax* acclimated to dilute and hypersaline seawater. *Marine Biology* 125: 315-320.

Capítulo 2

Exposição de curto-prazo à água doce e hiper-salina e a defesa antioxidante em caranguejos semi-terrestres (*Uca*, Ocypodidae)

Resumo

A atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e a quantificação do substrato antioxidante GSH e dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LPO) foram estudados nos caranguejos chama-marés *Uca maracoani*, *Uca thayeri* e *Uca mordax*, que habitam ambientes de regimes salinos distintos na Baía de Guaratuba, Paraná. Os caranguejos foram expostos às salinidades 0, 10, 20, 30 e 40‰ por um período de 8 h. A enzima GPx apresentou a relação mais evidente com a salinidade de exposição dos caranguejos, e houve resposta distinta entre as 3 espécies (as outras enzimas também mostraram relação com a salinidade) A atividade da GPx em *U. maracoani* e *U. thayeri* foi maior nas salinidades intermediárias e menor nas extremas (0 e 40‰). *Uca maracoani* ocupa ambientes de salinidade mais elevada, e *U. thayeri* é o mais eurihalino dos três, ocupando ambientes de salinidades variáveis. *Uca mordax*, que habita as porções internas da Baía, com baixas salinidades, apresentou atividade mínima da GPx em 10‰; na salinidade mais alta (40‰), a GPx não conseguiu evitar o aumento na LPO. O desafio salino experimental não foi suficiente para causar dano oxidativo nas vísceras das duas espécies de ambiente mais salino.

Abstract

The specific activity of the enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), besides the quantification of the antioxidant substrate GSH, and the levels of lipidic hydroperoxides (LPO) have been investigated in the fiddler crabs *Uca maracoani*, *Uca thayeri*, and *Uca mordax*, which inhabit distinct environments in terms of salinity, in Guaratuba Bay, State of Paraná. The crabs have been exposed to an acute (8 hours) saline challenge (salinities 0, 10, 20, 30, and 40‰). The enzyme GPx displayed the most evident

² Artigo formatado conforme normas da revista Comparative Biochemistry and Physiology B

relationship with the salinity of exposure of the different crabs. GPx activity in *U. maracoani* and *U. thayeri* was higher in the intermediary salinities, and decreased in the extreme salinities (0 e 40‰). *U. maracoani* occupies areas of higher salinities, and *U. thayeri* is considered the most euryhaline of the 3 species, ranging in widely varied habitats in terms of salinity. *U. mordax*, which lives in the most internal areas of the Bay, of lower salinities, displayed minimal GPx activity in 10‰; in the highest salinity (40‰), GPx could not prevent the high level of LPO. The saline challenge was not sufficient to cause oxidative damage (LPO) in the soft tissues of the two crabs of more saline habitats.

1. Introdução

As variações de salinidade nos estuários influenciam as características fisiológicas e metabólicas dos crustáceos (Vitale et al., 1999; Bianchini et al., 2008; Martins e Bianchini, 2009), como a taxa respiratória (Lucu e Pavieie, 1995; Piller et al., 1995; Brown e Terwillinger, 1999; Setiarto et al., 2004). Muitos trabalhos que demonstram esta variação de taxa respiratória, medida através do consumo de oxigênio, foram feitos com espécies de crustáceos expostos a águas hiper ou hipo-salinas. Piller et al. (1995) estudando os siris eurihalinos *Callinectes sapidus* e *Callinectes similis*, observaram que a taxa de consumo de oxigênio nas brânquias posteriores aumentava quando expostos a baixas salinidades. Setiarto et al. (2004) também demonstraram mudanças na taxa respiratória do camarão *Marsupenaeus japonicus* quando exposto a diferentes salinidades.

Mudanças na taxa respiratória, em decorrência das variações de salinidade, influenciam diretamente a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas nas células e que atuam no processo de estresse oxidativo (Martins e Bianchini, 2009). Estas moléculas (EROs) originam-se a partir do metabolismo aeróbio da respiração celular e são decorrentes da redução incompleta do oxigênio até a molécula de água, durante o processo denominado de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (Storey, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999). As espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido O_2^- , o peróxido de hidrogênio H_2O_2 e o radical hidroxila OH^\cdot causam danos às células, pois são agentes oxidantes muito potentes e agem principalmente na peroxidação das membranas lipídicas e na modificação estrutural de biomoléculas como proteínas e DNA (Darr e Fridovich 1994; Popovic et al., 2009).

Enzimas antioxidantes (catalase, glutationa peroxidase, glutationa *S*-transferase) e alguns compostos de baixo peso molecular, tais como a glutationa, o α -tocoferol e o ácido ascórbico, são moléculas intracelulares capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Nowakowska et al., 2009). O mecanismo de ação da enzima antioxidante Glutaciona Peroxidase (GPx) é dependente do substrato GSH e da enzima Glutaciona Redutase (GR) intracelular. Esta reação consiste na redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido durante o metabolismo aeróbio a duas moléculas de água ($2H_2O$) e é de extrema importância para a proteção da célula contra o dano oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Hermes-Lima, 2004).

As defesas antioxidantes dos crustáceos estuarinos já foram muito estudadas, particularmente em decápodos (Oliveira, 2005; Kong, 2008; Martinez, 2009; Wang, 2009). Oliveira et al. (2005) estudaram os efeitos da anóxia e reoxigenação sobre o balanço oxidativo nas brânquias de *Chasmagnathus granulata*. Kong et al. (2008) pesquisaram os efeitos da sazonalidade na atividade das enzimas antioxidantes das brânquias de *Scylla serrata*. Entretanto, ainda nada é conhecido sobre as defesas antioxidantes dos caranguejos do gênero *Uca*, especialmente sobre a adaptabilidade destas defesas a ciclos naturais de variação de salinidade em regiões estuarinas. Para outros animais a maioria dos estudos tem sido realizado enfatizando as respostas das defesas antioxidantes para poluentes aquáticos (Livingstone et al., 1986; Livingstone, 1988; Livingstone et al., 1990; Prakash e Rao, 1995).

O estudo da atividade das enzimas e substratos antioxidantes dos animais estuarinos é de grande relevância para a caracterização das respostas destes animais às mudanças naturais de salinidade, disponibilidade de oxigênio e temperatura que ocorrem nestas regiões. A partir disso, futuramente poderão ser feitas relações entre o sistema de proteção antioxidante de espécies de áreas poluídas com aquelas de áreas não poluídas.

Como a atuação do sistema antioxidante é influenciada pela salinidade, nós hipotetizamos que espécies de regiões mais salinas ou estuarinas apresentariam diferenças na atuação do sistema de proteção antioxidante em relação a espécies de regiões hiposalinas. Sendo assim, este estudo investigou os efeitos da salinidade, variando da água doce até água do mar hiper-salina (0 até 40‰), em curto tempo de exposição (horas) sobre a atividade das enzimas GPx e GR, sobre o GSH e produtos da peroxidação lipídica, nos caranguejos semi-terrestres da família Ocypodidae, do gênero *Uca*: *U. maracoani*, *U. thayeri* e *U. mordax*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Captura dos caranguejos e aclimação

Caranguejos adultos da espécie *U. maracoani* ($n = 60$; largura da carapaça: $2,43 \pm 0,05$ cm) no estágio de intermuda foram coletados em um baixio (banco de areia estuarino que somente fica emerso nas marés bem baixas) denominado Baixio Mirim ($48^{\circ}36'W$ e $25^{\circ}52'S$), situado na Baía de Guaratuba, um importante sistema estuarino da zona litorânea do Paraná, no município de Guaratuba, PR. Os caranguejos da espécie *U. thayeri* ($n = 60$; largura da carapaça: $1,71 \pm 0,02$) também foram coletados na Baía de Guaratuba, em um manguezal denominado, popularmente, de Ponto de Venda ($48^{\circ}35,205'W$ e $25^{\circ}51,213'S$). A última espécie, *U. mordax* ($n = 63$; largura da carapaça: $1,57 \pm 0,02$), foi coletada em uma região de mangue denominada Ilha do Chapeuzinho ($48^{\circ}43,834'W$ e $25^{\circ}51,330'S$), localizada no interior da mesma baía. Os caranguejos foram transferidos para o laboratório e colocados em aquários com água a 15‰ (*U. maracoani* e *U. thayeri*), ou 4‰ (*U. mordax*) por pelo menos quatro dias antes dos experimentos, em fotoperíodo natural. Os aquários de aclimação internamente dividiam-se em duas regiões: uma região contendo o lodo dos locais de coleta de cada espécie e uma outra contendo somente água. Portanto, os animais podiam se movimentar livremente entre uma região coberta com água e outra sem. Isto foi adotado para simular o ambiente natural dos caranguejos, pois são animais semi-terrestres. A água dos aquários era continuamente aerada, além de ser trocada todo dia. A temperatura da água e do sedimento dos aquários de aclimação variou entre $21^{\circ}C$ e $25^{\circ}C$. Os animais foram alimentados a cada dois dias com uma mistura de camarão seco e flocos de comida de peixe.

2.2. Experimento

Quinze aquários de vidro (20 x 15 x 10 cm, volume de água de 3 litros) contendo águas das salinidades experimentais (pH aproximado: 7,4) foram preparados, e dois caranguejos eram colocados em cada aquário. Os aquários 1, 2 e 3 continham água de salinidade 0‰, os numerados de 4 até 6 continham águas com salinidade 10‰, e assim por diante, até a salinidade de 40‰. Este processo experimental foi realizado em duplicata, com duas coletas de cada espécie de *Uca*, e o número total de caranguejos de cada espécie

utilizado foi de 60. *Uca maracoani* e *U. thayeri* foram coletados nos dias 01/12/2008 e 13/03/2009, enquanto que *U. mordax* nos dias 07/05/2009 e 07/07/2009. A salinidade das águas dos aquários experimentais foi monitorada ao longo das 8 horas de exposição usando um refratômetro (RTS-101ATC Instrutherm, São Paulo, Brasil) e a taxa de sobrevivência dos caranguejos também foi monitorada durante os experimentos.

Após as 8 horas de exposição experimental, os animais foram retirados dos aquários e colocados em gelo por aproximadamente 5 minutos para serem anestesiados. Feito isto, os caranguejos eram retirados do gelo, medidos na largura da carapaça e tinham as vísceras retiradas para as análises de atividade das enzimas GPx e GR, quantificação do substrato GSH e dos produtos da peroxidação lipídica - LPO.

2.3. Preparação das amostras

Após as carapaças dos caranguejos serem abertas e as vísceras corporais (todo o tecido mole dos animais, exceto as brânquias) serem retiradas, estas eram pesadas (~ 0,114 gr) e homogenizadas, usando um micro-homogenizador, em tampão fosfato de potássio na proporção de 1:5 (1 mg de tecido úmido: 5 ml de tampão) para a espécie *U. maracoani* e 1:10 (1 mg de tecido úmido: 10 ml de tampão) para as outras duas espécies. Posteriormente, os homogenizados foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 x g em centrífuga refrigerada a 4°C, o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer -80°C para as dosagens posteriores.

2.3.1. Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade total da enzima glutathione peroxidase (GPx dependente e independente de selênio) foi determinada de acordo com Sies et al. (1979), baseando-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG), catalisada pela enzima Glutathione Redutase (GR), em presença de NADPH.

O extrato enzimático armazenado a -80°C foi descongelado e mantido no gelo, enquanto dois meios de reações eram preparados. O meio de reação 1 era composto de tampão fosfato de sódio (0,1 mM, pH 7,0), azida sódica (NaN₃, 0,2 mM), NADPH (0,2 mM), GR (1 U/ml) e GSH (2 mM). O meio de reação 2 era composto somente de uma solução de H₂O₂ (1,5 mM de H₂O₂ + tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0). Nos primeiros poços da microplaca foram pipetados 10 µl de branco, constituído somente pelo tampão fosfato, e nos

outros poçinhos eram colocados 10 μl de amostra. Em seguida, eram acrescentados 130 μl de meio de reação 1 e aguardava-se 2 minutos. Decorrido este tempo, acrescentava-se 60 μl do meio de reação 2 e imediatamente era feita a leitura, a qual foi realizada a 340 nm a cada 10 segundos, durante 2 minutos, medindo-se assim a taxa de decréscimo na absorbância. O resultado da atividade enzimática foi expresso em $\text{nmol.mgprotein}^{-1}\text{min}^{-1}$.

2.3.2. *Glutathione Redutase (GR)*

A atividade específica da enzima Glutathione Redutase foi realizada segundo o método descrito por Sies et al. (1979). Em microplaca foi pipetado 50 μL de amostra e em seguida adicionado o meio de reação que consistia em 5 mM de glutathione oxidada (GSSG), 5 mM de EDTA, 0,5 mM de NADPH e 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,6). O consumo de NADPH foi monitorado pelo decréscimo da absorbância a 340 nm por 5 min. O resultado da atividade enzimática foi expresso em $\text{nmol.mgprotein}^{-1}\text{min}^{-1}$.

2.3.3. *Glutathione reduzida (GSH)*

Para a quantificação da concentração da Glutathione reduzida foi utilizado o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Em tubos eppendorfs de 1,5 ml foram colocados 200 μl das amostras recém descongeladas e 50 μl de TCA (ácido tri-cloro acético). Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e depois centrifugados a 5000 x g por 10 minutos a 4°C. Paralelamente, com o intuito de quantificar a GSH na fração sobrenadante da amostra, foi plotada uma curva padrão de GSH (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão Tris-base (0,4 M, pH 8,9) em concentrações que variaram de 0,0 $\mu\text{g/mL}$ a 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Na microplaca, o branco foi composto por 50 μl de TCA a 10%, por 230 μl de tampão Tris. Nos poços referentes aos padrões foram colocados 50 μl das soluções de GSH, 10 μl de TCA a 50% e 220 μl de tampão Tris. Finalmente, nos poços referentes às amostras, foram colocados 50 μl de amostra e mais 230 μl do tampão Tris-base. Antes da leitura a 415 nm, foram adicionados a microplaca 20 μl de ácido 5,5'-dithio-bis2-nitrobenzoico (DTNB) a 2,5 mM. A concentração de GSH nas amostras foi expressa em $\mu\text{mol.mgprotein}^{-1}$.

Quantificação dos hidroperóxidos - LPO

A análise de lipoperoxidação (LPO) foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos do ensaio FOX (Jiang et al., 1992). Em eppendorf foi adicionado a 200 μL de amostra 1000 μL de solução reação que era constituída de Xilenol Orange (100 μM), ácido sulfúrico (25 mM), hidroxitolueno butilado (BHT- 4 mM) e sulfato ferroso amoniacal (250 μM) em metanol a 90% e deixado no escuro por 30 min. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 5 min e 300 μL do sobrenadante foi pipetado (por poço) em microplaca e lido a 560 nm em espectrofotômetro Sunrise-TECAN. Os resultados foram expressos $\text{nmol.mgprotein}^{-1}\text{min}^{-1}$.

2.3.4. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi medida baseada no método de Bradford (1976) e foi efetuada em microplaca sob leitura em espectrofotômetro (Tecan) em comprimento de onda a 570 nm. Para a dosagem, foi realizada um diluição de 1:10 das amostras (10 μl de amostra + 90 μl de tampão pH 7,5), sendo utilizado 10 μl desta diluição com mais 250 μl de reagente de Bradford diluído em 1:5 em tampão fosfato pH 7,5 para a leitura.

2.3.5. Estatística

Os dados numéricos obtidos das análises dos biomarcadores bioquímicos (GPx e GSH, GR e LPO) dos grupos experimentais foram avaliados através da análise de variância – ANOVA critério único, seguido pelo teste de Tukey. A regra de decisão α foi de 0,05 para todos os testes aplicados.

3. Resultados

3.1. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

Mudanças na atividade da enzima foram observadas ao longo de quase todas as salinidades experimentais, somente se mantendo a mesma atividade nas salinidades 20‰ e 30‰, nas três espécies. *Uca mordax*, na salinidade de 10‰, mostrou atividade enzimática menor que as outras duas espécies (Fig. 1). Os valores de atividade enzimática de *U. maracoani* e *U. thayeri* em 20‰ foram maiores do que em 0‰ ou 40‰. *Uca mordax* apresentou maior atividade enzimática na salinidade 30‰ em relação à 0 e 10‰ (Fig. 1)

3.2. Atividade da Glutathione Redutase (GR)

A atividade da GR manteve-se a mesma ao longo de todas as salinidades em *U. thayeri*, mas foi maior na salinidade 10‰ em relação à 20‰ em *U. maracoani*. Para *U. mordax*, a atividade desta enzima foi baixa em 30‰ quando comparada com as salinidades 20‰ e 40‰ (Fig. 2).

3.3. Quantificação do substrato GSH

A concentração de GSH de *U. maracoani* foi constante em todos os tratamentos. Contudo, para *U. thayeri* e *U. mordax* a quantidade deste substrato em 20‰ foi maior que em 40‰. Especificamente para *U. thayeri*, a concentração deste substrato em 0‰ foi maior que em 40‰, e para *U. mordax*, os animais em 20‰ apresentaram maior concentração deste antioxidante que aqueles em 10‰ (Fig. 3).

3.4. Quantificação dos hidroperóxidos lipídicos (LPO)

Para as espécies *U. maracoani* e *U. thayeri* estas moléculas se mantiveram na mesma concentração ao longo das salinidades experimentais. Entretanto, *U. mordax* apresentou uma menor concentração de hidroperóxidos na salinidade 30‰, quando comparada com as salinidades 10‰ e 40‰ (Fig. 4).

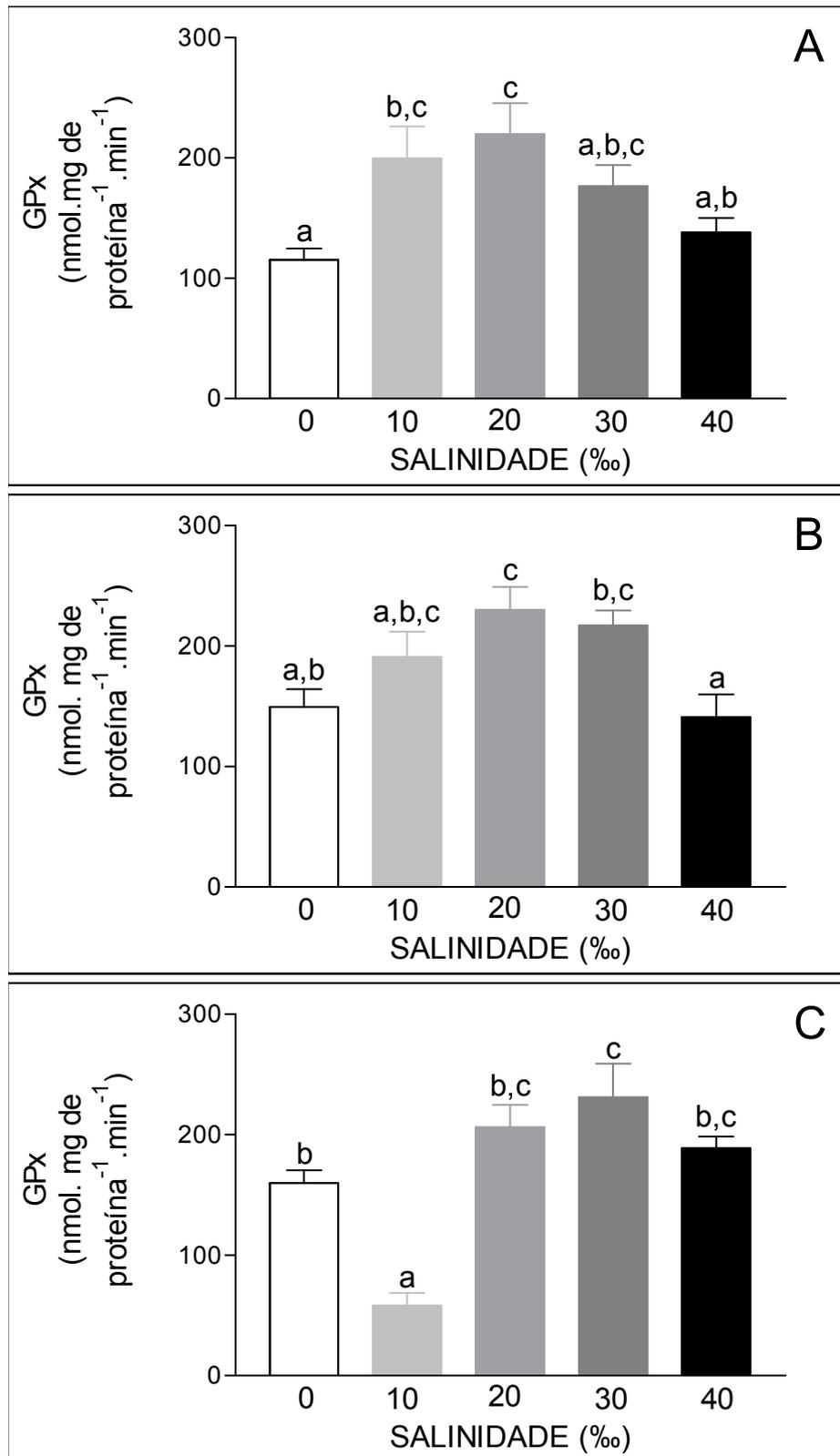


Fig. 1. Efeito da salinidade sobre a atividade da GPx nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativa). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.

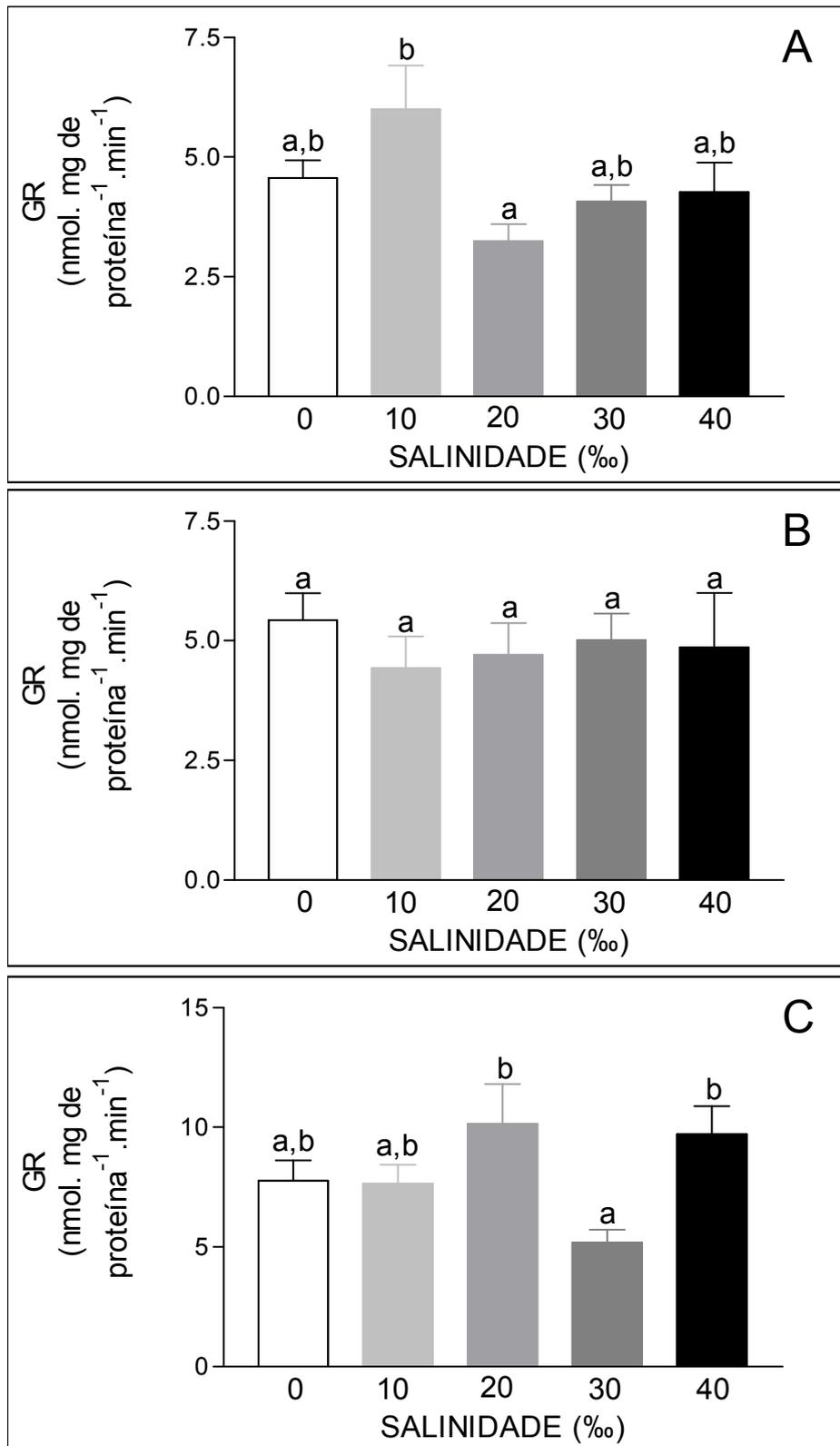


Fig. 2. Efeito da salinidade sobre a atividade da GR nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativo). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.

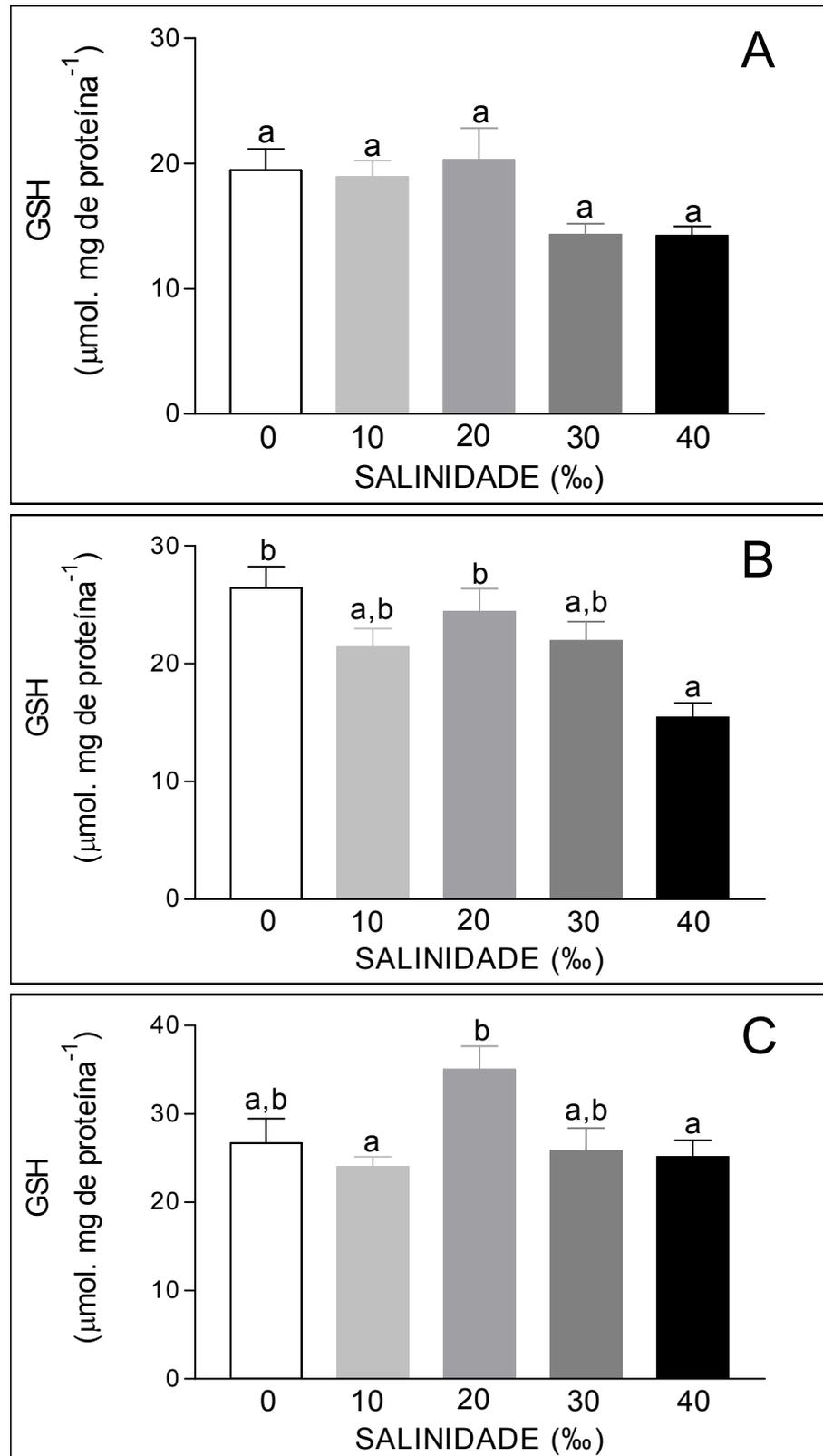


Fig. 3. Concentração do substrato antioxidante GSH ao longo das salinidades experimentais nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativa). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.

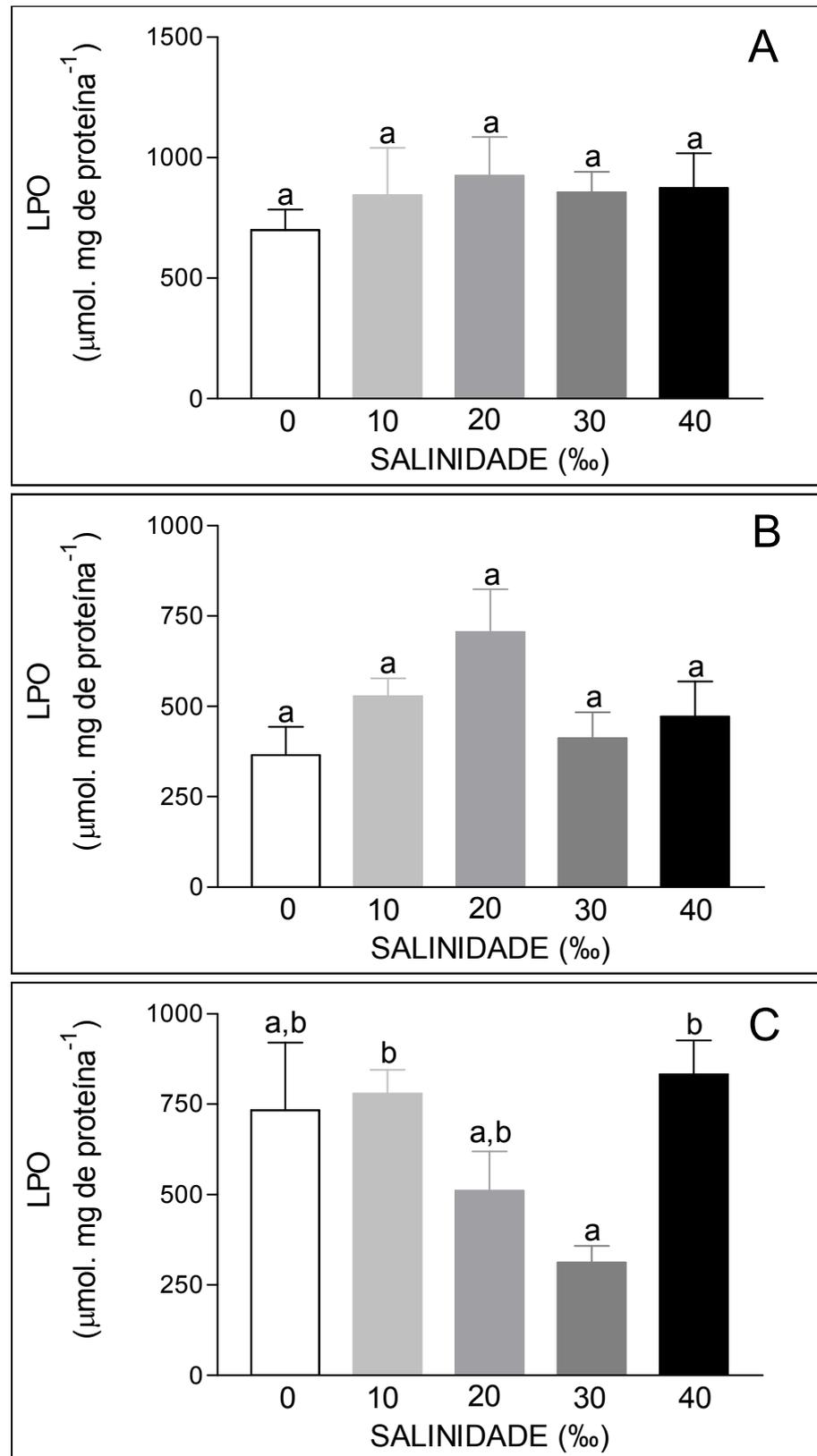


Fig. 4. Concentração dos hidroperóxidos lipídicos (LPO) ao longo das salinidades experimentais nas vísceras dos caranguejos. A = *U. maracoani*; B = *U. thayeri*; C = *U. mordax*. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes, diferenças estatísticas ($P < 0,05$ é significativa). $n = 10$ para cada grupo experimental. Barras com cores diferentes representando o gradiente salino.

4. Discussão

Foram observados modelos de ativação/atuação do sistema de proteção antioxidante nas espécies do gênero *Uca* investigadas. A respeito da atividade da enzima GPx e dos níveis de hidroperóxidos lipídicos, *U. maracoani* e *U. thayeri* mostraram um padrão semelhante. Para a atividade da enzima GR e dos níveis de GSH, as três espécies mostraram-se diferentes. Portanto, a variação salinidade mostrou-se um parâmetro eficiente para geração de respostas do sistema antioxidante destes animais.

A enzima antioxidante Glutationa Peroxidase (GPx) neutraliza peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) que são gerados a partir da respiração aeróbia realizada por estas espécies. Esta neutralização é relevante pelo fato do peróxido de hidrogênio causar danos ao DNA, gerando mutações e instabilidade genética (Park et al., 2005). Dessa forma, H_2O_2 é considerado um eficiente indutor de apoptose (Hipara et al., 2004).

Em relação à enzima Glutationa Peroxidase (GPx) de *U. maracoani* pode-se considerar que o valor obtido de sua atividade em caranguejos na salinidade 20‰ seja o encontrado quando os animais estão em ambiente natural, pois esta espécie ocupa locais onde a salinidade varia de 14‰ a 32‰ (Masunari, 2006). Na Baía de Guaratuba, no baixio onde estes animais foram coletados a salinidade presente na água da toca destes chama-marés se mantinha em torno de 20‰, tanto na maré baixa quanto na alta. A partir disso, foram feitas relações comparando os valores da GPx na salinidade 20‰ com as outras salinidades. Em 10‰ e 30‰, a atividade enzimática manteve igual àquela em 20‰, indicando que apesar da espécie ocupar locais mais salinos nas baías ($\geq 20‰$), águas mesoalinas (entre 10‰ e 20‰) não se caracterizariam como agentes estressores para estes chama-marés. Além disto, estes resultados corroboram os estudos de distribuição de *U. maracoani* realizados por Masunari (2006) e Hirose (2008), os quais demonstram a preferência desta espécie por habitats mais salinos. Entretanto, pelo fato de serem animais estuarinos, ocasionalmente, podem enfrentar águas mais hiposalinas provenientes das marés baixas ou durante o período das chuvas. Nas salinidades 0‰ e 40‰, houve uma significativa diminuição na atividade desta enzima, gerando uma curva em “U” invertida. Provavelmente, nas primeiras 8 horas de exposição a águas de salinidades extremas (aqui, 0‰ e 40‰) estes caranguejos diminuem o metabolismo e a taxa respiratória corporal. Este processo é realizado por muitos crustáceos quando são expostos a condições extremas por um curto período de tempo, pois o menor metabolismo promove a economia de energia favorecendo ao animal permanecer mais tempo na condição

que não está favorável (Willmer et al., 2000). Com um menor metabolismo e taxa respiratória, estes animais geram menores quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é a principal molécula neutralizada pela GPx. De acordo com Jamieson et al. (1986), em sistemas biológicos a produção de EROs está diretamente e positivamente relacionada à concentração de oxigênio. Também, Storey (1996) observou que um aumento na taxa de consumo de oxigênio induz uma geração elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs), que incluem O_2^- , H_2O_2 e HO^- . Portanto, infere-se neste caso, que a menor atividade da enzima nas salinidades extremas (0‰ e 40‰) pode ser resultado do menor metabolismo destes animais nestas condições.

U. thayeri ocorre em vários biótopos ao longo da Baía de Guaratuba suportando variações de salinidade de 4‰ a 32‰ (Masunari, 2006). Dentre as três espécies deste estudo, esta pode ser considerada a mais eurihalina de todas, somente não ocorrendo em salinidades muito altas ou muito baixas. Devido a isso, iremos considerar como valor controle aquele obtido quando os animais estavam em salinidade 10‰, apesar do biótopo onde está espécie foi coletada possuir uma média de salinidade em torno de 20‰. A escolha da salinidade 10‰ como valor controle é devido à água coletada na toca do animal, que se mantinha próxima deste valor tanto nas marés baixas quanto nas altas. Comparando-se a atividade da GPx em todas as salinidades com o valor obtido na salinidade 10‰ observa-se quase uma constância da atividade da enzima ao longo de todas as salinidades. Contudo, é visível a similaridade da curva da atividade enzimática de *U. thayeri* com *U. maracoani*, e isto pode representar um padrão para espécies estuarinas, sugerindo que estes caranguejos mantêm o mecanismo de proteção antioxidante estável, pelo menos para a enzima GPx, ao longo das salinidades 10‰, 20‰ e 30‰, mas nas salinidades extremas, estas espécies provavelmente diminuem o metabolismo devido ao estresse salino. Portanto, para se dizer que a atividade enzimática da GPx em *U. thayeri* refletiu sua eurihalidade, mais estudos dosando outras enzimas antioxidantes são necessários, para uma caracterização mais completa da relação entre eurihalidade e ativação do sistema de proteção antioxidante. Cabe ressaltar que o valor controle estipulado neste estudo seguiu critério lógico, entretanto pode não estar realmente representando a realidade na qual o animal vive.

A espécie *U. mordax* ocorre bem no interior da Baía, sendo encontrada em águas hiposalinas, onde a salinidade varia entre 0‰ a 16‰ (Masunari, 2006). Deste modo, iremos considerar como valor controle, a fim de comparação, aquele obtido quando o animal foi exposto por 8 horas em salinidade 10‰. É importante salientar que a espécie não foi

aclimatada em água doce no laboratório, e que ela não habita regiões sem a influência de águas salinas, por isso consideramos o valor controle como sendo aquele dos animais em 10‰. Além disto, pequenas diferenças de salinidade podem influenciar no tempo de vida da espécie. Como exemplo, o camarão palemonídeo *Palaemon pandaliformis* que morre após 3 horas em água doce, mas sobrevive por pelo menos 10 dias em água 3‰ (Freire et al., 2003). Em *U. mordax* foi observado que em salinidade 10‰ (controle) o animal apresenta um valor mais baixo de atividade da GPx do que nas outras salinidades. Este padrão pode estar relacionado com o fato do animal viver em habitats hiposalinos. A falta de estudos sobre a atividade das enzimas antioxidantes em animais de águas continentais ou hiposalinas torna difícil chegar a dados mais conclusivos. Portanto, mais pesquisas devem ser realizadas enfatizando as atividades constitutivas das enzimas antioxidantes de animais estuarinos ou de águas doces.

Para a Glutathione Redutase (GR) de *U. maracoani* seria esperado que sua atividade acompanhasse a da GPx, sendo maior nas salinidades 10‰, 20‰ e 30‰ e menor nas salinidades extremas 0‰ e 40‰, afinal estas duas enzimas atuam juntas no processo de neutralização do peróxido de hidrogênio (Schirmer et al., 1989). A GR é uma enzima que efetua a redução do substrato GSSG para GSH, o qual é utilizado pela GPx no processo de redução do peróxido de hidrogênio a duas moléculas de água. Entretanto, a GR manteve uma atividade quase constante ao longo de todas as salinidades, somente diferenciando significativamente entre as salinidades 10‰ e 20‰. Isto ocorreu, provavelmente, porque o substrato GSH gerado a partir da GR também pode ser utilizado por outra enzima antioxidante, a Glutathione S-Transferase (Doyotte et al., 1997). Assim, pode-se dizer que a maior atividade da GR nas salinidades extremas (0‰ e 40‰), em contraste com a GPx, seja devido a não somente geração de GSH para a GPx, mas também para a GST. Oliveira et al. (2005) observaram um significativo aumento nas atividades das enzimas antioxidantes catalase e GST nos tecidos branquiais de *C. granulata* expostos a 8 h de anóxia, período em que o animal se mantinha com uma baixa taxa metabólica. Vale ressaltar também, que algumas enzimas possuem menor atividade quando o animal está com o metabolismo mais baixo, tais como a superóxido dismutase (SOD) encontrado por Oliveira et al. (2005) e talvez a GPx, como inferido para este trabalho. Um aumento na atividade da GST durante a provável diminuição metabólica ocorrida em *U. maracoani* nas salinidades extremas (0‰ e 40‰) pode ter ocorrido, com a GR aumentando de atividade para gerar GSH tanto para a GPx quanto

para a GST. Isto deve ter ocorrido com as outras duas espécies também, pois a GR manteve sua atividade constante ao longo das salinidades experimentais.

As três espécies mantiveram praticamente estável a quantidade de GSH ao longo de todas as salinidades, isto quando compara-se o valor da salinidade estipulada como controle com as outras. O padrão demonstrado pela GSH foi semelhante ao da atividade da GR, o que já era esperado, pois o nível de substrato GSH varia conforme a atividade da GR. Se a GR está em alta atividade, a geração de GSH também estará alta, e o contrário também é verdadeiro (Schirmer et al., 1989).

A caracterização de ocorrência de dano oxidativo celular é realizada quantificando-se os produtos moleculares que são gerados a partir deste dano, sendo os hidroperóxidos lipídicos exemplos destas moléculas. Seria esperado dano se as salinidades mostrassem valores de hidroperóxidos lipídicos mais altos que aqueles para a salinidade estipulada controle. Nas três espécies não foi observada a ocorrência de dano oxidativo celular em nenhuma salinidade experimental. Sendo assim, as diferenças entre as salinidades encontradas para a espécie *U. mordax* não representam caracterização de dano oxidativo celular. Entretanto, *U. mordax*, novamente mostra um padrão diferente nos níveis de hidroperóxidos lipídicos, assim como ocorreu na atividade da enzima GPx. Este resultado sugere que o sistema de proteção antioxidante, enzimático e não enzimático, nestes chama-marés, foi eficiente na neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs), evitando danos na célula. Além disto, podemos concluir que as salinidades experimentais pelas quais os animais foram testados não caracterizaram-se como agentes estressores, pelo menos durante a exposição por 8 horas, tempo que é próximo de um ciclo de maré quando os caranguejos estão na natureza.

Referências

- Bianchini, A., Lauer, M.M., Nery, L.E.M., Colares, E.P., Monserrat, J.M., Santos Filho, E.A., 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology. A* 151, 423-436.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, A.C., Terwillinger, N.B., 1999. Developmental changes in oxygen uptake in *Cancer magister* (Dana) in response to changes in salinity and temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 241, 179-192.
- Darr, D., Fridovich, I., 1994. Free radicals in cutaneous biology. *Journal of Investigative Dermatology*. 102, 671-675.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M-C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure

- in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*. 39, 93-110.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, New York.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 319-367.
- Hipara, J.L., Clement, M.V., Pervaiz, S., 2004. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 514-521.
- Hirose, G.L., Negreiros-Fransozo, L.M., 2008. Population biology of *Uca maracoani* Latreille 1802-1803 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) on the south-eastern coast of Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 3, 373-383.
- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., Boveris, A., 1986. The relation of free radical production to hiperoxia. *Annual Review of Physiology*, 48, 703-719.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. 202, 384-389.
- Kong, X., Wang, G., Li, S., 2008. Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). *Marine Biology*. 154, 269-276.
- Livingstone, D.R., Stickle, W.B., Kapper, M., Wang, S., 1986. Microsomal detoxication enzyme responses of the marine snail, *Thais haemastoma* to laboratory oil exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 36, 843-850.
- Livingstone, D.R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome *c* reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* L to environmental and experimental exposure to pollutants. *Marine Ecology Progress Series*. 46, 37-43.
- Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribeira, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Functional Ecology*. 4, 415-424.
- Lucu, C., Pavieie, D., 1995. Role of seawater concentration and major ions in oxygen consumption rate of isolated gills of the shore crab *Carcinus mediterraneus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. A 112, 565-572.
- Martins, C.D.M.G., Bianchini, A., 2009. Metallothionein-like proteins in the blue crab *Callinectes sapidus*: Effect of water salinity and ions. *Comparative Biochemistry and Physiology*. A 152, 366-371.
- Masunari, S., 2006. Distribuição e abundância dos caranguejos *Uca* Leach (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 23, 901-914.
- Nowakowska, A., Swiderska-Kolacz, G., Rogalska, J., Caputa, M., 2009. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. C 150, 481-486.
- Oliveira, U.O., Araújo, A.S.R., Belló-Klein, A., Silva, R.S.M., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. B 140, 51-57.

- Park, X., You, X., Imalay, J.A. 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America. 102, 9317-9322.
- Piller, S.C., Henry, R.P., Doeller, J.E., Kraus, D., 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. Journal of Experimental Biology. 198, 349-358.
- Popovic, M., Janicijevic-Hudomal, S., Kaurinovic, B., Rasic, J., Trivic, S., Vojnovic, M., 2009. Antioxidant Effects of Some Drugs on Immobilization Stress Combined with Cold Restraint Stress. Molecules. 14, 4505-4516.
- Prakash, N.T., Rao, K.S.J., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. Molecular and Cellular Biochemistry. 146, 107-113.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein – bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. Analytical Biochemistry. 25, 192-&.
- Setiarto, A., Strüssmann, C.A., Takashima, F., Watanabe, S., Yokota, M., 2004. Short-term responses of adult Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion. Aquaculture Research. 35, 669-677.
- Schirmer, R.H., Krauth-Siegel, R.L., Schulz, G.E., 1989. Glutathione reductase. In: Dolphin, D., Avaramovic, O., Poulson, R. (Eds.), Coenzymes and Cofactors: Glutathione, vol. 3. Wiley, New York, pp. 553-596.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. FEBS letters. 103, 287-290.
- Storey, K., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 29, 1715-1733.
- Wang, W., Zhou, J., Wang, P., Tian, T., Zheng, Y., Liu, Y., Mai, W., Wang, A., 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. Comparative Biochemistry and Physiology. C 150, 428-435.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2000. Environmental Physiology of Animals. Blackwell Science, Oxford.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comparative Biochemistry and Physiology. C 122, 121-129.

Conclusões Gerais

- 1) Há diferenças no comportamento osmorregulatório entre as três espécies, que habitam ambientes distintos em termos de salinidade na Baía de Guaratuba;
- 2) *Uca maracoani*, de ambiente mais salino, osmorregula nas salinidades intermediárias (10 a 30‰), tendendo a osmoconformação ou a uma osmorregulação mais fraca nas salinidades extremas (0 e 40‰); *U. thayeri*, considerado o mais eurihalino por sua amplitude de ocupação de ambientes em termos de salinidade, mostrou capacidade menor de osmorregular em relação ao *U. maracoani*, com regulação entre 20 e 30‰; *U. mordax*, de ambiente menos salino (fundo da Baía), regulou bem de 0 a 20‰, tendendo a osmoconformação ou a uma regulação mais fraca nas salinidades mais elevadas.
- 3) A glutathiona peroxidase (GPx) foi o biomarcador que melhor representou (dentre os utilizados neste trabalho) a atividade do sistema antioxidante nestes caranguejos, diante do desafio salino. *Uca maracoani* e *U. thayeri* apresentaram curva de “U” invertido da atividade da GPx em função da salinidade, e *U. mordax* apresentou padrão distinto, com atividade mínima em 10‰.
- 4) *Uca maracoani* tem redução na atividade da GPx quando está osmoconformando ou regulando mais fracamente, nas salinidades extremas. Ao contrário, *U. mordax* tem ativação da GPx nas salinidades mais altas, quando também tende a osmoconformar. *Uca thayeri* apresenta padrão semelhante à *U. maracoani*, mas com capacidade ligeiramente menor de osmorregular. Lança-se a hipótese de que sua eurihalidade se explica por maior capacidade de regular o volume celular.