

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GIOVANNA CARSTENS CASTELLANO**

**MANUTENÇÃO DE GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO ENTRE O FLUIDO  
CELÔMICO E A ÁGUA DO MAR EM EQUINODERMOS**

**Curitiba  
2009**

**GIOVANNA CARSTENS CASTELLANO**

**MANUTENÇÃO DE GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO ENTRE O FLUIDO  
CELÔMICO E A ÁGUA DO MAR EM EQUINODERMOS**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Fisiologia como requisito parcial à conclusão do curso de Graduação em Ciências Biológicas, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire

**Curitiba  
2009**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, porque viver é bom demais

A Professora Carolina Arruda Freire, pela orientação, pelas lições de trabalho e de vida e pela amizade

Aos queridos companheiros de laboratório Marcos, Ivo, Ene, Hugo, Lú, Vivi, Jean, Lígia e Rê, pela ajuda, pelas coletas, pelos ensinamentos, pelos momentos de diversão, pela amizade

Ao Departamento de Fisiologia, pelo uso do fotômetro

A todos os professores da UFPR, que contribuíram muito para a minha formação

Ao meu filho amado Rodolfinho, por ser a pessoinha mais importante da minha vida. Amo você

Às minhas queridas crianças, Nicolas, Matheus, Frederico, Felipe e Tati por tantas alegrias

Ao meu namorado amado Marcos, pela ajuda, pelo companheirismo, pela felicidade de estarmos juntos e principalmente pelo amor. Amo você

Aos meus pais, Augusto e Marília, irmãos, Paty e Fá, e cunhados, Jonto e Erica, por tudo desde sempre

Às eternas amigas Gaby e Marina, por uma vida de convivência

Novamente à Ivo, pela grande amizade, pela acolhida e companheirismo

Aos amigos e amigas da bio, Dessa, Flavinha, Amanda, Mi, Char, Dani, Si, Raquel, Flavinho, Peter, Ray, Rafa, Nine e a muitos outros, pelas risadas, pela amizade

Obrigada a todos por fazerem parte da minha vida, e com isso terem contribuído para a minha formação!

## RESUMO

Os equinodermos, assim como a maioria dos invertebrados marinhos, são considerados animais osmoconformadores. Este filo abrange as espécies *Arbacia lixula*, *Echinometra lucunter* e *Holothuria grisea*, analisadas neste trabalho. O objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente o curso temporal do equilíbrio entre as concentrações internas (fluido celômico perivisceral) e externas (água do mar) após alteração de salinidade externa, nas espécies. Para isto os espécimes de cada espécie foram divididos em 3 grupos, que foram submetidos a diferentes salinidades de água do mar (25, 35 e 45‰) por 6 horas. Foram retiradas amostras de fluido celômico dos animais nos tempos 0, 1, 2, 3 e 6 horas para mensuração de osmolalidade e concentrações de cloreto, sódio, magnésio e potássio. Os resultados apontaram diferenças entre as espécies para os diferentes íons, o que provavelmente se deve a uma diferença de permeabilidade dos tecidos de interface entre o fluido celômico e a água do mar aos diversos osmólitos. Além disso, houve diferença nas respostas dos animais diante de gradientes hipo e hiperosmóticos equivalentes. Assim, não se pode considerar que todos os equinodermos sejam igualmente osmoconformadores.

## ABSTRACT

Equinoderms, as the majority of marine invertebrates, are considered osmoconformer animals. This group includes the species *Arbacia lixula*, *Echinometra lucunter* and *Holothuria grisea*, analysed in this paper. The objective of the present study was to analyse comparatively the time course of balance between the internal (perivisceral coelomic fluid) and external (sea water) concentrations after external salinity variation, in those species. For this, the individuals of each species were divided into 3 groups, which were submitted to different sea water salinities (25, 35 e 45‰) for 6 hours. Samples of coelomic fluid were collected from the animals at 0, 1, 2, 3 and 6 hours for osmolality, chloride, sodium, magnesium and potassium concentration measurements. The results pointed at differences between the species for the different ions, what probably occurred because of differential permeabilities in the interface tissues between the coelomic fluid and the sea water, for the various ions. In addition, there was a difference in the animals responses to similar hypo- and hyperosmotic gradients. Thus, it can't be considered that all equinoderms are equally osmoconformers.

**SUMÁRIO**

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
<b>JUSTIFICATIVAS</b> .....	11
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
<u>Coleta</u> .....	12
<u>Transporte e aclimatação</u> .....	13
<u>Experimentos</u> .....	13
<u>Dosagens iônicas e leitura de osmolalidade</u> .....	14
<u>Análise estatística</u> .....	14
<b>RESULTADOS</b> .....	16
<u>Osmolalidade</u> .....	16
<u>Cloreto</u> .....	20
<u>Sódio</u> .....	24
<u>Magnésio</u> .....	28
<u>Potássio</u> .....	32
<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

## INTRODUÇÃO

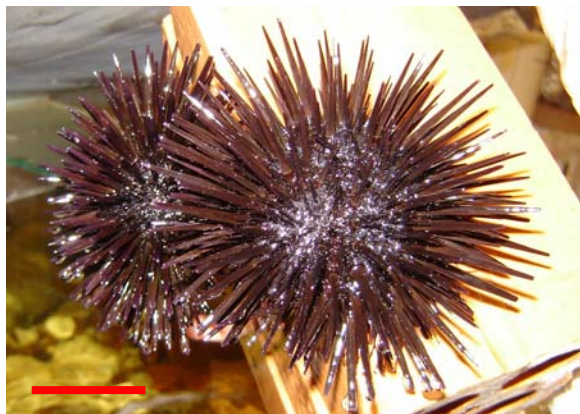
O filo Echinodermata é composto por cerca de 6 mil espécies de animais deuterostômios, exclusivamente marinhos e em sua maioria bentônicos. Alguns aspectos caracterizam estes animais. Por exemplo, a presença de um tecido conjuntivo mutável, capaz de alterar sua rigidez de forma reversível, exercendo as funções de proteção e flexibilidade; a simetria pentarradial secundária, já que este filo faz parte do grupo Bilateria, apresentando simetria bilateral em seu ancestral e na fase larval (RUPPERT *et al.*, 2005). Além destas duas propriedades, existe um sistema vascular aquífero ou sistema ambulacral, responsável pelas funções que geralmente são exercidas pelo sistema circulatório de outros animais. O sistema hemal é muito reduzido na maioria dos equinodermos, e o sistema ambulacral quase sempre exerce a função de transporte interno de material para trocas gasosas, excreção e distribuição de nutrientes aos tecidos do corpo, além de auxiliar na locomoção em alguns casos. Outro aspecto específico dos equinodermos é a presença de um endoesqueleto de origem dérmica, recoberto por epiderme, composto por ossículos articulados em Crinoidea e Ophiuroidea, justapostos em Asteroidea, fundidos formando uma carapaça rígida em Echinoidea ou espalhados na parede do corpo em Holothuroidea (RUPPERT *et al.*, 2005). A maioria dos equinodermos é dióica, com fertilização externa e desenvolvimento indireto (RUPPERT *et al.*, 2005). Poucas espécies apresentam dimorfismo sexual e raros são hermafroditas (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006). Representantes do filo Echinodermata estão presentes em todos os oceanos, de regiões de entremarés a grandes profundidades (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006).

O sub-filo Echinozoa abrange as Classes Echinoidea e Holothuroidea, assim unidas por possuírem características comuns como ausência de braços; expansão aboral dos ambulacros e da superfície oral, que recobrem todo o corpo do animal, exceto ânus e periprocto; eixo oral-aboral alongado; corpo bulboso ou cilíndrico; faringe envolta por anel calcáreo; sistema hemal desenvolvido (RUPPERT *et al.*, 2005). A classe Echinoidea abrange



aproximadamente 900 espécies, entre ouriços do mar e bolachas da praia, dentre as quais 105 estão presentes no Brasil (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006). Os componentes deste grupo possuem corpo mais ou menos esférico ou achatado, variando entre 6 e 12 cm de diâmetro, e espinhos articulados de comprimento variável (RUPPERT *et al.*, 2005). Além disso, estes animais podem habitar substrato rochoso ou arenoso (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006).

A ordem Echinacea inclui as duas espécies de ouriço-do-mar que serão avaliadas no presente trabalho. Uma das espécies tratadas é *Echinometra lucunter*, um ouriço de cor preta arroxeada, sendo uma das espécies mais abundantes do litoral brasileiro (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006). Sua carapaça tem formato oval, podendo atingir até 15 cm de diâmetro, mas a maioria alcança somente metade deste tamanho (Figura 1). Possuem espinhos longos, largos na base, mas que se afinam bruscamente no ápice, e de coloração geral escura (os espinhos orais são mais claros do que os aborais) (HENDLER *et al.*, 1995). Os representantes desta espécie são herbívoros raspadores, podendo também se alimentar de restos de algas mortas (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006) e de sedimento composto por carbonato de cálcio (McPHERSON, 1969). Podem habitar regiões de sublitoral raso, de costão rochoso em zonas de entremarés, em recifes de coral, sobre a alga *Thalassia testudinum* (McPHERSON, 1969). Nestas regiões freqüentemente formam aglomerados e se alojam em locas (perfurações arredondadas nas rochas) (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006; GONDIM *et al.*, 2008). São encontrados em profundidades de 0 a 45 m e habitam substratos consolidados (HENDLER *et al.*, 1995), sendo mais abundantes em águas rasas (SÁNCHEZ-JÉREZ *et al.*, 2001). Ocorrem em Beaufort, Carolina do Norte, Bermudas, em todo o Caribe, leste da América Central, Brasil e oeste da África. São ouriços relativamente resistentes a estresses causados por fatores físicos como aumento de temperatura e salinidade, mas os processos de fertilização e desenvolvimento são prejudicados sob baixas salinidades (HENDLER *et al.*, 1995).



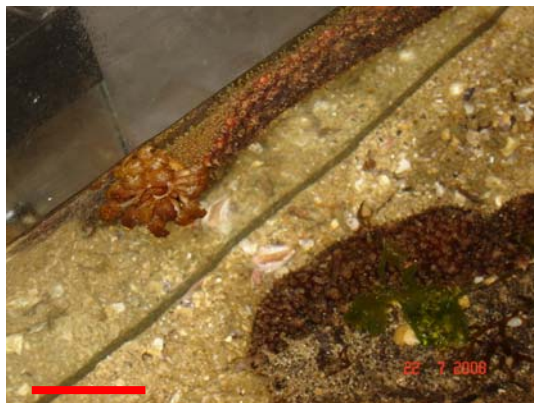
**Figura 1.** Exemplos de *Echinometra lucunter*. Barra de escala: 4 cm.

A outra espécie de ouriço-do-mar avaliada no trabalho é *Arbacia lixula* que tem coloração marrom escura a negra, possuindo espinhos finos, longos e de pontas claras (Figura 2). É uma espécie que pode se alimentar de algas calcárias (BULLERI *et al.*, 1999), animais em decomposição, ou pequenos organismos. Ocorre na costa oeste da África, Ilhas Canárias, Madeira e Açores e em quase toda a costa brasileira, ocupando ambientes de até 15 m de profundidade e se fixando principalmente sobre substrato rochoso (SUGUIMOTO, 2005). É mais abundante em ambientes estáveis, mais profundos (SÁNCHEZ-JÉREZ *et al.*, 2001). *A. lixula* apresenta características que permitem sua ocorrência em locais que sofrem forte ação das ondas (CHELAZZI *et al.*, 1997). Tais características são: discos adesivos grandes e com forte capacidade de adesão no substrato rochoso, hábito gregário e espinhos longos que se entrelaçam com os espinhos de outros indivíduos (BULLERI *et al.*, 1999). É uma espécie abundante em substratos verticais (BENEDETTI-CECCHI *et al.*, 1998; BULLERI *et al.*, 1999) localizados em profundidades de 1 a 5 m (BENEDETTI-CECCHI *et al.*, 1998).



**Figura 2.** Exemplo de *Arbacia Lixula*. Barra de escala: 4 cm.

A classe Holothuroidea é composta por cerca de 1250 espécies, das quais 32 ocorrem no Brasil. Os holoturóides são encontrados desde a região de entremarés até grandes profundidades (2500 metros); um terço das espécies desta classe habitam águas profundas. Possuem corpo alongado no sentido oral-aboral e parede corpórea flexível, sendo que esta é rica em tecido conjuntivo mutável, e apresenta endoesqueleto reduzido a ossículos microscópicos. O corpo das holotúrias é dividido em duas regiões: trívio ou sola, região que fica em contato com o substrato, assim chamada por apresentar três regiões ambulacrais; e bívio, porção oposta ao substrato, a qual apresenta duas regiões ambulacrais. Internamente apresentam simetria pentarradial, porém, externamente, são bilateralmente simétricos (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006; RUPPERT *et al.*, 2005). Os representantes desta classe são os que ocupam o maior número de habitats diferenciados de todos os equinodermos. Apresentam hábitos cavadores e bentônicos, e são encontrados em substratos consolidados ou inconsolidados, podendo aderir-se a algas e até nadar. Em sua maioria, superam 20 centímetros de comprimento e geralmente apresentam corpos robustos e carnosos (RUPPERT *et al.*, 2005). Fatores ambientais como salinidade e temperatura exercem importante influência sobre a sobrevivência e o crescimento dos pepinos do mar. *Apostichopus japonicus*, se submetido à salinidade de 20‰ por 30 dias, tem sua taxa de sobrevivência reduzida a 20% do valor habitual (DONG *et al.*, 2008). *Holothuria grisea*, comum na região de entremarés, é encontrada na base das rochas, em contato com a areia, podendo ficar totalmente exposta durante a maré baixa. Tem uma coloração acinzentada e ocorre na costa brasileira do nordeste até o estado de Santa Catarina (RIBEIRO-COSTA & ROCHA, 2006). Podem atingir até 25 cm de comprimento (Figura 3). Ocorrem na Florida, nas ilhas Bahamas, Porto Rico, Jamaica, das Ilhas Antilhas a Curaçao, Panamá, Colômbia, sul do Brasil e oeste da África. São encontrados normalmente a menos de 5 m de profundidade (HENDLER *et al.*, 1995).



**Figura 3.** Exemplar de *Holothuria grisea*.  
Barra de escala: 4 cm.

Na água do mar, há aproximadamente 35‰ de sal, ou seja, 35 g de sal por litro de água. Os principais íons presentes nesta solução são cloreto (548 mM) e sódio (470 mM), além de magnésio (54 mM), sulfato (28 mM) e cálcio (10 mM) em concentrações significativas (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Os invertebrados marinhos, inclusive os equinodermos, são essencialmente isosmóticos em relação ao meio, o que significa que seus fluidos corpóreos e a água do mar possuem a mesma pressão osmótica. Além disso, diante de variação de salinidade da água, são osmoconformadores, ou seja, animais que variam seu meio interno (líquido extracelular) acompanhando a variação da água externa, sem capacidade de sustentar gradientes osmóticos significativos entre seu meio interno e o meio externo, a água. Entretanto, a composição de solutos da água do mar e dos fluidos corpóreos destes animais podem ser diferentes, o que possivelmente demanda pelo menos certa capacidade de regulação iônica dos mesmos (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). *Lytechinus variegatus* é capaz de sustentar um gradiente de 4-6 mM para o íon potássio entre seu meio interno (fluido celômico) e a água circundante (DIEHL, 1986). *Arbacia lixula* e *Lytechinus variegatus* apresentam diferenças na manutenção de gradientes entre o fluido celômico e a água do mar. Esta diferença pode ser explicada pela maior permeabilidade aparente da parede do corpo de *A. lixula* do que de *L. variegatus*, já que a primeira espécie apresenta tamanho menor, o que torna sua relação superfície/ volume maior. De fato, espécies maiores de ouriços-do-mar resistem por mais tempo a baixas salinidades (VIDOLIN *et al.*, 2007; STICKLE & DENOUX, 1976; DIEHL, 1986). Os principais gradientes sustentados por *L. variegatus* são de concentração osmótica e de potássio,

respectivamente, 3,3 e 4,4 vezes maior que *Arbacia lixula*. Ou seja, *L. variegatus* parece apresentar uma “certa capacidade de regulação iônica” (VIDOLIN *et al.*, 2007). Ao contrário dos equinóides supracitados, as estrelas-do-mar *Patiriella regularis* e *P. mortenseni*, diante de desafios hiposmóticos, não apresentaram capacidade de regulação osmótica, já que a osmolaridade de seus fluidos periviscerais acompanharam em paralelo a diminuição de salinidade da água circundante (BARKER & RUSSELL, 2008). Assim, equinóides parecem apresentar maior habilidade para sustentar gradientes de concentração iônica e osmótica entre os meios interno e externo quando comparados aos demais equinodermos (DIEHL, 1986). Enfim, equinodermos podem ser considerados osmoconformadores de uma maneira geral, mas deve-se considerar também a evidência da existência de diferenças neste padrão entre as espécies (STICKLE & AHOKAS, 1974; STICKLE & DENOUX, 1976; ROLLER & STICKLE, 1985, VIDOLIN *et al.*, 2007; BARKER & RUSSELL, 2008).

Quando ocorre redução na salinidade do meio, invertebrados osmoconformadores que anteriormente estavam isosmóticos em relação ao meio, tornam-se hiperosmóticos, deparando-se com dois problemas: o fluxo de água para o seu interior e a perda de íons para o meio. Na situação inversa, nos casos em que ocorre aumento na salinidade do meio, o invertebrado torna-se hiposmótico em relação ao seu entorno, havendo uma tendência à perda de água e ao ganho de solutos. O problema do fluxo iônico pode ser pelo menos minimizado por uma redução de permeabilidade ou estabelecimento de contrafluxo equivalente de alguns íons através de transporte ativo, ou seja, transporte contra um gradiente de concentração que, portanto, demanda gasto energético. Contudo, não são esperadas estas reações por parte dos equinodermos, reações chamadas em conjunto de regulação anisosmótica extracelular, ou capacidade de osmorregulação (ver discussão em FREIRE *et al.*, 2008). Se ocorre então variação no extracelular (fluido celômico), a capacidade de realizar regulação isosmótica intracelular (regulação do volume das células) contribuiria para a sobrevivência, ou em outras palavras para o grau de eurihalidade do animal.

As concentrações iônicas dos fluidos intra- e extracelular sempre diferem entre si, apesar de as osmolalidades (quantidade de partículas osmoticamente

ativas por quilograma de solvente) (SCHMIDT-NIELSEN, 2002) destes serem as mesmas. Frente a tais diferenças de concentração de soluto entre estes meios, os organismos necessitam realizar uma regulação de volume de suas células para que as funções destas não sejam prejudicadas quando ocorre alteração na concentração do líquido extracelular. Tal regulação se dá por meio de variações intracelulares nas concentrações de osmólitos orgânicos e inorgânicos. A primeira resposta a uma situação de estresse osmótico é a tomada ou expulsão de eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) pela célula (HOFFMANN & DUNHAM, 1995), mas a médio (horas) e longo (dias) prazo, ocorre a variação da concentração intracelular de aminoácidos livres, por meio de tomada ou perda de aminoácidos pela célula, ou por síntese ou degradação de proteínas dentro da mesma. Em resumo, se o fluido extracelular é hipertônico em relação à célula, esta capta eletrólitos e aminoácidos do ambiente para gerar influxo de água, podendo também ocorrer degradação protéica para aumentar a concentração intracelular de aminoácidos livres. Por outro lado, se o fluido extracelular torna-se hipotônico em relação à célula, ocorre síntese protéica e liberação de eletrólitos e aminoácidos pela célula, para gerar efluxo de água. Estes mecanismos vão evitar que a célula murche ou inche, respectivamente (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Os mecanismos acima descritos são coletivamente denominados “regulação isosmótica intracelular” (RII), e são especialmente relevantes para animais osmoconformadores, que não investem energia em mecanismos de transporte em seus epitélios de interface com a água circundante, além de apresentarem baixa capacidade de manutenção de gradientes osmóticos entre os meios interno e externo (FREIRE *et al.*, 2008). Deve-se ressaltar que animais com capacidade de osmorregulação (e.g, peixes) podem também ter grande capacidade de regulação de volume celular, ampliando com isso seu grau de eurihalinidade. Com o objetivo de testar a habilidade dos equinodermos para realizar tal tipo de regulação ou para manter sua hidratação tecidual, foram realizados experimentos com tecidos de *Arbacia lixula*, *Echinometra lucunter* e *Holothuria grisea*, que demonstraram respostas distintas entre as espécies (CASTELLANO & FREIRE, dados não publicados). O tecido de *A. lixula* manteve-se mais estável em condições hiposmóticas e as demais espécies regularam melhor a hidratação tecidual diante de estresses hiperosmóticos. *H.*

*grisea* apresentou maior capacidade de manutenção da hidratação tecidual, em relação às duas outras espécies (CASTELLANO & FREIRE, dados não publicados). Assim, têm-se já evidência de diferenças entre estas espécies na maneira de lidar com desafios osmóticos.

Embora restritos ao ambiente marinho, os equinodermos são encontrados em ambientes instáveis e sujeitos a variação de salinidade e exposição ao ar. Ao contrário do que se considerava a princípio, nem todos os equinodermos são estenohalinos (animais que toleram apenas limites estreitos de variação de salinidade). Já foram encontradas espécies deste filo em águas de salinidades significativamente inferior (8‰, no Mar Báltico) ou superior (46‰, no Mar Vermelho) à água do mar normal. Tais espécies podem ser consideradas relativamente eurihalinas (animais que toleram ampla variação de salinidade) em relação à grande maioria dos equinodermos (BOOLOOTIAN, 1966; STICKLE & AHOKAS, 1974; STICKLE & DIEHL, 1987). Contudo, o fato de viverem e estarem adaptadas a salinidades bem diferentes da água do mar não quer dizer que tolerem grandes variações no seu ambiente. Por exemplo, *Asterias rubens* tem sua resposta imune alterada diante de exposições prolongadas (superiores às causadas pelo ciclo de marés) a baixas salinidades (28‰) (COTEUR *et al.*, 2004). Há também o caso de *Ophiophragmus filigraneus*, um ofiuróide exclusivamente encontrado em estuários, sendo considerado o único equinodermo que ocorre neste tipo de ambiente. As taxas de regeneração e de produção desta espécie são afetadas por baixas salinidades (16‰), mas o animal habita o estuário provavelmente devido à abundância de recursos que nele existem (TALBOT & LAWRENCE, 2002). Em fiordes da Nova Zelândia, ocorre um fenômeno climatológico e hidrográfico que promove a formação de uma camada superficial de água de baixa salinidade, cuja profundidade relativa varia de acordo com a maré e com as chuvas. Tal camada representa um desafio osmótico para os organismos que habitam águas superficiais. Neste local há registro de ocorrência da estrela do mar *Patiriella regularis* em águas de salinidade de cerca de 3,7 ‰ (durante ou após chuvas fortes) por períodos de pelo menos 30 minutos. Diante de tal estresse osmótico, a estrela não apresenta movimentos, mas estes retornam quando a salinidade da água retorna aos parâmetros habituais, sendo este comportamento comum entre as estrelas do mar. Esta mesma espécie é capaz

de sobreviver em água a salinidade de 0‰ por mais de 4 dias. Além disso, *P. regularis* não tem seus movimentos (ou seja, coordenação neuromuscular) alterados diante de condições de hiposalinidade abaixo de 9‰. Opostamente, uma outra espécie do mesmo gênero, *P. mortensenii*, mostra diminuição de coordenação neuromuscular sob condições de baixa salinidade já a partir de 26‰ (BARKER & RUSSELL, 2008). *Lytechinus variegatus* demonstrou capacidade de tolerar salinidades reduzidas, até 18-20‰ (ROLLER & STICKLE, 1993; BISHOP *et al.*, 1994). Observou-se também que *L. variegatus* e *Arbacia lixula* suportam redução de salinidade de 35‰ para 25‰, por um período de 5 dias (VIDOLIN *et al.*, 2007). Estes resultados também vêm a questionar a qualificação dos equinodermos como estenohalinos. Diluições semelhantes a esta ocorrem naturalmente no mar em poças de maré, quando chove durante a maré baixa, porém têm curta duração. Indivíduos de *Echinometra lucunter*, submetidos a desafios osmóticos, toleram melhor a redução de salinidade, e mostram-se mais debilitados diante do aumento da mesma, havendo mortalidade em decorrência do experimento, provavelmente devido à incapacidade de regulação de volume celular (SANTOS-GOUVEA & FREIRE, 2007; VIDOLIN, 2003). Alterações na salinidade podem provocar danos ultraestruturais e alterações microanatômicas em tecidos de equinodermos, e o aumento da salinidade é mais prejudicial do que a diminuição da mesma (DIEHL, 1986; VIDOLIN, 2003; SANTOS-GOUVEA & FREIRE, 2007). No ambiente de entremarés, é mais freqüente a ocorrência de uma redução de salinidade do que aumento (DIEHL, 1986; STICKLE & DIEHL, 1987). Em conformidade, a regulação de volume celular em casos de ganho de água é mais viável do que para casos de desidratação das células (DIEHL, 1986; FREIRE *et al.*, 2008).

Em suma, a pergunta que norteou o presente trabalho foi: há diferenças inter-específicas nos cursos temporais de equilíbrio entre as concentrações internas (fluido celômico perivisceral) e externas (água do mar), diante de mudança de salinidade do meio? A hipótese central deste trabalho foi a de que espécies de equinodermos que habitam ambientes instáveis como a região de entremarés (*E. lucunter* e *H. grisea*) possuam maior capacidade de minimizar e/ou retardar os fluxos difusivos diante de variação de salinidade externa, quando comparados a espécies de sublitoral (*A. lixula*).



## OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram analisar comparativamente o curso temporal do equilíbrio entre as concentrações internas (fluido celômico perivisceral) e externas (água do mar) após alteração de salinidade externa, nas espécies: *Echinometra lucunter*, *Arbacia lixula*, e *Holothuria grisea*; verificar se espécies que habitam ambientes instáveis, como a região entremarés (*E. lucunter* e *H. grisea*), apresentam maior habilidade para minimizar e/ou retardar os fluxos difusivos diante de variação de salinidade externa quando comparadas às de sublitoral (*A. lixula*). Serão realizados experimentos “*in vivo*” com as três espécies, envolvendo retirada de fluido celômico para análises de concentrações osmótica e iônicas, para verificar possíveis diferenças entre as espécies, os tempos e as salinidades.

## JUSTIFICATIVA

A importância do presente trabalho reside no fato de que são escassos os estudos acerca da fisiologia dos equinodermos. Além disso, estes animais enfrentam desafios osmóticos, em seu habitat, com um sucesso que seria inesperado para animais inteiramente estenohalinos e osmoconformadores.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta

As coletas de *Holothuria grisea*, *Arbacia lixula* e *Echinometra lucunter* foram realizadas na Praia da Paciência (26° 46' 59" S e 48° 36' 07" W), Penha, Santa Catarina (Figura 4), manualmente durante a maré baixa. A Praia da Paciência possui um grande costão rochoso com abundância de organismos característicos deste tipo de ambiente, como: gastrópodes, bivalves, cnidários, equinodermos, crustáceos, etc. A temperatura média da água foi de 20° C e a salinidade de aproximadamente 33‰.



**Figura 4.** Mapa da área de estudo, mostrando a localização da Praia da Paciência Município de Penha no estado de Santa Catarina. Fonte: Google, 2009.

## **Transporte e aclimação**

Os espécimes retirados da Praia da Paciência foram transportados em isopor e envolvidos por algas, até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, onde foram aclimatados por cerca de 5 a 7 dias a salinidade de 35‰, temperatura de 20°C ± 2, aeração e filtração constantes. Durante o período de aclimação, os animais foram alimentados com algas marinhas e fragmentos de carne de peixe (*Arbacia lixula*), permaneceram sob fotoperíodo natural, e o pH da água foi medido diariamente e corrigido para cerca de 8,2. Após o período de aclimação os animais foram processados.

## **Experimentos**

Os experimentos foram realizados com n=6. Cada animal foi colocado individualmente em um aquário contendo cerca de 2 litros de água de salinidades 25‰ ou 45‰ (experimentais) ou 35‰ (controle), temperatura de 20°C ± 2, e aeração constante, onde permaneceram por 6 horas. Este tempo de experimento foi determinado porque reflete a duração de um ciclo de marés. No tempo zero e após 1, 2, 3 e 6 horas foram colhidas amostras de fluido celômico de cada animal, com o auxílio de uma seringa de insulina, através da membrana peristomial dos ouriços-do-mar e da parede do corpo dos pepinos-do-mar. As amostras foram armazenadas em freezer a -20° C em tubos *Eppendorff* devidamente identificados, até análise de osmolalidade e dosagens de íons. Amostras de água de cada aquário foram retiradas também nos tempos 0 e 6 horas, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. E foram realizadas as dosagens de osmolalidade, sódio, potássio, cloreto e magnésio, também das amostras de água. Após o experimento, os animais foram colocados em aquário à parte, e quando se recuperavam eram reconduzidos ao seu ambiente, para onde eram devolvidos. As águas foram confeccionadas a partir

de água do mar, sendo que a mesma foi diluída por adição de água doce filtrada da torneira (sem cloro) até atingir salinidade 25‰, e concentrada por adição de sal marinho (sal com proporções de íons semelhantes às da água do mar) adquirido em loja de aquário até atingir 45‰. O experimento controle foi realizado com água do mar (35‰). A salinidade da água foi aferida com a utilização de salinômetro/refratômetro Instrutherm.

### **Dosagens iônicas e leitura de osmolalidade**

Foram realizadas a leitura de osmolalidade e as dosagens dos íons sódio, potássio, cloreto e magnésio nas amostras de água e fluido celômico colhidas durante os experimentos. Antes destas análises, as amostras foram retiradas do freezer, descongeladas, agitadas em vórtex e centrifugadas em centrífuga Eppendorf 5415D. As leituras de osmolalidade foram realizadas com o micro-osmômetro de Pressão de Vapor Wescor, modelo VAPRO 5520, em amostras não diluídas. As dosagens de concentração iônica de sódio e potássio foram realizadas em fotômetro de chama CELM-160, em amostras diluídas apropriadamente em água ultra-pura. Para os íons cloreto e magnésio, foram utilizados kits comerciais Labtest, com absorbâncias lidas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia Biotech. Os valores medidos nas águas estão mostrados na Tabela 1.

### **Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi feita por ANOVA de duas vias, sendo que o primeiro fator corresponde à salinidade e o segundo ao tempo para cada espécie. Foi realizada também ANOVA de uma via para o fator espécie. Ambas as análises com *post hoc* de Tukey. Sempre o limite de significância considerado foi 0,05.

**Tabela 1.** Medidas das concentrações osmótica, de cloreto, sódio, magnésio e potássio das águas experimentais (25 e 45‰) e da água controle (35‰).

<b>Variável medida</b>	<b>25‰</b>	<b>35‰</b>	<b>45‰</b>
<b>Osmolalidade</b>	643 ± 12	962 ± 5	1187 ± 13
<b>Cloreto</b>	377 ± 3,6	558 ± 7,8	712 ± 9,7
<b>Sódio</b>	315 ± 5,2	468 ± 3	525 ± 6,3
<b>Magnésio</b>	30,7 ± 0,8	56,3 ± 1,3	61,4 ± 1,18
<b>Potássio</b>	6,8 ± 0,16	9,5 ± 0,15	11,6 ± 0,63

## RESULTADOS

### Osmolalidade

A ANOVA de 2 vias realizada com os dados de osmolalidade do fluido celômico (FC) de *Arbacia lixula* revelou efeito do fator salinidade e da interação dos 2 fatores em conjunto (salinidade e tempo). O mesmo ocorreu para *Echinometra lucunter*. No caso de *Holothuria grisea*, ambos os fatores e a interação entre eles revelaram efeito.

*Arbacia lixula* a 25‰ apresentou uma queda no valor de osmolalidade entre os tempos zero e 1 h, na seqüência tal concentração se manteve até 2 h, mas teve uma nova diminuição entre 2 e 6 h. Na condição de 35‰ (controle) a medida de osmolalidade se manteve ao longo de todo o experimento. Em 45‰ tal medida subiu entre zero e 1 h e entre 1 e 3 h, mas se manteve a partir de então até as 6 h. Nos tempos de 1, 2, 3 e 6 h *A. lixula* apresentou diferença na concentração osmótica entre todas as salinidades, sendo que o valor de 25‰ é menor do que o de 35‰, e este é menor do que o de 45‰ (Tabela 2A).

*Echinometra lucunter* a 25‰ apresentou queda progressiva nos valores de osmolalidade do início ao fim do experimento, apenas havendo uma pequena manutenção de concentração entre os tempos 1 e 2 h, e 2 e 3 h. Na condição controle as medidas de osmolalidade foram mantidas de zero a 6 h. Em 45‰ a concentração osmótica foi mantida até 1 h de experimento, aumentou até a segunda hora, se manteve entre a segunda e a terceira, e então subiu até a sexta. No tempo 1 *E. lucunter* apresentou concentração osmótica inferior em salinidade de 25‰ com relação às demais. Nos tempos 2, 3 e 6 h, a osmolalidade dos animais em 25‰ foi inferior às dos em 35‰, e estas inferiores às dos em 45‰ (Tabela 2B).

*Holothuria grisea* a 25‰ apresentou queda progressiva nos valores de osmolalidade entre os tempos zero e 3 h, mas houve manutenção destes valores a partir de 3 h até o final do experimento. A 35‰ o parâmetro em questão se manteve ao longo das 6 horas. Em 45‰ houve aumento nas medidas de osmolalidade até a primeira hora e entre a terceira e a sexta horas.

Nos tempo 1, 2, 3 e 6 h *H. grisea* apresentou, em 25‰, osmolalidade inferior à encontrada em 35‰, e esta inferior à obtida em 45‰ (Tabela 2C).

A ANOVA de uma via apontou as diferenças entre as espécies nos diferentes tempos e salinidades. No tempo zero, a 25‰ (Fig 5A) e a 35‰ (Fig 5B), *A. lixula* apresentou valores de osmolalidade superiores aos de *H. grisea*. Após 1 h, ainda em ambas as salinidades, os valores de osmolalidade para as três espécies foram iguais, mas em 45‰ (Fig 5C) *E. lucunter* apresentou osmolalidade inferior à das demais espécies. A 2 h de experimento, *E. lucunter* apresentou osmolalidade maior em 25‰ e menor em 45‰, com relação a *A. lixula* e *H. grisea*. A 3 h, *E. lucunter* apresentou valores superiores do que os das demais espécies em 25‰. Já em 45‰ foram obtidos valores inferiores para o mesmo ouriço com relação a *A. lixula*. Ao tempo final de exposição, *H. grisea* apresentou osmolalidade superior à de *A. lixula* a 25‰, o oposto ocorreu a 35‰, e a 45‰ *E. lucunter* apresentou valores inferiores aos das outras duas espécies.



**Tabela 2.** Medidas de osmolalidade (mOsm/kg) do fluido celômico de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B) e *H. grisea* (C). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as salinidades e letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre os tempos para cada espécie.

A

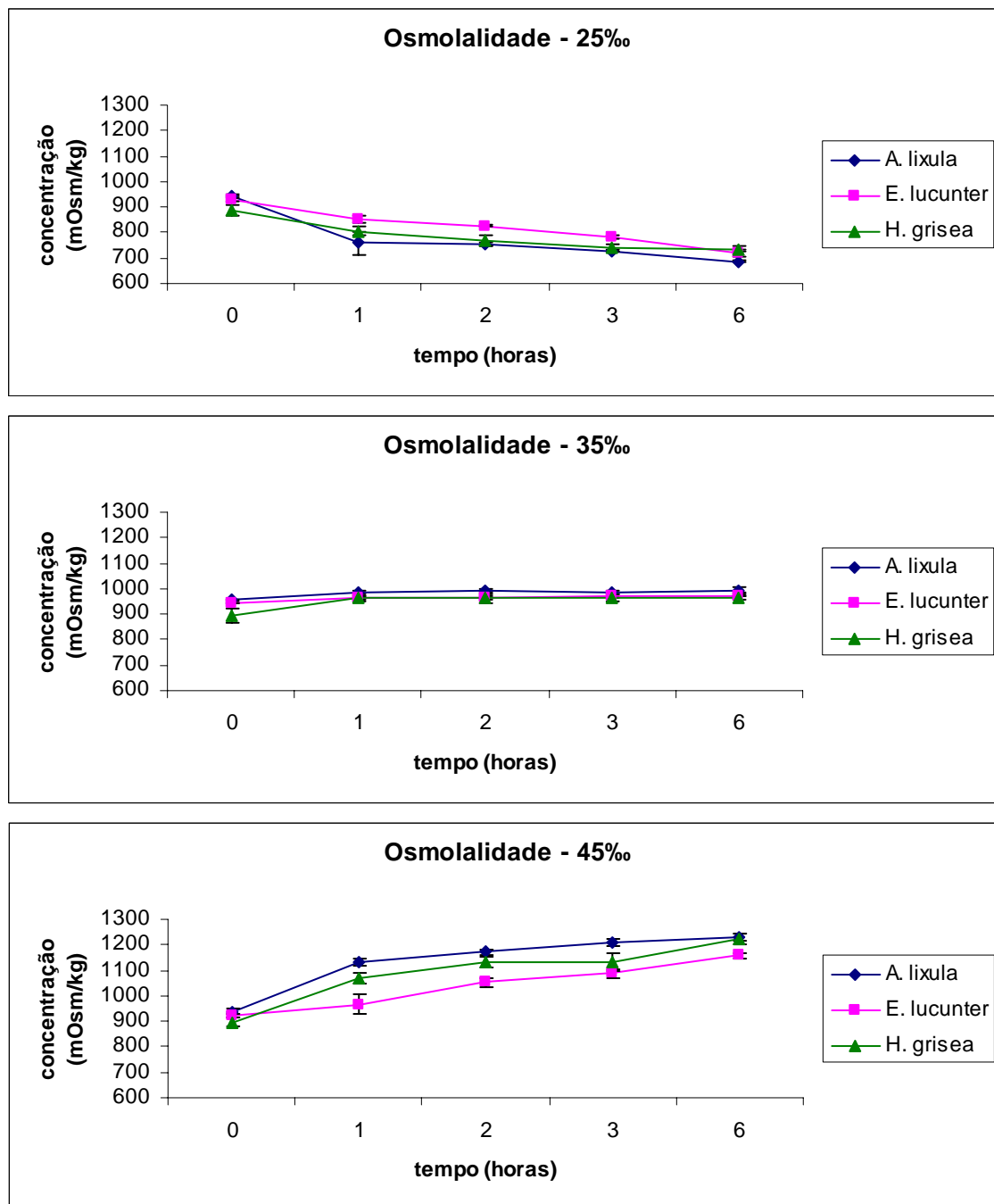
Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	945 ± 5 <sup>1a</sup>	758 ± 42 <sup>1c</sup>	755 ± 4,6 <sup>1c</sup>	728 ± 4,8 <sup>1bc</sup>	686,5 ± 5 <sup>1b</sup>
35‰	955 ± 5 <sup>1a</sup>	983 ± 10 <sup>2a</sup>	994 ± 7,3 <sup>2a</sup>	982 ± 8,7 <sup>2a</sup>	995 ± 8,6 <sup>2a</sup>
45‰	938,5 ± 11 <sup>1a</sup>	1131 ± 15 <sup>3c</sup>	1173 ± 11 <sup>3cb</sup>	1207,5 ± 12 <sup>3b</sup>	1228 ± 14,5 <sup>3b</sup>

B

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	928 ± 5,8 <sup>1a</sup>	853 ± 14 <sup>1d</sup>	826 ± 3,6 <sup>1cd</sup>	781 ± 6 <sup>1c</sup>	719 ± 12,7 <sup>1b</sup>
35‰	942 ± 2,6 <sup>1a</sup>	963 ± 6 <sup>2a</sup>	965 ± 5,3 <sup>2a</sup>	970,5 ± 5 <sup>2a</sup>	974 ± 4 <sup>2a</sup>
45‰	921 ± 8 <sup>1a</sup>	966 ± 37 <sup>2a</sup>	1053 ± 17 <sup>3c</sup>	1089 ± 16 <sup>3c</sup>	1157 ± 13 <sup>3b</sup>

C

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	887 ± 23 <sup>1a</sup>	806 ± 15 <sup>1b</sup>	770,5 ± 21 <sup>1b</sup>	739,5 ± 16 <sup>1b</sup>	735 ± 9,6 <sup>1b</sup>
35‰	892 ± 27 <sup>1a</sup>	964 ± 13 <sup>2a</sup>	961 ± 18 <sup>2a</sup>	963 ± 12,8 <sup>2a</sup>	964 ± 10 <sup>2a</sup>
45‰	897 ± 14,7 <sup>1a</sup>	1069 ± 19 <sup>3c</sup>	1129 ± 21 <sup>3c</sup>	1129 ± 35 <sup>3c</sup>	1222 ± 19,5 <sup>3b</sup>



**Figura 5.** Osmolalidade do fluido celômico (FC) nas três espécies estudadas. Linhas azuis: *Arbacia lixula*; linhas rosas: *Echinometra lucunter*; linhas verdes: *Holothuria grisea*, nas salinidades 25‰ (A), 35‰ (B) e 45‰ (C). Letras diferentes indicam diferenças entre as espécies em cada tempo, pelo resultado da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey; cada letra é da mesma cor da linha da espécie à qual se refere.

## Cloreto

A ANOVA de 2 vias realizada com os dados de cloreto do fluido celômico (FC) de *Arbacia lixula* revelou efeito do fator salinidade e da interação dos 2 fatores em conjunto. O mesmo ocorreu para *Echinometra lucunter*. No caso de *Holothuria grisea*, ambos os fatores e a interação entre eles revelaram efeito.

*Arbacia lixula* a 25‰ apresentou uma queda na concentração de cloreto entre os tempo zero e 1h, mas de 1 a 6 horas tal concentração se manteve inalterada. A 35‰ as concentrações se mantiveram do início ao fim do experimento. A 45‰ os valores para cloreto subiram entre o tempo zero e a primeira hora de experimento, se mantiveram até a segunda hora e subiram novamente entre 2 e 6 h. Sobre as concentrações de cloreto nas diferentes salinidades, apenas não houve diferença entre 35 e 45‰ do tempo zero. Em todas as demais comparações os valores de concentração de cloreto da salinidade 25‰ foram inferiores aos da 35‰, e estes inferiores aos da 45‰ (Tabela 3A).

*Echinometra lucunter* em 25‰ teve queda na sua concentração de cloreto entre zero e 3 h, mas este valor se manteve até o tempo final. Na condição controle a concentração de cloreto se manteve inalterada ao longo das 6 h de exposição. Em 45‰ a concentração de cloreto aumentou entre os tempo zero e 2 h, e entre a primeira e a sexta horas. No tempo zero, a concentração de cloreto no FC de *E. lucunter* exposto à salinidade controle foi superior à dos expostos à de 25‰. Nos tempo 1, 2, 3 e 6 os valores do mesmo íon para a condição de 25‰ foram inferiores aos obtidos nas demais salinidades (Tabela 3B).

*Holothuria grisea* em 25‰ revelou uma diminuição da concentração de cloreto entre os tempos zero e 6 horas. No controle tal concentração se manteve do início ao fim do experimento. Em 45‰ a medida de cloreto aumentou entre zero e 3 h e entre 1 e 6 h. No tempo zero, em 25‰ a concentração do íon em questão foi inferior às encontradas em 35 e 45‰. Nos tempos 1, 2, 3 e 6 h a medida de cloreto encontrada em 25‰ foi inferior à encontrada em 35‰, e esta menor do que a de 45‰ (Tabela 3C).

A ANOVA de uma via apontou as diferenças entre as espécies nos diferentes tempos e salinidades. Em salinidade 25‰ (Fig 6A) as espécies não apresentaram diferenças entre si em nenhum dos tempos experimentais quanto à concentração de cloreto no FC. Após 1 h de exposição, à salinidade 45‰ (Fig 6C), *A. lixula* apresentou maior concentração do íon em questão do que *E. lucunter*. Este, após 3 h sob as mesmas condições mostrou valor inferior aos das outras duas espécies. Ao tempo final do experimento, foram obtidas medidas de cloreto, em 35‰ (Fig 6B), superiores para *E. lucunter* do que para *H. grisea*; e em 45‰, inferiores para *E. lucunter* com relação às demais espécies.

**Tabela 3.** Medidas de concentração de cloreto (mM) do fluido celômico de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B) e *H. grisea* (C). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as salinidades e letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre os tempos para cada espécie.

A

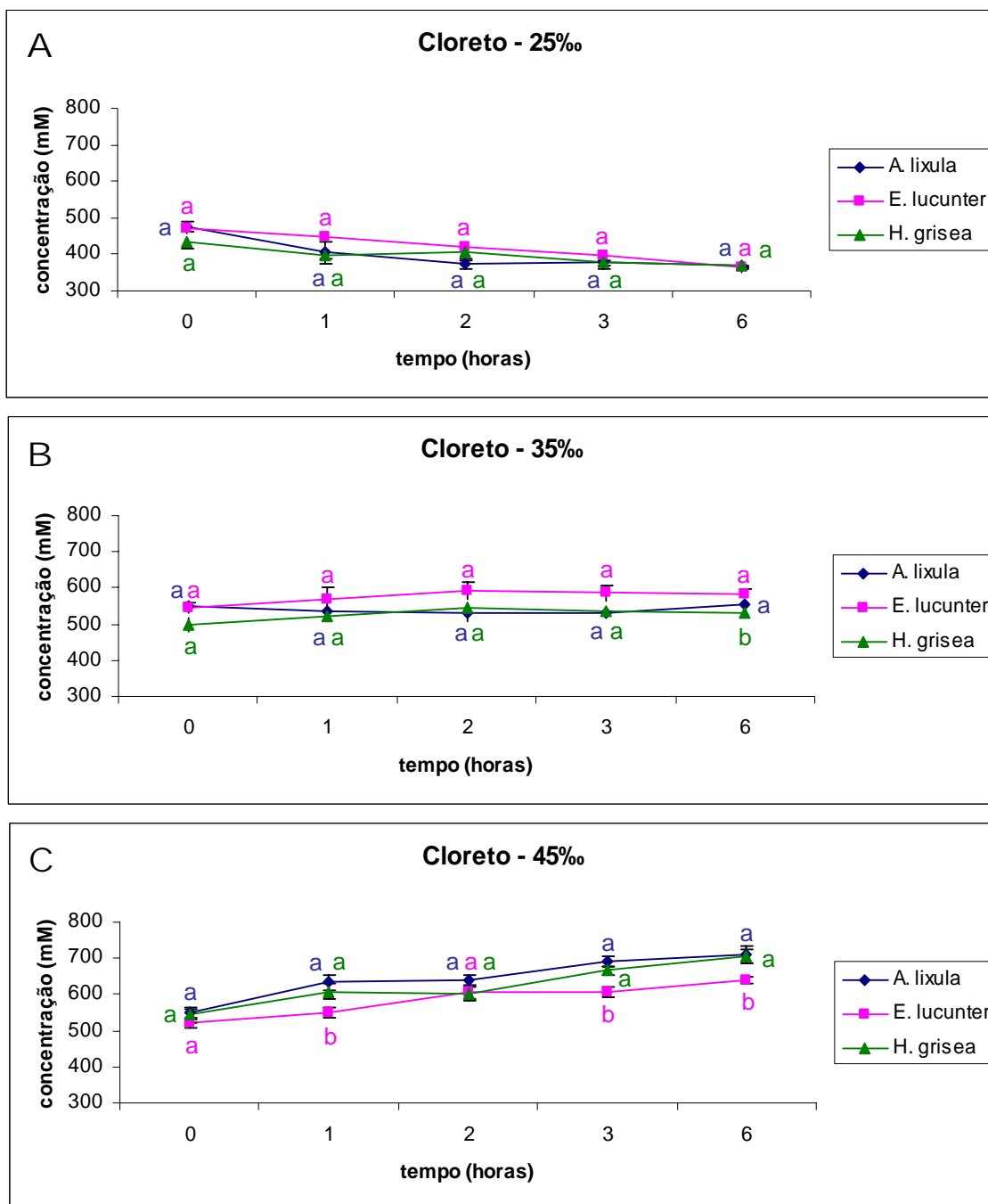
Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	476 ± 14 <sup>1a</sup>	405 ± 29 <sup>1b</sup>	375 ± 13,83 <sup>1b</sup>	376 ± 8,4 <sup>1b</sup>	367 ± 4,4 <sup>1b</sup>
35‰	550 ± 13,5 <sup>2a</sup>	538 ± 18 <sup>2a</sup>	529 ± 19 <sup>2a</sup>	531 ± 15 <sup>2a</sup>	556 ± 11,4 <sup>2a</sup>
45‰	548 ± 10,7 <sup>2a</sup>	633 ± 20 <sup>3c</sup>	639 ± 14,7 <sup>3c</sup>	691 ± 15 <sup>3bc</sup>	711 ± 22,3 <sup>3b</sup>

B

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	473 ± 14,5 <sup>1a</sup>	450 ± 12 <sup>1ac</sup>	421,5 ± 5 <sup>1ab</sup>	398 ± 9 <sup>1bc</sup>	366 ± 15 <sup>1b</sup>
35‰	546 ± 15,5 <sup>2a</sup>	570 ± 33,7 <sup>2a</sup>	594 ± 23,6 <sup>2a</sup>	586 ± 22 <sup>2a</sup>	585 ± 12 <sup>2a</sup>
45‰	521 ± 12 <sup>12a</sup>	549 ± 13 <sup>2ac</sup>	604 ± 19 <sup>2bc</sup>	607 ± 14,6 <sup>2bc</sup>	640,5 ± 8,7 <sup>2b</sup>

C

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	433,7 ± 17,5 <sup>1a</sup>	397 ± 10 <sup>1ab</sup>	407 ± 22,7 <sup>1ab</sup>	377 ± 19 <sup>1ab</sup>	370 ± 9,5 <sup>1b</sup>
35‰	500 ± 19 <sup>2a</sup>	522 ± 14 <sup>2a</sup>	547 ± 14 <sup>2a</sup>	535 ± 8,6 <sup>2a</sup>	532 ± 9,6 <sup>2a</sup>
45‰	545 ± 21 <sup>2a</sup>	607 ± 22 <sup>3ac</sup>	603 ± 15 <sup>3ac</sup>	667 ± 12 <sup>3bc</sup>	706 ± 17,4 <sup>3b</sup>



**Figura 6.** Concentração de cloreto do fluido celômico (FC) nas três espécies estudadas. Linhas azuis: *Arbacia lixula*; linhas rosas: *Echinometra lucunter*; linhas verdes: *Holothuria grisea*, nas salinidades 25‰ (A), 35‰ (B) e 45‰ (C). Letras diferentes indicam diferenças entre as espécies em cada tempo, pelo resultado da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey; cada letra é da mesma cor da linha da espécie à qual se refere.

## Sódio

A ANOVA de 2 vias realizada com os dados de sódio do fluido celômico (FC) de *Arbacia lixula* revelou efeito do fator salinidade e da interação dos 2 fatores em conjunto. No caso de *Echinometra lucunter*, houve efeito de cada um dos dois fatores individualmente e destes em conjunto. A análise realizada para *Holothuria grisea* revelou os mesmos efeitos encontrados na ANOVA de *A. lixula*.

Em salinidade 25‰ os valores de concentração de sódio no FC de *A. lixula* diminuíram entre o início do experimento e a primeira hora, e entre os tempos 1 e 3 h. Tais concentrações foram mantidas entre 3 e 6 h. Sob salinidade controle as concentrações de sódio foram mantidas ao longo de todo o experimento. Em 45‰ houve um aumento dos valores de sódio entre o tempo inicial e a primeira hora de experimento, sendo que tal medida foi mantida até as 6 h de exposição. Nos tempos 1, 2, 3 e 6 h as concentrações de sódio encontradas nos animais experimentais da condição de salinidade 25‰ foram inferiores às obtidas nos controles, e estes menores do que os de 45‰ (Tabela 4A).

*Echinometra lucunter* em 25‰ apresentou queda na concentração de sódio entre o início do experimento e a primeira hora, e entre esta e o final do tempo de exposição. Em 35‰ a concentração do íon em questão se manteve ao longo de todo o período experimental. Em 45‰ os valores de concentração de sódio do FC de *E. lucunter* foram mantidos (não aumentaram) apenas entre 0 e 1 h, e entre 2 e 3 h. No tempo zero, o valor de sódio encontrado em 25‰ foi inferior ao controle. Em 1 e 2 h, as medidas obtidas em 25‰ foram inferiores às das encontradas nas salinidades 35 e 45‰. Em 3 e 6 h, a concentração de sódio medida em 25‰ foi menor do que a controle, e esta menor do que a em 45‰ (Tabela 4B).

*Holothuria grisea* em 25‰ apresentou diminuição na concentração de sódio entre o início do experimento e a segunda hora e entre 1 e 3 h. Na salinidade controle a concentração de sódio inicial foi inferior à final. Em 45‰ tal concentração aumentou entre o tempo inicial e a segunda hora, e foi mantida até o tempo final, sendo que o valor encontrado em 1 h foi inferior ao

obtido em 6 h de experimento. Nos tempos de 1 e 3 h, as concentrações de sódio encontradas nas *H. grisea* experimentais de 25‰ foram inferiores às obtidas a partir dos espécimes submetidos às outras duas salinidades. Em 2 e 6 h, as medidas para a condição de 25‰ foram menores do que as encontradas para a controle, e estas inferiores às de 45‰ (Tabela 4C).

A ANOVA de uma via apontou as diferenças entre as espécies nos diferentes tempos e salinidades. No tempo zero o FC de *A. lixula* apresentou maior concentração de sódio do que o de *E. lucunter* em ambas as salinidades experimentais. Após 1 h de exposição à salinidade de 45‰ (Fig 7C), *A. lixula* apresentou uma concentração de sódio mais elevadas do que as demais espécies. A 2 h de exposição a 25‰ (Fig 7A), foi detectada uma medida menor do íon em questão em *A. lixula* com relação a *H. grisea*. Ao mesmo tempo, mas à condição de 45‰, foi obtido um fluido mais concentrado de *A. lixula* do que das outras duas espécies. Após 3 h de experimento de salinidade 25‰, *A. lixula* apresentou concentração de sódio inferior à de *H. grisea* sob a mesma condição. Ao final do experimento de 25‰ *H. grisea* apresentou valores de concentração do íon em questão superiores aos dos ouriços. Ao mesmo tempo, mas em 45‰ foram obtidas medidas superiores para *A. lixula* do que para as outras duas espécies.



**Tabela 4.** Medidas de concentração de sódio (mM) do fluido celômico de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B) e *H. grisea* (C). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as salinidades e letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre os tempos para cada espécie.

A

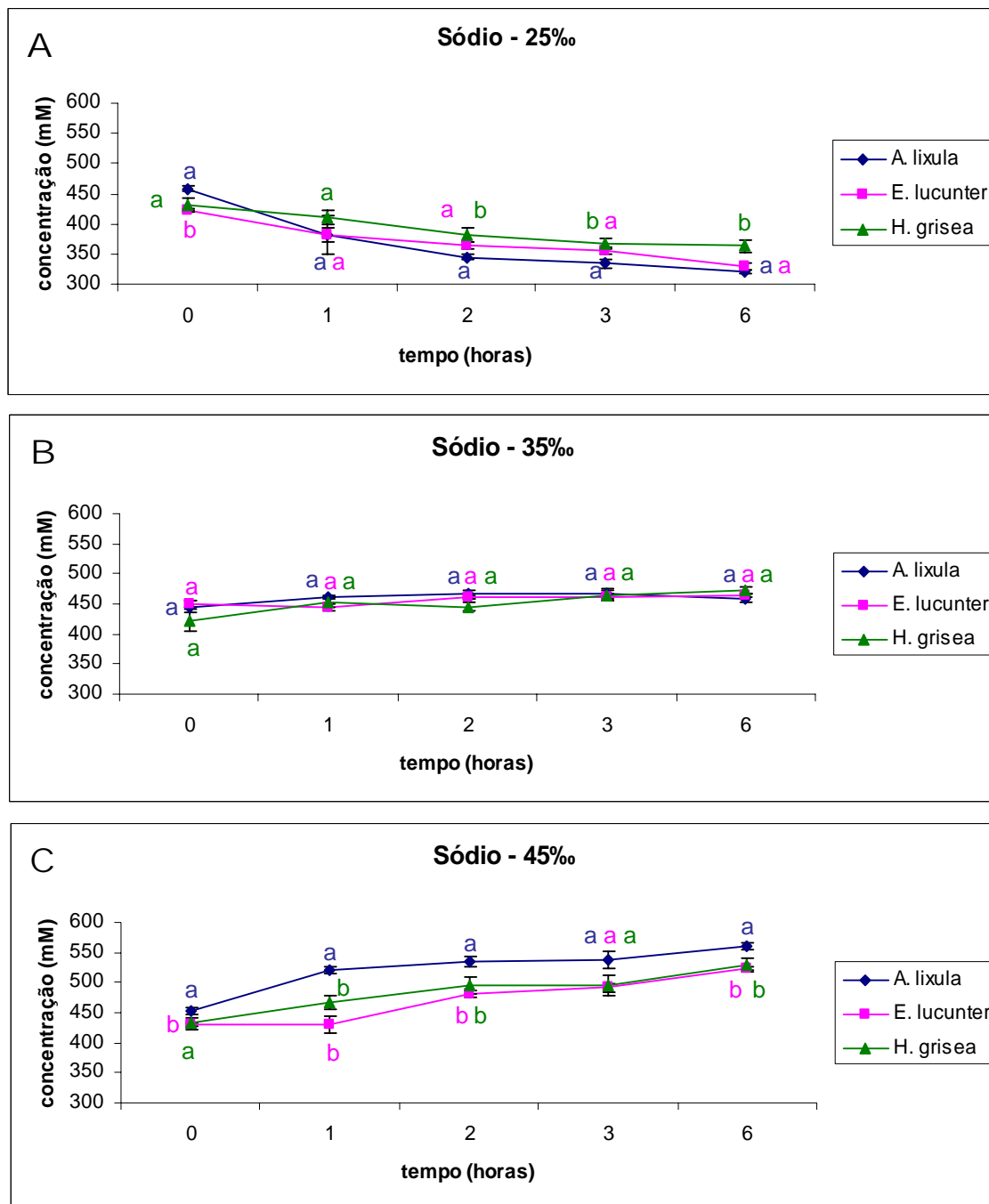
Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	458 ± 5 <sup>1a</sup>	382 ± 33 <sup>1c</sup>	345 ± 4 <sup>1bc</sup>	333 ± 6,7 <sup>1b</sup>	321 ± 4 <sup>1b</sup>
35‰	445 ± 9 <sup>1a</sup>	461 ± 2,4 <sup>2a</sup>	466 ± 6,4 <sup>2a</sup>	468 ± 8 <sup>2a</sup>	459 ± 6,7 <sup>2a</sup>
45‰	453 ± 5 <sup>1a</sup>	521 ± 6,2 <sup>3b</sup>	536 ± 8 <sup>3b</sup>	537 ± 15 <sup>3b</sup>	560 ± 5,5 <sup>3b</sup>

B

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	422 ± 3,3 <sup>1a</sup>	381 ± 12 <sup>1b</sup>	365 ± 5,3 <sup>1b</sup>	355 ± 5 <sup>1bc</sup>	328 ± 6 <sup>1c</sup>
35‰	450 ± 5,4 <sup>2a</sup>	444 ± 6 <sup>2a</sup>	462 ± 3,7 <sup>2a</sup>	461 ± 5,7 <sup>2a</sup>	464 ± 3,4 <sup>2a</sup>
45‰	430 ± 2,6 <sup>12a</sup>	430 ± 14 <sup>2a</sup>	480 ± 6 <sup>2c</sup>	492 ± 7,7 <sup>3c</sup>	522,5 ± 5 <sup>3b</sup>

C

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	432 ± 10,6 <sup>1a</sup>	412 ± 12 <sup>1ac</sup>	382 ± 12 <sup>1bc</sup>	367 ± 9 <sup>1b</sup>	363 ± 9 <sup>1b</sup>
35‰	423 ± 19 <sup>1a</sup>	453 ± 8 <sup>2ab</sup>	446 ± 6,6 <sup>2ab</sup>	464,5 ± 8 <sup>2ab</sup>	473 ± 5,6 <sup>2b</sup>
45‰	432,5 ± 10 <sup>1a</sup>	466 ± 11 <sup>2ac</sup>	495 ± 13 <sup>3bc</sup>	495 ± 17 <sup>2bc</sup>	530 ± 9 <sup>3b</sup>



**Figura 7.** Concentração de sódio do fluido celômico (FC) nas três espécies estudadas. Linhas azuis: *Arbacia lixula*; linhas rosas: *Echinometra lucunter*; linhas verdes: *Holothuria grisea*, nas salinidades 25‰ (A), 35‰ (B) e 45‰ (C). Letras diferentes indicam diferenças entre as espécies em cada tempo, pelo resultado da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey; cada letra é da mesma cor da linha da espécie à qual se refere.

## Magnésio

A ANOVA de 2 vias realizada com os dados de magnésio do fluido celômico (FC) de *Arbacia lixula* revelou efeito de ambos os fatores individualmente e dos mesmos em conjunto. Nos casos de *Echinometra lucunter* e *H. grisea*, apenas não houve efeito do fator tempo.

*Arbacia lixula* em 25‰ teve a concentração de magnésio em seu FC diminuída entre os tempos zero e 1 h, mas tal concentração retornou ao valor inicial entre a primeira e a segunda h, sendo mantida até o tempo final. Na condição controle a concentração do íon em questão permaneceu inalterada ao longo das 6 h de experimento. Em 45‰ o valor medido de magnésio aumentou entre o tempo inicial e a primeira hora de exposição, mas foi mantido entre 1 e 6 h. Após 1 e 6 h em 25‰, as concentrações de magnésio do FC de *A. lixula* foram menores do que as encontradas para 35‰, e estas inferiores às obtidas para 45‰. No tempo de 2 horas, as concentrações de magnésio em *A. lixula*, referentes à condição de 45‰, foram superiores às demais condições de salinidade. Após 3 h de experimento, os valores em questão foram maiores sob 45‰ do que sob 25‰ (Tabela 5A).

*Echinometra lucunter* em 25‰ apresentou manutenção da concentração de magnésio em seu FC até a primeira hora de experimento, seguida de uma queda da mesma entre a primeira e a segunda horas. Entre os tempos 2 e 6 h as concentrações foram mantidas. A mesma espécie sob a condição controle não apresentou alteração de concentração do íon em questão ao longo de todo o experimento. Em 45‰ a concentração de magnésio sofreu um aumento entre os tempos zero e 3 h, mas foi mantida entre a terceira e a sexta horas. No tempo 1 h, a concentração de magnésio do fluido celômico de *E. lucunter* controle foi inferior às duas experimentais. Nos tempos de 2 e 6 h, os fluidos dos animais expostos à salinidade de 45‰ foram mais concentrados do que os das demais salinidades, com relação ao íon magnésio. Em 3 h a concentração de magnésio em 25‰ foi menor do que a no controle, sendo esta inferior à em 45‰ (Tabela 5B).

*Holothuria grisea*, nas salinidades 25 e 35‰ não apresentou alteração na concentração de magnésio em seu FC ao longo das 6 h de experimento. Já

sob salinidade 45‰, houve um aumento da concentração em questão apenas entre 3 e 6 h. No tempo de 1 h, *H. grisea* apresentou concentração de magnésio inferior em 25‰ com relação às outras duas salinidades. Nos demais tempos de experimento, os valores em questão, sob 25‰, foram menores quando comparados aos controles, sendo estes menores do que os de 45‰ (Tabela 5C).

A ANOVA de uma via apontou as diferenças entre as espécies nos diferentes tempos e salinidades. No início do experimento, em 25‰ (Fig 8A) *E. lucunter* apresentou concentração de magnésio superior à de *H. grisea*; em 35‰ (Fig 8B) *E. lucunter* apresentou concentração deste íon inferior com relação às outras duas espécies estudadas; e em 45‰ (Fig 8C) *H. grisea* apresentou medida superior às dos ouriços. Após 1 h, em 25‰ foram obtidas medidas maiores para *E. lucunter* do que para as demais espécies, sendo que o oposto ocorreu nas salinidades 35 e 45‰, no mesmo tempo. A 2 h de exposição *A. lixula* e *H. grisea* apresentaram valores superiores aos de *E. lucunter* nas salinidades 35 e 45‰. Em 3 h de experimento, o mesmo ocorreu, mas apenas para o controle. No tempo final, também no controle, foram obtidas concentrações de magnésio superiores em *A. lixula* com relação a *E. lucunter*.

**Tabela 5.** Medidas de concentração de magnésio (mM) do fluido celômico de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B) e *H. grisea* (C). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as salinidades e letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre os tempos para cada espécie.

A

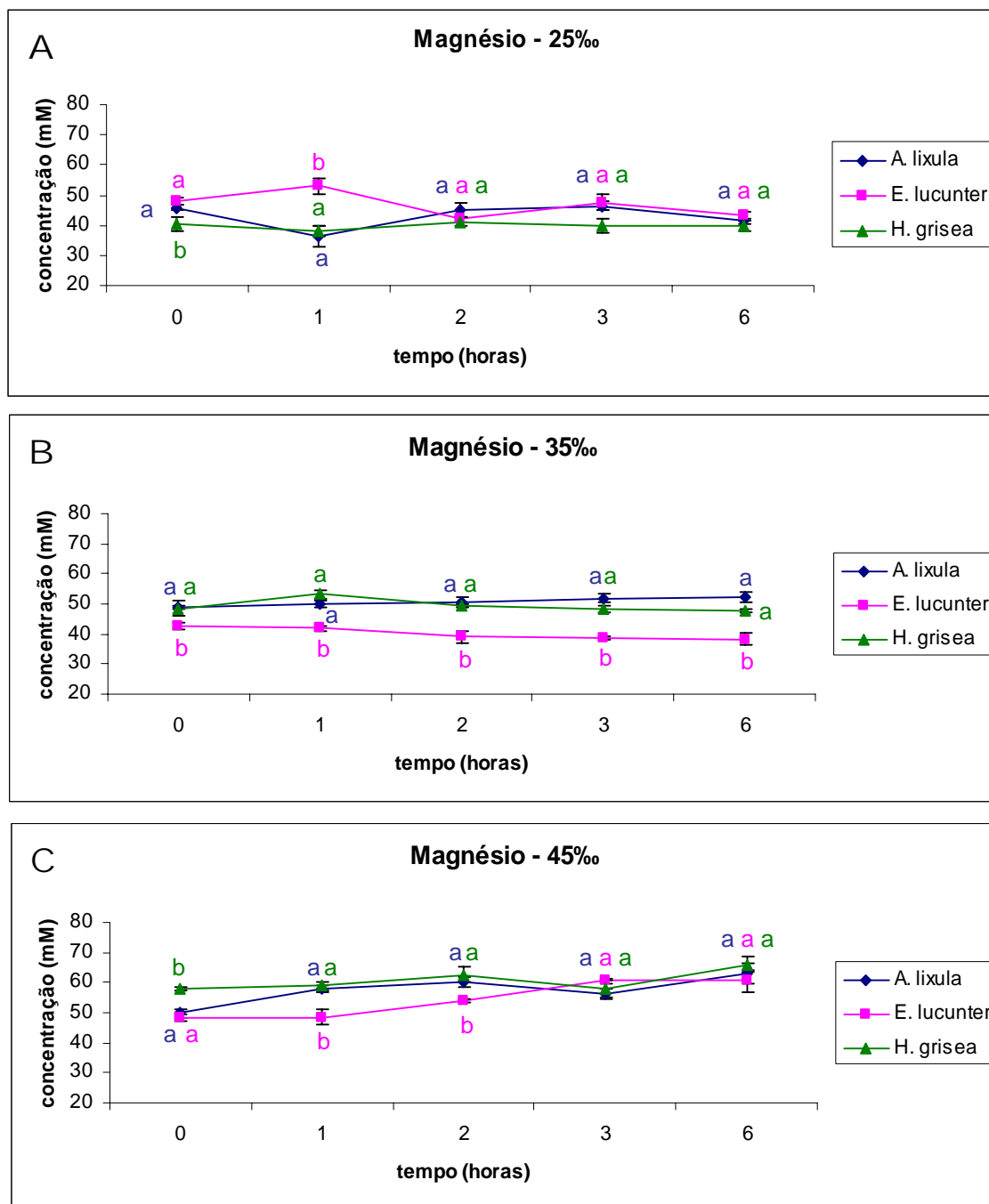
Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	46 ± 0,84 <sup>1a</sup>	36 ± 3,6 <sup>1b</sup>	45 ± 2,5 <sup>1a</sup>	46 ± 1,5 <sup>1a</sup>	41 ± 0,86 <sup>1ab</sup>
35‰	49 ± 0,6 <sup>1a</sup>	50 ± 1,14 <sup>2a</sup>	50,8 ± 1,2 <sup>1a</sup>	51,9 ± 1,4 <sup>12a</sup>	52 ± 1,6 <sup>2a</sup>
45‰	49,7 ± 1,5 <sup>1a</sup>	58 ± 0,94 <sup>3b</sup>	60 ± 1,6 <sup>2b</sup>	56 ± 1,46 <sup>2ab</sup>	63 ± 3,4 <sup>3b</sup>

B

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	48 ± 1,2 <sup>1ab</sup>	53 ± 2,6 <sup>1a</sup>	42 ± 0,8 <sup>1b</sup>	47,6 ± 2,8 <sup>1ab</sup>	43 ± 1,45 <sup>1b</sup>
35‰	43 ± 1,15 <sup>1a</sup>	42 ± 0,8 <sup>2a</sup>	39 ± 2,1 <sup>1a</sup>	38,7 ± 0,53 <sup>2a</sup>	38 ± 2 <sup>1a</sup>
45‰	48 ± 1,12 <sup>1a</sup>	48,5 ± 2,7 <sup>1a</sup>	54 ± 0,58 <sup>2ab</sup>	60,5 ± 1 <sup>3b</sup>	61 ± 3,6 <sup>2b</sup>

C

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	40,6 ± 2,3 <sup>1a</sup>	38 ± 1,8 <sup>1a</sup>	41 ± 1,7 <sup>1a</sup>	40 ± 2,4 <sup>1a</sup>	40 ± 1,6 <sup>1a</sup>
35‰	48 ± 2,6 <sup>2a</sup>	53 ± 1,5 <sup>2a</sup>	49 ± 0,56 <sup>2a</sup>	48 ± 1,15 <sup>2a</sup>	48 ± 0,43 <sup>2a</sup>
45‰	58 ± 0,44 <sup>3a</sup>	59 ± 1,36 <sup>2ab</sup>	62,7 ± 2,4 <sup>3ab</sup>	58 ± 2,7 <sup>3a</sup>	66 ± 2,5 <sup>3b</sup>



**Figura 8.** Concentração de magnésio do fluido celômico (FC) nas três espécies estudadas. Linhas azuis: *Arbacia lixula*; linhas rosas: *Echinometra lucunter*; linhas verdes: *Holothuria grisea*, nas salinidades 25‰ (A), 35‰ (B) e 45‰ (C). Letras diferentes indicam diferenças entre as espécies em cada tempo, pelo resultado da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey; cada letra é da mesma cor da linha da espécie à qual se refere.

## Potássio

A ANOVA de 2 vias realizada com os dados de potássio do fluido celômico (FC) de *Arbacia lixula* revelou efeito do fator salinidade e da interação dos 2 fatores em conjunto. Nos casos de *E. lucunter* e *H. grisea*, ambos os fatores e a interação entre eles revelaram efeito.

*Arbacia lixula* a 25‰ apresentou uma queda na concentração de potássio entre os tempos zero e 1 h, seguida de um retorno da concentração inicial entre 1 e 3 h. Por fim, tal valor foi mantido entre 3 e 6 h. Sob condição controle os valores de concentração de potássio no FC de *A. lixula* foram mantidos constantes ao longo de todo o experimento. Em 45‰ as medidas de potássio para *A. lixula* aumentaram até a primeira hora, então se mantiveram até a segunda hora, e entre 2 e 6 h diminuíram novamente, retornando ao valor inicial. Nos tempos inicial e final, a concentração de potássio nos animais em 45‰ foram superiores às dos expostos às outras duas salinidades. A 1, 2 e 3 h de experimento os valores medidos para a condição de 25‰ foram inferiores aos controles, e estes menores do que os registrados para 45‰ (Tabela 6A).

*Echinometra lucunter* em 25‰ apresentou diminuição da concentração de potássio entre os tempos 0 e 6 h e entre 2 e 6 h. Em 35‰, o valor encontrado no tempo zero foi superior aos obtidos após 3 e 6 h. Além disso, a concentração de potássio do FC de *E. lucunter* foi superior em 1 h com relação ao valor do tempo final. Sob salinidade de 45‰, *E. lucunter* teve sua concentração de potássio aumentada entre a primeira e a sexta hora de experimento. A concentração controle do tempo inicial foi superior à da condição de salinidade 45‰ do mesmo tempo. Após 1 e 2 h, a concentração do FC de *E. lucunter* a 25‰ foi inferior às de 35 e 45‰. Nos tempos de 3 e 6 h, os valores encontrados para os *E. lucunter* expostos a 25‰ foram menores do que os controles, e estes foram inferiores aos de 45‰ (Tabela 6B).

*Holothuria grisea* sob as duas condições experimentais manteve as concentrações de potássio constantes em seu FC. No caso da condição controle, houve um aumento na concentração de potássio entre o tempo inicial e a primeira hora, uma diminuição que promove o retorno à medida inicial entre os tempos 1 e 2 h, e a manutenção da mesma até o final do experimento. No

tempo de 1 h, a concentração controle do FC de *H. grisea* foi superior às experimentais. Nos tempos 2, 3 e 6 h as medidas para as holotúrias submetidas a 25‰ foram inferiores aos das demais salinidades (Tabela 6C).

A ANOVA de uma via apontou as diferenças entre as espécies nos diferentes tempos e salinidades. No tempo zero, em 25‰ (Fig 9A) *A. lixula* apresentou um FC mais concentrado em potássio do que o de *E. lucunter*. Este, em 35‰ (Fig 9B), apresentou valor superior de concentração do íon em questão do que *H. grisea*. Após 1 h, em 25‰, foi obtido um valor de menor concentração para *A. lixula* do que para as demais espécies; na condição controle a medida de potássio para *A. lixula* foi inferior à de *H. grisea*, mas o oposto ocorreu sob 45‰ (Fig 9C). Após 2 h de exposição às salinidades de 25 e 35‰, *A. lixula* apresentou concentrações inferiores às de *E. lucunter* e *H. grisea*. Após 3 h em 35‰ o FC de *A. lixula* foi menos concentrado do que o de *H. grisea* com relação ao íon potássio. Sob a mesma condição de salinidade, mas no tempo final, *A. lixula* apresentou medida de potássio inferior à de *E. lucunter*, e este inferior à de *H. grisea*.



**Tabela 6.** Medidas de concentração de potássio (mM) do fluido celômico de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B) e *H. grisea* (C). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as salinidades e letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre os tempos para cada espécie.

A

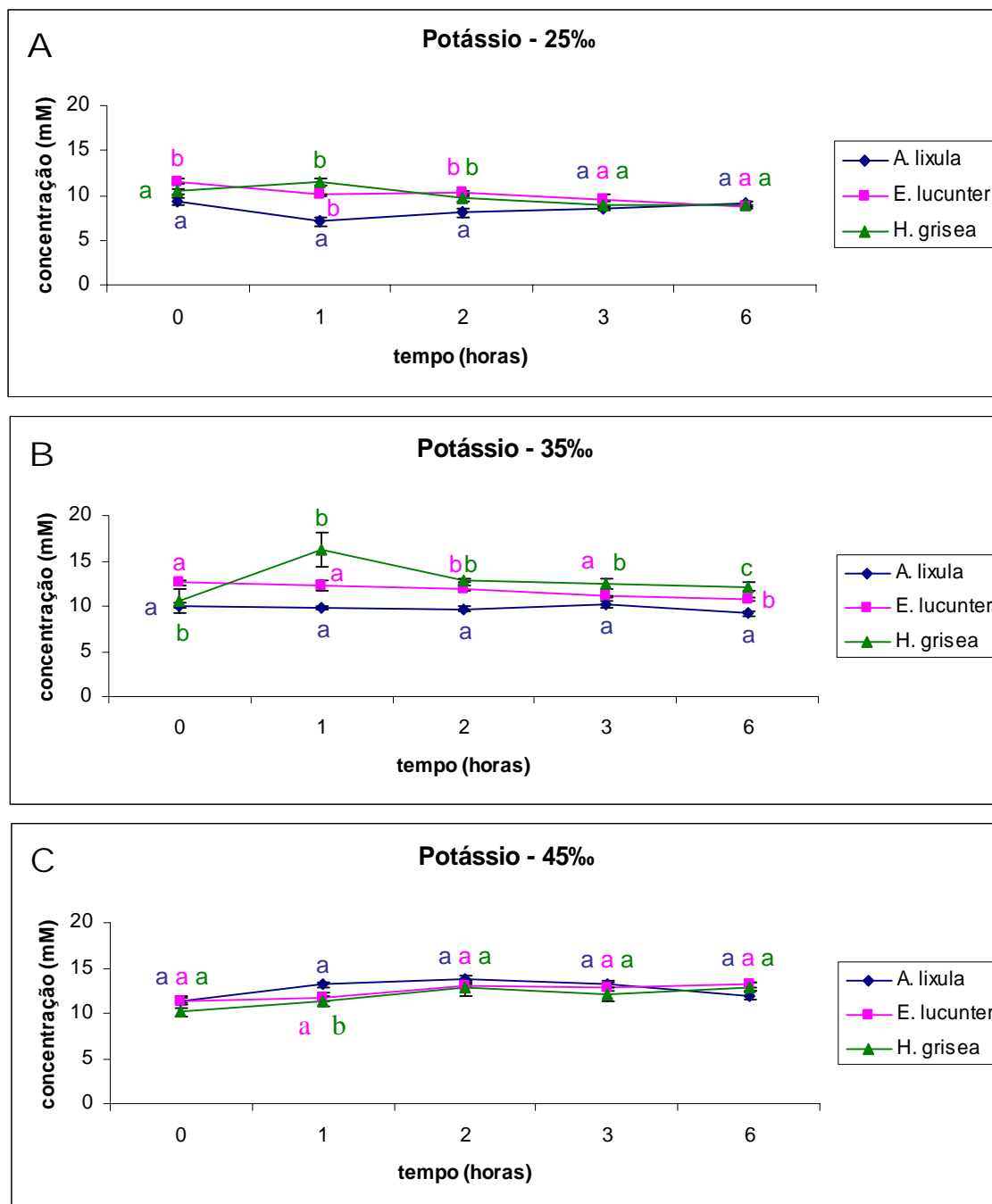
Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	9,3 ± 0,37 <sup>1a</sup>	7 ± 0,58 <sup>1b</sup>	8 ± 0,52 <sup>1a</sup>	8,6 ± 0,2 <sup>1a</sup>	9 ± 0,2 <sup>1a</sup>
35‰	10 ± 0,26 <sup>1a</sup>	10 ± 0,22 <sup>2a</sup>	9,7 ± 0,2 <sup>2a</sup>	10 ± 0,38 <sup>2a</sup>	9 ± 0,25 <sup>1a</sup>
45‰	11 ± 0,3 <sup>2a</sup>	13 ± 0,3 <sup>3b</sup>	13,7 ± 0,4 <sup>3b</sup>	13 ± 0,4 <sup>3b</sup>	12 ± 0,4 <sup>2ab</sup>

B

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	12 ± 0,31 <sup>12a</sup>	10 ± 0,15 <sup>1ab</sup>	10 ± 0,37 <sup>1a</sup>	9,5 ± 0,55 <sup>1ab</sup>	8,6 ± 0,15 <sup>1b</sup>
35‰	12,6 ± 0,28 <sup>1a</sup>	12 ± 0,52 <sup>2a</sup>	12 ± 0,3 <sup>2a</sup>	11 ± 0,13 <sup>2b</sup>	10,7 ± 0,18 <sup>2b</sup>
45‰	11 ± 0,45 <sup>2a</sup>	11,7 ± 0,48 <sup>2a</sup>	13 ± 0,2 <sup>2ab</sup>	13 ± 0,44 <sup>3ab</sup>	13 ± 0,27 <sup>3b</sup>

C

Tempos	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h
25‰	10 ± 0,32 <sup>1a</sup>	11,5 ± 0,42 <sup>2a</sup>	9,7 ± 0,38 <sup>1a</sup>	8,9 ± 0,36 <sup>1a</sup>	9 ± 0,26 <sup>1a</sup>
35‰	10 ± 1,3 <sup>1a</sup>	16 ± 1,9 <sup>1b</sup>	12,7 ± 0,18 <sup>2a</sup>	12,5 ± 0,6 <sup>2a</sup>	12 ± 0,4 <sup>2a</sup>
45‰	10 ± 0,48 <sup>1a</sup>	11 ± 0,5 <sup>2a</sup>	12,75 ± 0,8 <sup>2a</sup>	12 ± 0,72 <sup>2a</sup>	13 ± 0,5 <sup>2a</sup>



**Figura 9.** Concentração de potássio do fluido celômico (FC) nas três espécies estudadas. Linhas azuis: *Arbacia lixula*; linhas rosas: *Echinometra lucunter*; linhas verdes: *Holothuria grisea*, nas salinidades 25‰ (A), 35‰ (B) e 45‰ (C). Letras diferentes indicam diferenças entre as espécies em cada tempo, pelo resultado da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey; cada letra é da mesma cor da linha da espécie à qual se refere.

## DISCUSSÃO

Assim como a maioria dos invertebrados marinhos, os equinodermos são genericamente considerados animais osmoconformadores. Entretanto, ocorrem diferenças entre as espécies, quanto à maneira de reagir a uma mudança ambiental de salinidade. E além disso, a maneira como estes animais lidam com os diferentes íons não é sempre igual, e varia também, de acordo com o tipo de desafio apresentado, redução ou aumento de salinidade. Diante de redução da salinidade da água do mar (25‰) *Echinometra lucunter* e *Holothuria grisea* mantiveram mais estável a concentração osmótica do seu fluido celômico do que *Arbacia lixula* ao longo do tempo; o íon cloreto não foi mantido estável por nenhuma das três espécies. *A. lixula* e *H. grisea* mantiveram estáveis suas concentrações de magnésio e potássio. Por outro lado, diante de elevação da salinidade da água do mar (45‰), *E. lucunter* foi a espécie que manteve mais estáveis (i.e, próximos dos controles em 35‰) seus valores de osmolalidade, cloreto, sódio e magnésio, apresentando, em geral, valores inferiores aos das outras espécies no tempo final.

Segundo dados compilados até o final da década de 80, os equinóides aparentemente apresentam maior habilidade de sustentar gradientes de concentração iônica e osmótica entre os meios interno e externo quando comparados aos demais equinodermos (DIEHL, 1986). As estrelas do mar *Patiriella regularis* e *P. mortenseni*, diante de desafios hiposmóticos, não apresentaram capacidade de manter gradientes osmóticos (BARKER & RUSSELL, 2008). *Lytechinus variegatus* é capaz de sustentar gradientes para o íon sódio, potássio e para a osmolalidade entre seu meio interno e a água circundante (DIEHL, 1986; VIDOLIN et al., 2007). Contudo, os dados apresentados aqui não corroboraram esta conclusão. *Holothuria grisea*, em água do mar diluída a 25‰, apresentou maior habilidade para manter gradientes de concentração osmótica entre o FC e a água circundante do que *A. lixula*. Além disso, o holoturóide se mostrou mais capaz de manter estáveis suas concentrações iônicas do que as duas espécies de ouriços. Diferente de *Echinometra lucunter*, *H. grisea* conseguiu manter seu FC com concentrações estáveis de magnésio e potássio, sem oscilações nas concentrações destes

íons ao longo do experimento, que refletiu a duração de um ciclo de marés. Em condição hiperosmótica (45‰) *H. grisea* manteve sua concentração de sódio mais estável do que a de *A. lixula*, e regulou sua concentração de potássio, sem oscilações ao longo do curso temporal. *A. lixula*, após apresentar tais oscilações, demonstrou capacidade de regular a concentração do íon em questão. Assim, tem-se aqui um holoturóide com maior habilidade para manter gradientes de concentração osmótica e iônica do que os equinóides a ele comparados. Isto pode ocorrer devido à possível capacidade de *H. grisea* de reduzir a permeabilidade da parede do corpo a água e osmólitos diante de situações estressantes, tais como exposição ao ar ou mudanças de salinidade, como observado em campo (VIDOLIN *et al.*, 2002).

Notou-se que a manutenção de concentrações osmótica e iônica ocorreu com maior frequência e com maior eficiência diante do desafio hiposmótico (25‰) do que frente ao hiperosmótico (45‰). Isso pode explicar o fato de os equinodermos serem mais prejudicados pelo aumento do que pela redução de salinidade (DIEHL, 1986; VIDOLIN, 2003; SANTOS-GOUVEA & FREIRE, 2007). Contudo, em experimento *in vivo* *Holothuria grisea* demonstrou lidar melhor com aumento do que com diminuição de salinidade (CASTELLANO, SANTOS & FREIRE, dados não publicados).

Em relação ao tratamento diferencial dos equinodermas aos diferentes íons, observou-se que não foram mantidas as concentrações de cloreto para nenhuma das espécies ao longo do tempo experimental, o que vem a corroborar dados da literatura (STICKLE & DIEHL, 1987; VIDOLIN *et al.*, 2007). O mesmo padrão conformador para todas as espécies ocorreu para o sódio, o que retrata a variabilidade dentro do filo Echinodermata, visto que já foram reportados casos de animais com FC hiperiônico para o sódio em relação ao meio externo, como por exemplo para *Lytechinus variegatus* (LANGE, 1964; VIDOLIN *et al.*, 2007). No caso do magnésio, foram sustentados gradientes de concentração pelas três espécies diante do desafio hiposalino, o oposto do que já foi reportado na literatura para equinodermos (STICKLE & DIEHL, 1987; VIDOLIN *et al.*, 2007). A divergência entre os resultados alcançados para *A. lixula* neste trabalho e no de VIDOLIN *et al.*, 2007 provavelmente se deve à diferença no protocolo experimental. A sustentação de gradientes de concentração de potássio foram notados para *A. lixula* e *H. grisea* submetidos

a águas hipo (25‰) e hipersalinas (45‰), como já encontrado na literatura para vários equinodermos (STICKLE & DENOUX, 1976; DIEHL, 1986; VIDOLIN *et al.*, 2007).

O tamanho do animal certamente tem um papel sobre os fluxos difusivos. Indivíduos menores têm maior relação entre a área de superfície total e seu volume, enquanto indivíduos maiores têm menor relação superfície/volume (VIDOLIN *et al.*, 2007). Espécies maiores de ouriços-do-mar resistem por mais tempo a baixas salinidades (VIDOLIN *et al.*, 2007; STICKLE & DENOUX, 1976; DIEHL, 1986). Por exemplo, *Arbacia lixula* apresenta menor capacidade de manutenção de gradientes do que *L. variegatus*, provavelmente devido à maior permeabilidade aparente da parede do corpo de *A. lixula* do que de *L. variegatus*, já que a primeira espécie apresenta tamanho menor (STICKLE & DENOUX, 1976; DIEHL, 1986; ROLLER & STICKLE, 1993; VIDOLIN *et al.*, 2007). A influência entre a relação superfície/volume e a habilidade para sustentar gradientes de concentração parece se fazer valer na presente análise também, já que as concentrações internas de *A. lixula*, em geral, se equilibram mais rapidamente com as externas do que as de *E. lucunter*, que é uma espécie maior, apresentando menor relação superfície/volume. Isto ocorre com as concentrações de osmolalidade e sódio, diante da condição hiposalina, e com as de osmolalidade, cloreto, sódio e magnésio, sob a condição de hipersalinidade. Entretanto, *A. lixula* foi capaz de manter gradientes de concentração de magnésio e potássio; e *E. lucunter* não apresentou a mesma habilidade para manter estáveis as concentrações destes íons em água hiposalina (25‰), por exemplo. Assim, pensa-se que a diferença interespecífica da habilidade em questão se deve em parte à diferença da relação superfície/volume das espécies. Porém, além disso, parece haver também diferenças interespecíficas de permeabilidade de epitélios de interface aos diferentes íons.

A capacidade de manter gradientes para alguns íons se dá principalmente com equinóides em águas costeiras ou superficiais, onde ocorrem flutuações periódicas de salinidade, em especial na região entremarés (VIDOLIN *et al.*, 2007). Então o comportamento aparentemente regulador de *E. lucunter* e *H. grisea* para alguns íons poderia se dever a uma adaptação fisiológica ao habitat destas espécies, já que as mesmas ficam sujeitas às

variações de salinidade do ambiente de entremarés quando expostos durante a maré baixa. Entretanto, *A. lixula*, que habita o sublitoral, manteve mais estáveis as concentrações de magnésio sob água hiposalina (25‰) e potássio sob ambas as condições experimentais (25 e 45‰) do que *E. lucunter*, que ocupa a região entremarés. Além disso, *L. variegatus* - que também habita o sublitoral, mas que ocorre naturalmente em áreas por vezes sujeitas a diluição, tais como estuários - é hiperosmótico em relação à água do mar e hiperconformador diante de diluições na água que os cerca (ERNEST & BLAKE, 1981; ROLLER & STICKLE, 1993; VIDOLIN *et al.*, 2007). Então, as diferenças apresentadas pelas espécies para a manutenção das concentrações dos diferentes íons, podem ocorrer devido a diferenças interespecíficas de permeabilidade dos epitélios de interface aos diferentes íons. Enfim, equinodermos podem ser considerados osmoconformadores de uma maneira geral, mas deve-se considerar também a existência de diferenças neste padrão entre as espécies (STICKLE & AHOKAS, 1974; STICKLE & DENOUX, 1976; ROLLER & STICKLE, 1985; VIDOLIN *et al.*, 2002; VIDOLIN *et al.*, 2007).

As informações geradas por este trabalho contribuem para o conhecimento da fisiologia dos equinodermas, pois não foram, até o momento, encontrados na literatura, dados que retratem o acompanhamento dos cursos temporais de gradientes de concentração nestes animais, submetidos a desafio salino. Por fim, conclui-se que foi possível analisar o curso temporal do equilíbrio entre as concentrações internas e externas após alteração de salinidade externa. Sobre estes aspectos puderam também ser avaliadas diferenças interespecíficas entre *Echinometra lucunter*, *Arbacia lixula*, e *Holothuria grisea*. Para verificar se as diferenças entre os ouriços avaliados se deve à diferença entre seus tamanhos, será realizado o mesmo experimento com outras espécies de tamanhos compatíveis aos de *A. lixula* (como *Paracentrotus gaimardi*) e *E. lucunter* (como *Lytechinus variegatus*).

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados a partir da comparação dos cursos temporais do gradiente osmótico e dos gradientes iônicos de *Arbacia lixula*, *Echinometra lucunter* e *Holothuria grisea*, foram detectadas diferenças inter-específicas nos cursos temporais de equilíbrio entre as concentrações internas (fluido celômico perivisceral) e externas (água do mar), diante de mudança de salinidade do meio. Este resultado vem reforçar a verificação de que os equinodermos apresentam padrões diversificados de manutenção de concentrações dos diferentes íons. Isto provavelmente se deve a diferenças interespecíficas na permeabilidade dos tecidos de interface entre o fluido celômico e a água do mar aos diferentes íons. Além disso, foram encontradas diferenças entre as respostas dos animais a gradientes hipo e hiperosmóticos equivalentes. A hipótese central, de que espécies de equinodermos que habitam ambientes instáveis como a região de entremarés (*E. lucunter* e *H. grisea*) possuam maior capacidade de minimizar e/ou retardar os fluxos difusivos diante de variação de salinidade externa, quando comparados a espécies de sublitoral (*A. lixula*), foi refutada. Assim, não se pode considerar que todos os equinodermos sejam igualmente osmoconformadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKER, M. F., RUSSELL, M. P., 2008. The distribution and behaviour of *Patiriella mortenseni* and *P. regularis* in the extreme hyposaline conditions of the southern New Zealand Fiords. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **355**, 76- 84;
- BENEDETTI-CECCHI, L., BULLERI, F., CINELLI, F., 1998. Density dependent foraging of sea urchins in shallow subtidal reefs on the west coast of Italy (western Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, **163**, 203- 211;
- BISHOP, C. D., LEE, K. J., WATTS, S. A., 1994. A comparison of osmolality and specific ion concentration in the fluid compartments of the regular sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea) in varying salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **108A**, 497- 502;
- BOOLOOTIAN, R. A. Physiology of Echinodermata. New York, London, Sydney: Interscience, 1966;
- BULLERI, F., BENEDETTI-CECCHI, L., CINELLI, F., 1999. Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **241**, 81- 95;
- CHELAZZI, G., SERRA, G., BUCCIARELLI, G., 1997. Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **212**, 1- 7;
- COTEUR, G., CORRIERE, N., DUBOIS, Ph., 2004. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). *Fish and Shellfish Immunology*, **16**, 51- 63;
- DIEHL, W. J., 1986. Osmoregulation in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **84A**, 199- 205;
- DONG, Y., DONG, S., MENG, X., 2008. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, **276**, 179- 186;
- ERNEST, R. G., BLAKE, N. J., 1981. Reproductive patterns within subpopulations of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **55**, 25- 37;
- FREIRE, C. A., AMADO, E. M., SOUZA, L. R., VEIGA, M. P. T., VITULE, J. R. S., SOUZA, M. M., PRODOCIMO, V., 2008. Muscle water control in



crustaceans and fishes as a function of habitat, osmorregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **149**, 435- 446;

- GONDIM, A. I., LACOUTH, P., ALONSO, C., MANSO, C. L. C., 2008. Echinodermata da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Biota Neotropica*, **8**, 151- 159;
- GOOGLE MAPAS. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&q=praia%20paci%C3%A7%C3%A3o%20de%20mapa&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wl>>. Acesso em 12 de maio de 2009;
- HENDLER, G., MILLER, J. E., PAWSON, D. L.; KIER, P. M. Sea stars, sea urchins, and allies. Echinoderms of Florida and the Caribbean. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1995;
- HOFFMANN, E. K.; DUNHAM, P. B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. In: KWANG, J. W. International Review of CYTOLOGY, V.161, P. 172 – 262, 1995;
- LANGE, R., 1964. The osmotic adjustment in the echinoderm *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **13**, 205 – 216;
- McPHERSON, B. F., 1969. Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bulletin of Marine Science*, **19 (1)**, 194- 213;
- RIBEIRO-COSTA, C. S., ROCHA, R. M. Invertebrados: manual de aulas práticas. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos, 2006;
- ROLLER, R. A., STICKLE, W. B., 1985. Effects of salinity on larval tolerance and early developmental rates of four species of echinoderms. *Canadian Journal of Zoology*, **63**, 1531- 1538;
- ROLLER, R. A., STICKLE, W. B., 1993. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Biology*, **116**, 583- 591;
- RUPPERT, E. E., FOX, R.S., BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados – Uma Abordagem Funcional-evolutiva. 7ª Ed. São Paulo: Roca, 2005;
- SÁNCHEZ-JÉREZ, P., CESAR, A., CORTEZ, F. S., PEREIRA, C. D. S., SILVA, S. L. R., 2001. Distribución espacial de las poblaciones de erizos más abundantes de la costa sudeste del litoral de São Paulo (Brasil). *Ciencia Marina*, **27 (1)**, 139- 153;

- SANTOS-GOUVEA, I. A., FREIRE, C. A., 2007. Effects of hypo- and hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. *Zoological Studies*, **46** (2), 203-215;
- SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal – adaptação e meio ambiente. 5ª ed. São Paulo: Santos, 2002;
- STICKLE, W. B., AHOKAS, R., 1974. The effects of tidal fluctuation of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **47A**, 469- 476;
- STICKLE, W. B., DENOUX, G. J., 1976. Effects of *in situ* tidal salinity fluctuations on osmotic and ionic composition of body fluid in Southeastern Alaska Rocky intertidal fauna. *Marine Biology*, **37**, 125-135;
- STICKLE, W. B., DIEHL, W. J., 1987. Effects of salinity on echinoderms. In M Jangoux, JM Lawrence, eds. Echinoderm studies II. Rotterdam: AA Balkema, pp. 235- 285;
- SUGUIMOTO, C., 2005. Instituto de pesquisa em aquicultura e aquariologia. Disponível em <[http://www.ipaq.org.br/modules.php?name=Aquarioes&op=mostrar\\_especie&id=421&nome\\_map=t,s,c,b,>](http://www.ipaq.org.br/modules.php?name=Aquarioes&op=mostrar_especie&id=421&nome_map=t,s,c,b,>). Acesso em 5 de novembro de 2008;
- TALBOT, T. D., LAWRENCE, J. M., 2002. The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filograneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **275**, 1- 14;
- VIDOLIN, D. **Composição do fluido celômico do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* L. 1758 (Echinodermata: Echinoidea) diante de variações de salinidade, comparando uma população de zona entremarés com uma população de sublitoral.** 40 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003;
- VIDOLIN, D., SANTOS-GOUVEA, I. A., FREIRE, C. A., 2002. Osmotic stability of the coelomic fluids of a sea-cucumber (*Holothuria grisea*) and a starfish (*Asterina stellifera*) (Echinodermata) exposed to the air during low tide: a field study. *Acta Biologica Paranaense*, **31** (1, 2, 3, 4), 113-121;
- VIDOLIN, D., SANTOS-GOUVEA, I. A., FREIRE, C. A., 2007. Differences in ion regulation in the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Marine Biological Association of the UK*, **87**, 769- 775;



