

MARCOS PAULO TRINDADE DA VEIGA

**Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas* e
*Stramonita brasiliensis***

Curitiba

2013

MARCOS PAULO TRINDADE DA VEIGA

**Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas*
e *Stramonita brasiliensis***

Tese de doutorado 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 grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia.

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

Curitiba

2013

Veiga, Marcos Paulo Trindade da

Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas* e *Stramonita brasiliensis* / Marcos Paulo Trindade da Veiga – Curitiba, 2013

178 folhas (8 coloridas)

Orientadora: Carolina Arruda de Oliveira Freire

Tese (Doutorado Ciências Biológicas - Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

1. Fisiologia; 2. Osmorregulação; 3. Salinidade; 4. Temperatura; 5. pH; 6. Predador

Termo de Aprovação



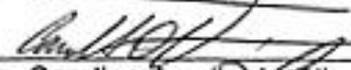
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Zoologia

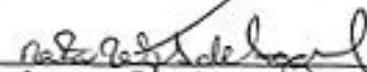
**TERMO DE APROVAÇÃO**

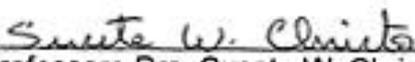
MARCOS PAULO TRINDADE DA VEIGA

“Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas* e *Stramonita brasiliensis*”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas - Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:


Professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire (Orientadora)


Professora Dra. Marta M. de Souza (FURG)
Membro Externo


Professora Dra. Susete W. Christo (UEPG)
Membro Externo


Professora Dra. Rosana Moreira da Rocha (UFPR)
Membro Interno


Professora Dra. Marisa F. Castilho (UFPR)
Membro Interno

Curitiba, 30 de Agosto de 2013

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia/UFPR
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Zoologia
Caixa Postal 19020 - CEP 81531-980 - Curitiba - Paraná
Telefone/FAX +55 (0**41) 3361-1641

Epígrafe

Seu trabalho irá tomar uma grande parte da sua vida e o único meio de ficar satisfeito é fazer o que você acredita ser um grande trabalho.

Steve Jobs

Agradecimentos

À Professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire que com muita paciência, determinação e dedicação nestes sete anos de convívio retirou-me dos primórdios do pensamento científico e me conduziu ao ponto em que estou hoje. Mesmo diante de todas as dificuldades, que sabemos não foram poucas. E que serve de exemplo de retidão e honestidade tanto na condução da pesquisa científica quanto na administração do bem público. Obrigado Carol!

À Capes pela bolsa sem a qual esta etapa da minha formação acadêmica não teria sido possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, pela oportunidade de realização do Mestrado e do Doutorado.

À Prof.^a. Dra. Marta Marques de Souza pelo empenho na correção da pré-tese, onde ficou claro o quanto se dedicou e se aplicou no intuito não só de apontar pontos falhos, mas principalmente de dar sugestões valiosas para a melhoria do trabalho. Além de colocar-se à disposição para sanar possíveis dúvidas.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Belz, que foi sincero ao apontar as inconsistências do trabalho na sua versão de pré-tese, o que fez com que o texto fosse aprimorado e direcionado mais adequadamente para a versão da defesa.

Ao Prof. Dr. Patrício Peralta Zamora, que disponibilizou o Fotômetro de Chama do Departamento de Química e sempre se mostrou muito solícito.

Às professoras Dra. Marta Marques de Souza, Dra. Susete Wambier Christo, Dra. Rosana Moreira da Rocha e Dra. Marisa Fernandes de Castilho pelas contribuições que contribuíram muito para a melhora deste trabalho.

À ex-secretária do Programa de PG em Zoologia Vera Maria Adélio, que muito me ajudou quando precisei.

Ao Sr. Nelson Silveira Jr. pela disponibilidade de seu material bibliográfico e por outras informações relevantes.

À minha mãe Nilza Francisca Trindade da Veiga, pelo amor incondicional. E ao meu pai Marcelo Augusto Renauld da Veiga que com certeza zela por mim lá de cima.

À minha irmã Patrícia, seu esposo Paulo e ao Ryan meu polaquinho querido. Meu irmão Rodrigo sua esposa Luciana e a Bruna a querida do TIUUUU!!! Sempre pacientes com minhas ausências.

Aos maiores amores da minha vida, meus filhos Felipe e Tatiana, pessoas maravilhosas pelas quais não consigo expressar a imensidão de meu sentimento. Obrigado por existirem!

À minha amada esposa Giovanna Carstens Castellano, que além de contribuir intelectualmente com meu trabalho, sempre me deu apoio e uma infinidade de conselhos e broncas, os quais só são dados para aqueles que são realmente importantes. Obrigado Nina! E ao seu pequeno Rodolfo, o monstrinho que sempre que pode me sarneia.

Aos amigos de laboratório: o casal Viviane e Jean que vi passar de alunos a professores; Enelise que foi de Fliper a professora e agora mamãe

(Parabéns!!!); Luciana que muitas vezes foi o para-raio no laboratório, mas sempre esteve disponível à todos; Denilton e Ivonete, que passaram de professores a colegas e amigos valiosos; aos amigos que passaram rapidamente pelo laboratório Hugo, Ligia, Renata e Clarice; Victor o estagiário intelectual; Silvia, Natascha, Anieli e Juliane, parceiras nas alegrias e nas limpezas (faxinas).

Aos amigos Rosa e Cravo (e prole) e o Véio Susla, presentes em minha vida desde a graduação, e pelo jeito por muito tempo ainda.

Aos meus amigos irmãos Luciano, Cleverson e Allan, mesmo que eventualmente estejam distantes nunca sairão de meu coração.

À todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a passagem desta fase tão importante da minha vida.

E a DEUS que permite que tudo aconteça da maneira que deve ser em um mundo onde teorias e leis em certos momentos nos fazem refletir sobre sua grandeza!

Dedicatória

Dedico esta obra aos meus filhos, aos meus pais
e a minha esposa. Obrigado pela confiança depositada.

SUMÁRIO

<i>Termo de Aprovação</i>	iii
<i>Epígrafe</i>	iv
<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Dedicatória</i>	viii
<i>Lista de Figuras</i>	xii
<i>Resumo Geral</i>	1
<i>General Abstract</i>	3
<i>Introdução Geral</i>	5
<i>Interesse Econômico</i>	5
<i>Predação</i>	6
<i>Comportamento</i>	6
<i>Fisiologia</i>	7
<i>Osmorregulação</i>	9
<i>Espécies</i>	12
<i>Referências</i>	16
<i>CAPÍTULO 1: Caracterização da capacidade osmorregulatória dos bivalves mais utilizados na malacocultura brasileira <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758) e <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) (<i>Bivalvia</i>, <i>Mollusca</i>)</i>	25
<i>Resumo</i>	25
<i>Abstract</i>	27
<i>Introdução</i>	29
<i>Materiais e Métodos</i>	34
<i>Dosagens de Osmolalidade e Íons</i>	37
<i>Teor hídrico</i>	37
<i>Experimentos "in vitro"</i>	38
<i>Análise estatística</i>	40
<i>Resultados</i>	41
<i>Osmolalidade</i>	41
EFEITO DA SALINIDADE	41
EFEITO DO pH	41
<i>Teor Hídrico</i>	43
Efeito da Salinidade.....	43
<i>Cloreto</i>	45
EFEITO DA SALINIDADE	45
EFEITO DO pH	45

Sódio	47
EFEITO DA SALINIDADE	47
EFEITO DO pH	48
Potássio	50
EFEITO DA SALINIDADE	50
EFEITO DO pH	51
Magnésio	53
EFEITO DA SALINIDADE	53
EFEITO DE pH	54
Regulação de volume	56
Varição entre pH inicial e final	60
Variação nos experimentos com <i>P. perna</i>	60
Variação nos experimentos com <i>C. gigas</i>	62
Comparação entre fluidos da cav. do manto e do aquário	64
Discussão	67
Experimentos <i>in vivo</i>	67
Salinidade	67
pH	71
Temperatura	73
Experimentos “ <i>in vitro</i> ”	75
Conclusões	76
Referências	78
Capítulo 2: Resistência, regulação osmo-iônica e manutenção de água tecidual de <i>Stramonita brasiliensis</i> (Mollusca: Gastropoda) diante de estresse salino hipo e hiper-osmótico	95
Resumo	95
Abstract	97
Introdução	98
Materiais e métodos A espécie estudada	102
.....	102
.....	102
Coleta e aclimatação	103
Concentração e diluição da água do mar	103
Teste de resistência	103
Experimentos “ <i>in vivo</i> ”	104
Dosagens	105
Teor hídrico (TH)	105

<i>Experimentos “in vitro”</i>	106
<i>Análise estatística</i>	107
<i>Resultados</i>	108
<i>Discussão</i>	113
<i>Conclusões</i>	118
<i>Referências</i>	119
<i>Capítulo 3. Avaliação de moluscos relacionados com cultivo em Sistema de Alteração de Fatores Abióticos (SAFA)</i>	128
<i>Resumo</i>	128
<i>Abstract</i>	130
<i>Introdução</i>	131
<i>Materiais e Métodos</i>	135
<i>Análise estatística</i>	138
<i>Resultados</i>	139
<i>Reações intermediárias</i>	144
<i>Discussão</i>	147
<i>Conclusões</i>	152
<i>Referências</i>	155
<i>Conclusões Gerais</i>	163

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estruturas utilizadas no cultivo de bivalves, (A) telas tubulares de tecido para criação de mexilhões, chamadas cordas; (B) estruturas teladas para criação de ostras, chamadas de lanternas..... 14
- Figura 1.1.** Exemplos das espécies *P. perna* (A) e *C. gigas* (B), indivíduos com aproximadamente 13 centímetros. 31
- Figura 1.2.** Fluxograma resumido dos experimentos realizados com *P. perna* e *C. gigas*. Os valores de salinidade e pH apresentados na temperatura de 10°C foram repetidos em 20 e 30°C. O pH foi aferido no início e no final dos procedimentos em todos os aquários. Os espécimes avaliados foram expostos individualmente. Foi retirada aleatória e independentemente uma amostra da água do aquário e da cavidade do manto por condição experimental para determinação das concentrações osmóticas e iônicas (sódio, cloreto, potássio e magnésio). De cada animal avaliado foi retirada uma amostra de tecido para determinação do teor hídrico e uma de hemolinfa para dosagens da osmolalidade e iônicas. Os procedimentos apresentados na temperatura de 20°C, salinidade 35 e pH 8 foram repetidos em todas as condições experimentais. 36
- Figura 1.3.** Osmolalidade da hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas..... 42
- Figura 1.4.** Teor hídrico das gônadas de *P. perna* nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C) e do músculo adutor em *C. gigas* nas temperaturas de

10°C (D), 20°C (E) e 30°C (F) barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades, $P < 0,05$ 44

Figura 1.5. Concentração do íon cloreto na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os 3 pHs na mesma salinidade, $P < 0,05$ 46

Figura 1.6. Concentração do íon sódio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade, $P < 0,05$ 49

Figura 1.7. Concentração do íon potássio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade, $P < 0,05$ 52

Figura 1.8. Concentração do íon magnésio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade, $P < 0,05$ 55

Figura 1.9. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos teciduais de *P. perna* expostos “in vitro” (n=6) aos tratamentos controle (979 mOsm), hiperosmótico (+30%) e hiposmótico (-30%). Tecido do músculo adutor (A) e tecido do manto (B). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. ... 57

Figura 1.10. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos teciduais de *C. gigas* expostos “in vitro” (n=6) aos tratamentos controle (979 mOsm), hiperosmótico (+30%) e hiposmótico (-30%). Tecido do músculo adutor (A) e tecido do manto (B). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. ... 58

Figura 1.11. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos do manto de *P. perna* (A) e de *C. gigas* (B) expostos “in vitro” (n=6) aos tratamento

controle (979 mOsm), hiperosmótico (+50%) e hiposmótico (-50%). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas..... 59

Figura 1.12. Valor do pH na água dos aquários após os experimentos para a espécie *P. perna*, nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C); losango indica o pH 6,5, quadrado o pH 8 e triângulo o pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade. Linhas cinza indicam os valores medidos no início dos experimentos, $P < 0,05$ 61

Figura 1.13. Valor do pH na água dos aquários após os experimentos para a espécie *C. gigas*, nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C); losango indica o pH 6,5, quadrado o pH 8 e triângulo o pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade. Linhas cinza indicam os valores medidos no início dos experimentos, $P < 0,05$ 63

Figura 2.1. Exemplares de *S. brasiliensis* com o opérculo aberto (A) e com o opérculo fechado (B). Tamanho aproximado 5 centímetros..... 102

Figura 2.2. Dendograma de similaridade de Bray Curtis baseado na porcentagem de indivíduos de *S. brasiliensis* abertos nas salinidades (0, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45, 55) e tempos (1 a 6h) amostrais do experimento de resistência. 109

Figura 2.3. Concentrações osmótica (a), e de íons sódio (c), cloreto (d), potássio (e) e magnésio (f) da hemolifa de *S. brasiliensis* submetida aos desafios hipo (água doce) e hiperosmótico (salinidade 45), e à salinidade controle (35) por 3h. Determinação do teor hídrico tecidual (b) do músculo do pé da mesma espécie exposta à mesma condição. Letras diferentes representam diferenças entre as resposta de *S. brasiliensis* às diferentes salinidades. 110

Figura 2.4. Curso temporal da variação de hidratação tecidual (pé muscular) ($n=15$) de *S. brasiliensis* exposto a choque osmótico de, respectivamente, 50% de redução (linhas salpicadas) e aumento (linhas pontilhadas) com relação à salina isosmótica. A linha contínua corresponde aos fragmentos teciduais expostos à salina isosmótica (controle). A linha contínua espessa representa os

tempos em que houve diferença entre as condições experimentais (hipo e hiperosmótica) e o controle. Letras diferentes representam diferenças ao longo do tempo, dentro de uma mesma condição (hipo ou hiperosmótica). 111

Figura 2.5. Curso temporal do experimento de resistência, indicando a porcentagem de gastrópodos com o opérculo aberto. Asteriscos indicam os tempos na salinidade 0 onde houve morte de indivíduos. Barras no eixo X indicam quebra de tempo. 112

Figura 3.1. Esquema de funcionamento do sistema fechado (A) e sistema aberto (B). Setas vermelhas indicam o sentido de circulação da água impulsionada pela bomba submersa. Reservatório Estoque RE; Reservatório Teste RT; Reservatório de Descarte RD. 136

Figura 3.2. Curso temporal das alterações de salinidade observadas no reservatório teste, em sistema aberto (com reposição constante). 140

Figura 3.3. Curso temporal representando individualmente (n=6) o momento de fechamento das valvas dos bivalves diante das alterações de salinidade. Marcadores sem preenchimento indicam redução de salinidade; marcadores preenchidos indicam aumento de salinidade. Asterisco indica condição em que as respostas das espécies foram estatisticamente diferentes. Elipses azuis destacam os grupamentos de *P. perna*; elipses vermelhas destacam os grupamentos de *C. gigas*. 141

Figura 3.4. Curso temporal da variação de salinidade com alteração manual do conteúdo no reservatório teste a partir de 50 min. Traço seccionado cinza indica o momento que iniciou a troca manual da solução. Sistema fechado de circulação (A); Sistema aberto de circulação (B). 143

Resumo Geral

Os moluscos apresentam importante papel ecológico e econômico. A maior parte da produção nacional é dos bivalves *Perna perna* e *Crassostrea gigas*. Os quais estão sujeitos à predação do gastrópodo *Stramonita brasiliensis*. Estes animais estão sujeitos a variações ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas comportamentais e fisiológicas dos moluscos diante de variações de fatores abióticos. No capítulo 1 foram caracterizadas as respostas fisiológicas de *P. perna* e *C. gigas* diante de combinações de salinidade (0, 35, 45 ups) temperatura (10, 20, 30 C) e pH (6,5, 8, 9). Após 6 horas de exposição, foi retirada a hemolinfa para dosagens osmo-iônicas, e tecidos para determinação do teor hídrico tecidual. Também se realizaram experimentos *in vitro* com fragmentos musculares para determinar a capacidade de regulação de hidratação tecidual. Os resultados mostraram que *C. gigas* pode se isolar melhor do ambiente na temperatura de 10°C e que *P. perna* tolera maior variação de salinidade, especialmente salinidade 45 ups. No capítulo 2 foram avaliadas as respostas de *S. brasiliensis* frente a variação de salinidade em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os resultados mostraram que o caramujo é extremamente resistente a variações de salinidade, principalmente em condições hiperosmóticas. No capítulo 3 foi utilizado um sistema que expôs os animais a mudanças graduais de salinidade, o qual permitiu a observação das respostas comportamentais. Os resultados dos bivalves mostraram que *P. perna* permanece com as valvas abertas em salinidades maiores do que *C. gigas*, de acordo com os resultados do capítulo 1. Para o gastrópodo *S. brasiliensis* constatou-se uma ampla tolerância a condições experimentais,

resultados compatíveis com o capítulo 2. Baseado nos três capítulos pode-se concluir que o mexilhão *P. perna* permanece com as valvas abertas e permite a maior variação da concentração de seus fluidos por apresentar uma melhor capacidade de manutenção do teor de hidratação de seus tecidos, indicando maior plasticidade fisiológica do que *C. gigas* nas condições testadas. Por sua vez a ostra *C. gigas* isola-se melhor do ambiente, principalmente na temperatura de 10°C, o que condiz com sua área de distribuição natural. *S. brasiliensis* apresenta ampla tolerância a variação de salinidade e mostrou-se um excelente modelo para estudos fisiológicos de osmorregulação de gastrópodes de região entre-marés.

General Abstract

The mollusks have important ecological and economic role. The majority of domestic production is the bivalves *Perna perna* and *Crassostrea gigas*, which are subject to predation of the gastropod *Stramonita brasiliensis*. These animals are subject to environmental variations. The aim of this study was to evaluate the behavioral and physiological responses of the mollusks face of changes in abiotic factors. In chapter 1 we characterized the physiological responses of *P. perna* and *C. gigas* on salinity (0, 35, 45 ups), temperature (10, 20, 30 C), and pH (6.5, 8, 9) combinations. After 6 hours of exposure, hemolymph was withdrawn for osmo-ionic determination, and tissues to determine the tissue water content. We also performed *in vitro* experiments with muscle fragments, to determine the ability of regulating tissue hydration. The results showed that *C. gigas* can better isolate the environment temperature of 10 ° C and *P. perna* tolerate greater variation in salinity, especially salinity 45 ups. In chapter 2 we evaluated the responses of *S. brasiliensis* against salinity fluctuations in experiments *in vivo* and *in vitro*. The results showed that the snail is extremely resistant to salinity variations, especially in hyperosmotic conditions. In chapter 3 we used a system in that animals were exposed to gradual changes in salinity, which allowed the observation of behavioral responses. The results showed that the bivalves *P. perna* valves remains open in higher salinities than *C. gigas*, according to the results of chapter 1. For the gastropod *S. brasiliensis*, was found a wide tolerance to experimental conditions, results consistent with chapter 2. Based on the three chapters, can be concluded that the mussel *P. perna* remains with the valves open and allows

greater variation in the concentration of its fluids. It occurs probably because of the ability to maintain the tissues hydration, indicating a greater physiological plasticity than *C. gigas* under the conditions tested. The oyster *C. gigas* insulates better from the environment, especially in the temperature of 10 ° C, which is consistent with their natural range distribution. *S. brasiliensis* show wide tolerance face to salinity variations and displayed to be an excellent model for physiological studies of osmoregulation of gastropods of intertidal zone.

Introdução Geral

Interesse Econômico

A demanda mundial por alimentos tem crescido gradativamente, e o papel da aquicultura vem se destacando com o aumento de sua produção que atualmente fornece cerca de 50% do total de alimentos de origem aquática (FAO, 2011; Shumway, 2011). O crescimento da importância da aquicultura ocorre em função da queda na produção extrativista de organismos aquáticos e no aprimoramento tecnológico e na ampliação das áreas de cultivo (Gosling, 2003; Sofia, 2012). Os moluscos são o segundo maior grupo de animais cultivados mundialmente e representam parte significativa no fornecimento de proteína animal para a população humana. Dentre os moluscos, os bivalves apresentam a maior produção (Borghetti *et al.*, 2003; Sofia, 2012). No Brasil a aquicultura segue a tendência mundial de aumento produção, tendo os moluscos bivalves como principais culturas (Boscardin, 2008). Os bivalves são moluscos geralmente sésseis e filtradores, tem os seus tecidos moles (manto, vísceras e brânquias) protegidos por duas conchas ou valvas articuladas, unidas por um ligamento elástico e mantidas fechadas por ação muscular. As conchas protegem os animais e podem retardar os efeitos de alterações ambientais além de dificultar e até mesmo impedir a ação de predadores (Gosling, 2003; Brusca & Brusca, 2007).

Predação

As duas conchas são características conspícuas e específicas dos bivalves, que podem isolá-los de perturbações externas. Entretanto apesar da proteção fornecida por estas estruturas, alguns predadores têm a capacidade de abri-las, perfurá-las e até engolir os bivalves inteiros (Loh & Todd, 2011; Belz *et al.*, 2012; Chiba & Sato, 2013). A predação de bivalves por gastrópodos do gênero *Stramonita* está diretamente relacionada com o tamanho dos animais, tanto da presa, quanto do predador (Brown & Richardson, 1988). A ostra *Pinctada imbricata* tem grande interesse comercial, por ser uma das espécies de bivalves perlíferos. Porém, mesmo que estes animais sejam cultivados em estruturas fechadas, sofrem a ação de gastrópodes predadores da espécie *Linatella caudata* que ainda na fase larval podem chegar às gaiolas onde encontram-se os bivalves (Malavé *et al.*, 2012). De modo similar, a ostra perlífera *P. furcata* sofre predação das espécies de caramujo *Cymatium cingulatum* e *Murex virgineus* (Chellan *et al.*, 1983). Embora atualmente tais animais estejam relacionados aos cultivos, não pode ser perdida a noção de que anteriormente predadores e presas ocupavam ambientes naturais. Logo, a sobrevivência de gastrópodos e bivalves estava diretamente relacionada às respostas adaptativas a estresses ambientais (Futuyama, 1998; Glor, 2010).

Comportamento

Alterações comportamentais são algumas das primeiras respostas dos animais a agentes estressores como: predadores e variações do meio (Schreck *et al.*, 1997, Anestis *et al.*, 2007). Em gastrópodos e bivalves a presença de

conchas únicas ou duplas permite uma resposta diferenciada a alterações ambientais. Suas conchas podem isolá-los temporariamente do ambiente externo (McAlister & Fisher, 1968). Muitas vezes respostas comportamentais são suficientes para evitar danos causados por estresses ambientais, fazendo com que os animais economizem a energia que seria gasta na ativação de respostas fisiológicas mais elaboradas (Feder & Hofmann, 1999). Como ocorre com o bivalve *Mytilus galloprovincialis* que altera o padrão de movimentação das conchas diante de variações da temperatura da água (Anestis *et al.*, 2007). Os gastrópodes *Siphonaria pectinata* expostos a variações osmóticas do meio contraem-se e aderem fortemente ao substrato o que reduz a área de contato com a água e minimiza a diluição de sua hemolinfa (McAlister & Fisher, 1968). Os caramujos *Nerita scabricosta* para se proteger de predadores reúnem-se em locais pouco acessíveis no costão rochoso, o que dificulta a ação de predadores (Garrity & Levings, 1981). Diante de alterações no meio, o comportamento dos animais é um importante indicativo a ser considerado, e, se for adequadamente avaliado pode fornecer informações relevantes da condição geral do organismo perante uma circunstância potencialmente prejudicial.

Fisiologia

Quando mudanças comportamentais não são suficientes para responder a estresses ambientais, os organismos podem recorrer a respostas fisiológicas para sua condição interna se ajustar a uma conformação mais adequada em face às exigências temporárias do meio. Porém normalmente os organismos apresentam respostas fisiológicas relacionadas com as características do meio

onde vivem (Schmidt-Nielsen, 2002; Willmer *et al.*, 2005). Em ambientes com concentração osmótica estável como os oceanos, é possível que os organismos apresentem padrões osmorregulatórios vinculados a esta estabilidade na concentração do meio. A maioria dos invertebrados marinhos apresenta uma condição isosmótica (~1050 mOsm/kg H₂O) em relação à água do mar, isto é, a concentração osmótica total dos componentes de seus fluidos internos equivale à concentração osmótica de solutos da água circundante. Esta condição é possível porque as águas dos oceanos mantêm a concentração osmótica estável, encontrada normalmente em torno de 35‰. (~3,5% de sal). Os principais constituintes do fluido extracelular são sódio e cloreto, além de valores consideráveis de magnésio, sulfato e cálcio (Prosser, 1973; Schmidt-Nielsen, 2002; Whittamore, 2012). Embora marinhos, os ambientes costeiros estão sujeitos a oscilações de salinidade, que podem ser causadas por variações da pluviosidade ou das correntes marinhas diluídas (Silveira Jr. *et al.*, 2008; Resgalla Jr. 2011). À medida que animais isosmóticos com o meio marinho são expostos a um ambiente mais diluído, eles enfrentam dois problemas: primeiro, a água do meio externo tende a entrar passivamente em seu organismo, onde a concentração de solutos é superior; segundo, os solutos de seus fluidos tendem a sair, também em função deste gradiente de concentração (Péqueux, 1995; Schmidt-Nielsen, 2002; Freire *et al.*, 2008a,b). Os bivalves que ocupam ambientes costeiros contam com suas conchas, que os protegem, por certo tempo, das variações de salinidade em relação à água do mar “normal”. Contudo, se não possuíssem mecanismos fisiológicos que possibilitam a tolerância a estas alterações, a ocorrência destes animais em ambientes costeiros seria inviável (Pierce & Greenberg, 1973; Pierce, 1982;

Yaroslavtseva & Sergeeva, 2009). Em resposta à diminuição de salinidade, a ostra *Ostrea chilensis* isola sua prole no interior da câmara palial controlando por certo tempo as condições no interior da cavidade (Chaparro *et al.*, 2009). Para manter seus mecanismos fisiológicos operando de maneira adequada, mesmo em ambientes sujeitos a mudanças do meio, os animais devem manter a homeostasia de seus organismos.

Osmorregulação

O controle da osmorregulação é indispensável para a manutenção da homeostasia osmo-iônica dos organismos, que pode apresentar vários mecanismos, como regulação de volume celular possibilitado pela variação no fluxo iônico através da membrana celular e pela mobilização de osmólitos orgânicos (Pierce, 1982; Freire *et al.*, 1995; Deaton, 2008; Whittamore, 2012). A manutenção de níveis estáveis na concentração osmótica dos fluidos internos deve ser assegurada, e grandes oscilações nestes valores podem ser incompatíveis com a vida (Péqueux, 1995; Charmantier, 1998; Schmidt-Nielsen, 2002; Freire *et al.*, 2008a,b). Em ambientes aquáticos variáveis os animais podem ser expostos a oscilações nos valores de salinidade, temperatura, pH, etc. Mesmo frente a esse dinamismo ambiental estes organismos devem manter estáveis seus fluidos corpóreos (Robertson, 1960; Augusto *et al.*, 2007; Preston, 2008). Animais de água doce têm necessariamente seus fluidos mais concentrados que o meio, e a significativa diferença na pressão osmótica entre seu meio interno e a água externa gera enorme tendência de entrada de água e de saída de solutos de seu meio interno (Deaton, 1981; Medler *et al.*, 1999; Symanowski & Hildebrandt, 2010).

De modo oposto, peixes ósseos marinhos que são hiporreguladores osmônicos apresentam concentração osmótica de seus fluidos menor que a encontrada na água circundante tende a perder água para o meio e ganhar solutos (Willmer *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2008a; Whittamore, 2012).

A maioria dos invertebrados marinhos é osmoconformadora, isto é, mantêm as concentrações de seus fluidos corpóreos equivalentes às variações no meio. Estes animais conservam seus fluidos isosmóticos à água do mar, e não precisam gastar energia para manter suas concentrações diferentes do ambiente (Péqueux & Gilles, 1981; Deaton, 2008; Hill *et al.*, 2008). Isto não significa que estes animais apresentem as mesmas proporções dos solutos dissolvidos encontrada na água do mar. Pelo contrário, normalmente são encontradas diferenças entre as concentrações de íons, aminoácidos e outras partículas osmoticamente ativas entre os fluidos internos (hemolinfa, fluido celômico) e o ambiente circundante (Charmantier, 1998; Jordan & Deaton, 1999; Medler *et al.*, 1999). Os animais de água doce enfrentam problemas opostos. Todos são forçosamente osmorreguladores fortes ou fracos e não podem igualar seus fluidos com o ambiente. Alguns reguladores fracos como bivalves de água doce possuem concentrações de seus fluidos muito baixas, o que diminui o gasto energético para conservar seus gradientes osmóticos, e diminui a necessidade de tomada ativa de íons do ambiente com gasto de energia metabólica (Robertson, 1960; Jordan & Deaton, 1999; Schmidt-Nielsen, 2002).

Os bivalves marinhos e outros invertebrados tipicamente osmoconformadores, diante de mudanças na concentração osmótica/salina do meio podem ativar os mecanismos de Regulação Isosmótica Intracelular (RII),

que controla o volume e a concentração osmótica celular, através da mobilização de solutos orgânicos (amino ácidos) ou inorgânicos (íons), que são acompanhados pelo fluxo de água, buscando manter adequado o volume celular (Deaton *et al.*, 1985; McNamara *et al.*, 2004). Estudos com moluscos comprovam que estes animais utilizam aminoácidos para regular seu volume celular, caso dos bivalves *M. galloprovincialis* (De Vooy & Geenevasen, 2002) e *Macoma balthica* (Kube *et al.*, 2006). Os gastrópodes *Melampus bidentatus*, também se utilizam desta estratégia para manter suas células isosmóticas ao meio (Khan *et al.*, 1999). Alguns moluscos expostos a estresse hiperosmótico, isto é, a osmolalidade do meio maior do que a de seus fluidos internos podem degradar proteínas em aminoácidos (osmólitos orgânicos intracelulares), os quais são osmoticamente e provocam influxo de água e a estabilização de seu volume (Khan *et al.*, 1999; Deaton, 2001). O bivalve estuarino *Polymesoda expansa*, degrada proteínas e libera aminoácidos no meio intracelular quando exposto a choques hiperosmóticos, em maiores quantidades do que quando são expostos ao ar. Durante este período o bivalve permanece com as conchas fechadas, o que caracteriza uma dificuldade maior em enfrentar um meio hiperosmótico do que o ambiente aéreo. Quando expostos ao ar os animais liberam glutamina, um agente neutralizante da amônia (Hiong *et al.*, 2004). A exposição a ambientes anóxicos traz várias consequências, como o acúmulo de vários subprodutos metabólicos. Estes produtos podem ser utilizados quando o gastrópode *Patella caerulea* é exposto também á dessecação, pois eles participam de vias metabólicas que minimizam os efeitos de ambientes desidratantes (Santini *et al.*, 2001). Tanto animais osmoconformadores quanto animais osmorreguladores devem manter estáveis às concentrações osmóticas

de seus líquidos extracelulares. Pois alterações deste meio trazem variações no volume celular, o que pode prejudicar, ou, em eventos extremos, causar a perda da função celular. Para se ajustar a eventos com variações de salinidade as células dispõem de mecanismos (RVD e RVI) que tentam manter o volume da celular dentro de conformações adequadas a seu funcionamento. A possibilidade de fechar a concha dá a estes animais a capacidade de controlar comportamentalmente a estabilidade da concentração de seus fluidos internos.

Espécies

O conjunto de características fisiológicas influencia no tipo de habitat/micro-habitat que cada espécie pode ocupar no ambiente. Assim como determina o grau de plasticidade fisiológica. Estas características acabam por influenciar os processos de desenvolvimento, crescimento e reprodução dos organismos (Willmer *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2008). Tais características são decisivas, por exemplo, na escolha de certos grupos de animais a serem cultivados. Buscando espécies resistentes e de crescimento rápido, a aquicultura no Brasil chegou a duas espécies de bivalves que se adaptam bem a diversas áreas de cultivo. No país o estado de Santa Catarina é responsável por cerca de 95% da produção nacional de moluscos, atingindo no ano de 2011 a marca de 18.253t (Marenzi & Branco, 2005; Epagri, 2011). No estado catarinense apenas moluscos bivalves são cultivados comercialmente, sendo que do total produzido quase 90% são do mexilhão *P. perna* e pouco menos de 10% da ostra *Crassostrea gigas* (Epagri, 2011).

O bivalve *P. perna* pertence à família Mytilidae, que apresentam conchas equivalentes, alongadas e cuneiformes, mais finas na extremidade do

ligamento interno, que podem ser lisas ou ter pequenos “dentes”. O músculo adutor é pequeno ou ausente. Perióstraco marrom escuro, com projeções semelhantes a pelos e interior da concha nacarado. Manto aberto, dois pares de brânquias e pé reduzido. Para fixação e locomoção a maioria utiliza o bisso, que é composto principalmente por biopolímeros, proteínas e água (Rios, 1994; Gosling, 2003; Torres *et al.*, 2012).

A ostra *C. gigas* é o segundo molusco mais cultivado no país, mas em nível mundial é a espécie mais explorada: pertence à família Ostreidae e tem como características grandes conchas inequivalentes (até 170mm). A valva direita é menor e plana, a valva esquerda é maior e côncava. As conchas possuem contorno e formato irregular, uma das valvas é cimentada ao substrato, a partir deste ponto inicia-se o crescimento do animal. Concha foliácea composta de material calcítico, com articulação sem “dentes”, normalmente apresentam cor clara, mas podem ter tons púrpura ou marrom. Não portam fibras do bisso, pé e sifão. Apresentam apenas um grande músculo adutor e uma linha palial inteira (Rios, 1994; Gosling, 2003).

Mesmo pertencendo a classes diferentes de moluscos, bivalves e gastrópodos estão diretamente relacionados no contexto da aquicultura. Alguns empreendimentos espalhados pelo mundo fazem destes animais foco de seus esforços. Gastrópodos abalones são cultivados em diversos países como fonte de carne (Oakes & Pontes, 1996; Flores-Aguilar *et al.*, 2007) ou como espécie ornamental para aquarismo, além da utilização das suas conchas como *souvenir* (Venkatesan, 2010). Outros caramujos têm passado por processos que avaliam seu potencial como espécie cultivável, tal como ocorre com *Bolinus brandaris* na costa portuguesa (Vasconcelos *et al.*, 2011). Em

comunidades litorâneas brasileiras, algumas pessoas alimentam-se do gastrópodo *Stramonita brasiliensis*¹ (Claremont & Reid, 2011) e estudos foram conduzidos para verificar se o cultivo da espécie apresenta viabilidade econômica (Manzoni e Lacava, 1998). Mesmo que possa ser desenvolvido no futuro o cultivo da espécie *S. brasiliensis*, atualmente a relação mais estreita da espécie com a malacocultura é ocupando o papel de um dos predadores mais efetivos dos bivalves cultivados (Manzoni e Lacava, 1998). Assim como ocorre no Brasil, os caracóis do gênero *Stramonita* no México são importantes predadores em diversas áreas de cultivos de bivalves, causando impactos econômicos significativos (Brown & Richardson, 1988). A relevância da predação do gênero *Stramonita* é tão difundida, que em inglês estes animais recebem o nome popular de *oyster drill* ou broca de ostra (Watanabe & Young, 2006; Lahbib *et al.*, 2011). Esta situação também pode ocorrer em áreas de



Figura 1. Estruturas utilizadas no cultivo de bivalves, (A) telas tubulares de tecido para criação de mexilhões, chamadas cordas; (B) estruturas teladas para criação de ostras, chamadas de lanternas.

¹ A espécie *Stramonita brasiliensis* foi descrita por Claremont e Reid em 2011, no trabalho Claremont *et al.*, 2011. Anteriormente a espécie fazia parte do complexo de espécies *Stramonita haemastoma*

cultivo do mexilhão *P. perna* que é cultivado aderido a parte externa de redes tubulares chamadas cordas (Fig. 1A), ficando exposto à predação por indivíduos da coluna d'água. Assim como as ostras *C. gigas*, que são cultivados no interior de estruturas fechadas chamadas lanternas (Fig. 1B), estão sujeitas ao assentamento de larvas de predadores, os quais durante seu desenvolvimento podem se alimentar das espécies cultivadas. O gastrópodo *S. brasiliensis* é um dos mais importantes predadores nos cultivos catarinenses (Manzoni & Lacava, 1998; Leite, 2007).

Diversos aspectos relacionados aos moluscos nos chamam a atenção, como: as relações que se estabelecem entre estes animais e os demais organismos e com o ambiente; suas respostas comportamentais; sua utilização como recurso alimentar por diversas culturas. Estes fatores destacam os aspectos econômicos e ambientais relacionados aos moluscos. O conhecimento sobre as respostas comportamentais e os processos fisiológicos destes animais pode contribuir com a melhor condução de políticas e atitudes voltadas à exploração e conservação deste importante grupo.

O objetivo deste trabalho é caracterizar as respostas comportamentais e fisiológicas dos bivalves *P. perna* e *C. gigas* e do gastrópodo *S. brasiliensis* diante da variação de fatores ambientais. Embora estas espécies pertençam ao filo Mollusca acredita-se que diante de mudanças em fatores ambientais as espécies apresentem respostas diferentes, mesmo entre os bivalves.

Referências

- Anestis, A., Lazou, A., Pörtner, H.O., & Michaelidis, B., 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293 (2): R911-R921
- Augusto, A., Greene, L.J., Laure, H.J. & McNamara, J.C., 2007. Adaptive shifts in osmoregulatory strategy and the invasion of freshwater by brachyuran crabs: evidences from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae). *Journal of Experimental Zoology*, 307A: 688-698
- Belz, C.E., Darrigran, G., Mäder Netto, O.S., *et al.*, 2012. Analysis of four dispersion vectors in inland waters: the case of the invading bivalves in South America. *Journal of Shellfish Research*, 31 (3): 777-784
- Borghetti, N.R.B., Ostrensky, A. & Borghetti, J.R., 2003. Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Curitiba, 129 pp
- Boscardin, N.R., 2008. A produção aqüícola brasileira. In: Ostrensky, A. *et al.* Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/FAO, 27-72
- Brown, K.M., & Richardson, T.D., 1988. Foraging ecology of the southern oyster drill *Thais haemastoma* (Gray): constraints on prey choice. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 114 (2): 123-141

- Brusca R.C. & Brusca, G.J. 2007. Invertebrates. Sinauer Associates, Sunderland, 936 pp
- Charmantier, G., 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33 (3): 177-190
- Chaparro, O.R., Segura, C.J., Montory, J.A., Navarro, J.M. & Pechenik, J.A., 2009. Brood chamber isolation during salinity stress in two estuarine mollusk species: from a protective nursery to a dangerous prison. *Marine Ecology Progress Series*, 374: 145-155
- Chellan, A., Velayudhan, T.S., Dharmaraj, S. *et al.*, 1983. A note on the predation on pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould) by some gastropods. *Indian J. Fish.* 20 (2): 337-339
- Chiba, T. & Sato, S.I., 2013. Invasion of *Laguncula pulchella* (Gastropoda: Naticidae) and predator–prey interactions with bivalves on the Tona coast, Miyagi prefecture, northern Japan. *Biological Invasions*, 1-12
- Deaton, L.E., 1981. Ion regulation in freshwater and brackish water bivalve mollusks. *Physiology Zoology*, 54 (1): 109-121
- Deaton, L.E., Hilbish, T.J., & Koehn, R.K., 1985. Hyperosmotic volume regulation in the tissues of the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 80 (4), 571-574
- Deaton, L.E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260: 185-197

- Deaton, L.E, 2008. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs. In: Evans, D.H. (ed), Osmotic and ionic regulation: cells and animals. CRC Press, New York 107-133
- De Vooy, C.G.N, & Geenevasen, J.A.J., 2002. Biosynthesis and role in osmoregulation of glycine-betaine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 132: 409-414
- Epagri, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2013. Disponível em: <http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=987&Itemid=182>. Acesso em: 14 jun 2013
- FAO, 2011. Fisheries and Aquaculture Department. World aquaculture 2010. Technical Paper, Rome, 500 (1): 105pp
- Feder, M.E. & Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 61 (1): 243-282
- Flores-Aguilar, R.A., Gutierrez, A., Ellwanger, A., & Searcy-Bernal, R., 2007. Development and current status of abalone aquaculture in Chile. Journal of Shellfish Research, 26 (3): 705-711
- Freire, C.A., McNamara, J.C., Rosa, J.C. & Greene, L.J., 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino

acid concentration in the hemolymph. *General and Comparative Endocrinology*, 100: 83-91

Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., *et al.*, 2008a. 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

Freire, C.A., Onken, H. & McNamara, J.C., 2008b. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 151: 272-304

Futuyama, D.J. 1998. *Evolutionary Biology*, 3rd. Ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 279-301

Garrity, S.D. & Levings, S.C., 1981. A predator-prey interaction between two physically and biologically constrained tropical rocky shore gastropods: direct, indirect and community effects. *Ecological Monographs*, 268-286

Glor, R.E., 2010. Phylogenetic insights on adaptive radiation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41: 251-270

Gosling, E., 2003. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 443 pp

Hill, R.W., Wyse, G.A. & Anderson, M., 2008. *Animal Physiology*, 2nd Edition. Massachusetts, Sinauer 768pp

Hiong, K.C., Peh, W.Y.X., Loong, A.M., *et al.*, 2004. Exposure to air, but not seawater, increases the glutamine content and the glutamine synthetase

- activity in the marsh clam *Polymesoda expansa*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 4605-4614
- Jordan, P.J. & Deaton, L.E., 1999. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 122: 199-205
- Khan, H.R., Price, D.A., Doble, K.E., Greenberg, M.J. & Saleuddin, 1999. Osmoregulation and FMRFamide-Related peptides in the salt marsh snail *Melampus bidentatus* (Say) (Mollusca: Pulmonata) *Biological Bulletin*, 196: 153-162
- Kube, S., Gerber, A. Jansen, J.M., 2006. Patterns of organic osmolytes in two marine bivalves, *Macoma balthica*, and *Mytilus* spp., along their european distribution. *Marine Biology*, 149: 1387-1396
- Lahbib, Y., Abidli, S., & El Menif, N.T., 2011. Spawning and intracapsular development of *Stramonita haemastoma haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) collected in northern Tunisia. *Marine Biology Research*, 7(7), 719-726
- Leite, L.D.A., 2007. Influência da predação, parasitismo e densidade de sementes nas perdas de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, PPG em Aquicultura, UFSC
- Loh, K.S. & Todd, P.A., 2011. Diet and feeding in the sea star *Astropecten indicus* (Döderlein, 1888). *Raffles Bulletin of Zoology*, 59: 251-258

- Malavé, C., Freitas, L., Lodeiros, *et al.*, 2012. Annual recruitment, predation rates and biocontrol of *Linatella caudate* (Mollusca: Gastropoda) in suspended enclosure culture of the pearl oyster *Pinctada imbricata*. *Aquaculture*, 355: 75-83
- Manzoni, G. C. & Lacava, L. A., 1998. Crescimento dos gastrópodes *Thais (Stramonita) haemastoma* e *Cymatium parthenopeum parthenopeum* em cultivo experimental na enseada da armação do Itapocoroy (26O 47'S - 48O 36'W) (Penha - SC). *Notas Tecnicas Facimar*, 2: 167-173
- Marenzi, A.W. & Branco, J.O., 2005. The mussel *Perna perna* (Linnaeus)(Bivalvia, Mytilidae) in culture at the Armação of the Itapocoroy, Santa Catarina, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22 (2): 394-399
- McAlister, R.O., & Fisher, F.M., 1968. Responses of the false limpet, *Siphonaria pectinata* Linnaeus (Gastropoda, Pulmonata) to osmotic stress. *Biological Bulletin*, 134 (1): 96-117
- McNamara J.C., Greene L.J., Rosa J.C., Augusto A., 2004. Adjustment of free amino acid pools in different tissues and hemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during salinity acclimation. *Marine Freshwater Behavior & Physiology*, 37 (3): 193-208
- Medler, S., Thompson, C.C., Dietz, T.H. & Silverman, H., 1999. Ionic effects on intrinsic gill muscles in the freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 122: 163-172

- Oakes, F.R., & Ponte, R.D., 1996. The abalone market: opportunities for cultured abalone. *Aquaculture*, 140 (1): 187-195
- Péqueux, A. & Gilles, R., 1981. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology*, 92: 173-186
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15: 1-60
- Pierce, S. K. & Greenberg, M. J., 1973. The initiation and control of free amino acid regulation of cell volume in salinity-stressed marine bivalves. *Journal of Experimental Biology*, 59: 435- 440
- Pierce, S. K., 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biological Bulletin*, 163: 405-419
- Preston, R.L., 2008. Osmoregulation in annelids. In: Evans, D.H., *Osmotic and ionic regulation: Cells and Animals*. CRC Press, Boca Raton, 135-164
- Prosser, C.L., 1973. *Comparative Animal Physiology*. 3^{ed}. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 966pp
- Resgalla Jr, C. 2011. The holoplankton of the Santa Catarina coast, southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83 (2): 575-588
- Rios, E.C. 1994. *Seashells of Brazil*. Rio Grande do Sul: Fundação Universidade de Rio Grande, Museu Oceanográfico, 368pp

- Robertson, J.D., 1960. Osmotic and ionic regulation. The physiology of crustacea. Metabolism and growth. Academic press, New York, 1: 319-339
- Santini, G., Bruschini, C., Pazzagli, L., et al., 2001. Metabolic responses of the limpet *Patella caerulea* (L.) to anoxia and dehydration. Comparative Biochemistry and Physiology A, 130: 1-8
- Schmidt-Nielsen, K., 2002. Fisiologia animal – Adaptações e meio ambiente, 5ªed. Editora Santos, São Paulo, 620 pp
- Schreck, C. B., Olla, B. L., & Davis, M. W. (1997). Behavioral responses to stress. Fish stress and health in aquaculture, 62: 145-170
- Silveira Jr., N.; Couto, F.R.; Brognoli, F.F. *et al.*, 2008. Evidências da passagem da pluma do Rio da Prata pela baía sul da ilha de Santa Catarina, Brasil. In: III Congresso Brasileiro de Oceanografia, Fortaleza
- Sofia, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. World review of fisheries and aquaculture. FAO, Rome, 209pp
- Symanowski, F. & Hildebrandt, J.P., 2010. Differences in osmotolerance in freshwater and brackish water populations of *Theodoxus fluviatilis* (Gastropoda: Neritidae) are associated with differential protein expression. Journal of Comparative Physiology B, 180 (3): 337-346
- Torres, F.G., Troncoso, O.P., & Torres, C.E., 2012. Mussel byssus fibres: a tough biopolymer. In: John, M.J., Thomas, S. Clark, J.H. & Kraus, G.A. (Eds.). Natural polymers, Royal Society of Chemistry, 1 (1): 349pp

- Vasconcelos, P., Pereira, A.M., Constantino, R., Barroso, C.M., & Gaspar, M.B., 2011. Growth of the purple dye murex, *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae), marked and released in a semi-intensive fish culture earthen pond. *Scientia Marina*, 76 (1): 67-78
- Venkatesan, V., 2010. Marine ornamental molluscs. National Training Programme on Marine Ornamental Fish Culture, 27-32
- Watanabe, J. T. & Young, C. M., 2006. Feeding habits and phenotypic changes in proboscis length in the southern oyster drill, *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae), on Florida sabellariid worm reefs. *Marine Biology*, 148 (5): 1021-1029
- Whittamore, J.M., 2012. Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish. *Journal of Comparative Physiology B*, 182: 1-39
- Yaroslavtseva, L.M. & Sergeeva, E.P., 2009. Adaptation to reduced salinity in larvae of the mussel *Crenomytilus grayanus* from spring and summer spawnings. *Russian Journal of Marine Biology*, 35 (4): 335-341

*CAPÍTULO 1: Caracterização da capacidade osmorregulatória dos bivalves mais utilizados na malacocultura brasileira *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (*Bivalvia*, *Mollusca*)*

Resumo

A aquicultura é uma das fontes para a crescente demanda mundial por alimentos. Dentre as espécies cultivadas, os moluscos merecem destaque pelo aumento progressivo da sua produção (no Brasil, o estado de Santa Catarina é responsável pela maior parte da produção de moluscos bivalves). Os bivalves *Perna perna* e *Crassostrea gigas* dominam as áreas de cultivo. Neste trabalho avaliou-se o desempenho das espécies, através de experimentos *in vivo*, frente a combinações de três dos fatores abióticos mais relevantes para o desenvolvimento dos animais: salinidade [0, 35 (controle) e 45] (n=6), temperatura [10, 20 (controle) e 30°C] e pH [6,5, 8 (controle) e 9]. Após os experimentos *in vivo* foram coletadas amostras de água do aquário, da cavidade do manto e hemolinfa para dosagens osmo-iônicas, e tecidos para determinação de teor hídrico (TH). Também foram realizados experimentos *in vitro* nos quais foi mensurada a capacidade de manutenção da hidratação tecidual dos bivalves diante de desafios hipo e hiperosmóticos com variação de ± 30 e 50% (relacionados ao controle isosmótico à hemolinfa). Foram utilizados fragmentos do músculo adutor (choque de 30%) e do manto (choques de 30 e 50%). Os resultados dos experimentos *in vivo* demonstraram que as variações de pH provocaram alterações na concentração osmo-iônica da hemolinfa de ambas as espécies somente nas condições em que foram combinados os mais altos valores de salinidade e pH (salinidade 45 e pH 9). Na salinidade 0, os

moluscos permaneceram com as conchas fechadas e mantiveram a concentração da hemolinfa semelhante ao que é encontrado na salinidade controle. Na salinidade 45 a concentração dos fluidos aumentou acompanhando a concentração do meio, tendo sido observada bastante secreção de muco. As diferenças interespecíficas no TH tecidual ocorreram principalmente em função de um erro metodológico, pois foram avaliados dois tecidos diferentes. A estabilidade da osmolalidade na hemolinfa de *C. gigas* na temperatura de 10°C mostra que a espécie lida melhor com baixas temperaturas, porém nas demais condições as duas espécies apresentaram o mesmo padrão de resposta. Nos experimentos *in vitro*, que avaliaram a variação de volume tecidual, ambas as espécies mostraram queda de peso, mas *C. gigas* apresentou maior variação com relação ao controle do que *P. perna*. De modo geral as espécies apresentaram padrão semelhante de resposta às condições experimentais *in vivo*, o que pode ser explicado pelas valvas que protegem os animais, retardando o efeito dos experimentos. Pode-se concluir que ambas as espécies apresentaram grande plasticidade fisiológica.

Abstract

Aquaculture is one of the sources for the growing global demand for food. Among the cultivated species, molluscs are remarkable by the progressive increase of its production. In Brazil, the Santa Catarina state is responsible for most of the production of bivalve molluscs. The bivalves *Perna perna* and *Crassostrea gigas* dominate growing areas. This work aimed to evaluate the performance of these species (n=6), through experiments *in vivo*, face to the combination of three of the most relevant abiotic factors to the development of animals: salinity [0, 35 (control), and 45], temperature [10, 20 (control), and 30 °C], and pH [6.5, 8 (control), 9]. After *in vivo* experiments, samples of aquarium water, mantle cavity fluid, and hemolymph was collected for osmo-ionic concentrations dosages, and tissues for determination of water content (TH). We also performed *in vitro* experiments, in which we measured bivalves ability to maintain tissue hydration facing hypo -and hyperosmotic challenges ranging of ± 30 and 50% (related to the control isosmotic to the hemolymph). Adductor muscle (shock 30%) and mantle (30 shocks and 50%) fragments were used for this. The results of *in vivo* experiments demonstrated that variations in pH caused changes in osmo-ionic concentration of the hemolymph of both species only in conditions in which were combined the highest salinity and pH values (45 salinity and pH 9). Molluscs, under 0 Salinity, remained with the shells closed, and kept the hemolymph concentration similar to that found in the control salinity. In the 45 salinity, the fluid concentration increased, following the medium variation, and it was observed quite mucus secretion. The interspecific differences in TH tissue occurred mainly due to a methodological error, as were evaluated two different tissues. The stability of the hemolymph osmolality of *C.*

gigas at 10 ° C shows that the species best deals with low temperatures, but in other conditions the two species showed the same response pattern. In *in vitro* experiments, we evaluated the variation of tissue volume, and both species showed a decrease in weight, but *C. gigas* showed greater variation with respect to control than *P. perna*. Generally, the species showed a similar pattern of response under *in vivo* experimental conditions, which can be explained by valves which protect the animals, delaying the experiments effects. It can be concluded that both species showed high physiological plasticity.

Introdução

A demanda da população mundial por alimentos cresce constantemente, e a aquicultura vem crescendo expressivamente para fornecer alimentos que ajudam a minimizar este problema (Dumbauld *et al.*, 2009; Shumway, 2011). O Brasil segue essa tendência, e vem aumentando significativamente sua produção aquícola (Boscardin, 2008). O maior risco relacionado à atividade aquícola é o “escape” de indivíduos para o ambiente, pois a maior parte da produção nacional consiste de espécies exóticas (Orsi & Agostinho, 1999; Borghetti *et al.*, 2003; Castilho *et al.*, 2008). Embora o cultivo de espécies exóticas ofereça muitos riscos ambientais, estão sendo desenvolvidas técnicas visando ampliar a produção e minimizar os efeitos ao meio, como: o cultivo em mar aberto (Pogoda *et al.*, 2011) e o melhoramento genético (Ward *et al.*, 2000). A hibridização em laboratório visa aumento da velocidade de crescimento, melhorando o sistema imune e diminuindo os riscos de contaminação ambiental (Allen *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

No Brasil a malacocultura (cultivo de moluscos) também apresenta crescimento na produção. Principalmente no estado de Santa Catarina, com 95% da produção nacional (Marenzi & Branco, 2005; Epagri, 2013). O mexilhão *P. perna* (Fig. 1.1A) em 2011 foi responsável por quase 90% da produção local (Santos *et al.*, 2011; Epagri, 2013). Existem dúvidas da origem da espécie *P. perna*, se exótico (Souza *et al.*, 2004; 2010; Fernandes *et al.*, 2008) ou nativo (Rios, 1994; Agudo-Padrón, 2011a,b; Callapez *et al.*, 2012). No ambiente o mexilhão *P. perna* é um engenheiro de ecossistemas, pois os aglomerados de

indivíduos da espécie expandem tridimensionalmente o ambiente e abrigam diversos organismos e servir como substrato para outros (Cuddington & Hastings, 2004). Contudo, o desenvolvimento da comunidade epibionte prejudica o crescimento do mexilhão (Metri *et al.*, 2002; Sá *et al.*, 2007). Embora a literatura contemple vários aspectos da fisiologia da espécie (Abessa *et al.*, 2005; Resgalla *et al.*, 2006; 2010; Resgalla & Brasil, 2011). As informações sobre suas respostas osmorregulatórias não são muito amplas, o que aumenta a relevância da condução de trabalhos com este escopo (Stucchi-Zucchi & Salomão, 1992, 1998; Ferreira & Salomão, 2000). Grande parte dos estudos sobre a espécie são relacionados com toxicologia (Bainy *et al.*, 2000; Pessatti *et al.*, 2002; Dafre *et al.*, 2004; Cortez *et al.*, 2012; Jourmi *et al.*, 2012).

A ostra *Crassostrea gigas* (Fig. 1.1B) é a segunda espécie mais cultivada no país e o molusco mais cultivado no mundo (Epagri, 2013; Borghetti *et al.*, 2003). Oriunda de águas temperadas a Ostra do Pacífico (*C. gigas*) tem grande capacidade de adaptação a condições ambientais variáveis, o que favorece o seu cultivo (Cognie *et al.*, 2006). De hábito filtrador, a espécie pode ser intoxicada pelo aumento na reprodução de algas tóxicas (*blooms*) ou por ação antrópica (Greenberg, 1956; Seubert *et al.*, 2013). Em resposta aos *blooms* é alterada a movimentação das valvas de *C. gigas* (Tran *et al.*, 2010). Quando são expostos a ambientes contaminados os bivalves acumulam toxinas nos tecidos (Bricelj *et al.*, 1991, 2012), o que é constatado por estudos toxicológicos com a espécie *C. gigas*, nos períodos embrionário e larval (Martin *et al.*, 1981; Beiras & His, 1995; Geffard *et al.*, 2002; Mai *et al.*, 2012) e adulto (Boutet *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2012). A ostra *C. gigas*, tem como atrativos o porte, rápido desenvolvimento e plasticidade fisiológica (Kobayashi *et al.*,

1997; Galil, 2000; Pogoda *et al.*, 2011). Após a exploração comercial da espécie foi constatado a presença da espécie em ambientes naturais na França (Zibrowius, 1992), na Itália (Occhipinti-Ambrogi *et al.*, 2011) e na Alemanha (Diederich, 2006). Sua presença altera a estrutura das comunidades de invertebrados associadas (Diederich, 2005; Kochmann *et al.*, 2008). A ostra *C. gigas* também apropria-se do espaço ocupado pela grama marinha *Zostera marina*, o que muda a comunidade local (Wagner *et al.*, 2012). Além disso, pode ocorrer a hibridização com indivíduos de outras espécies (Allen & Gaffney, 1993).

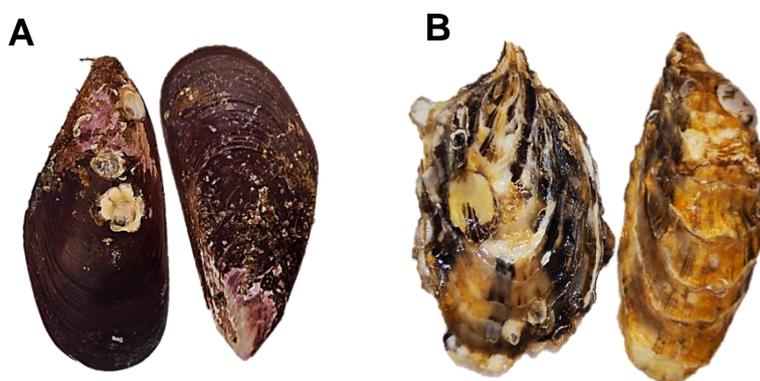


Figura 1.1. Exemplos das espécies *P. perna* (A) e *C. gigas* (B), indivíduos de ambas as espécies com aproximadamente 13 centímetros.

Em ambientes naturais mexilhões e ostras marinhos estão sujeitos a períodos de exposição ao ar, alterações de salinidade, temperatura e pH, o que afeta sua homeostasia e prejudica o crescimento dos bivalves (Wang *et al.*, 2002; Gosling, 2003; Deaton, 2008; Ferreira *et al.*, 2011). Contudo, nos cultivos em *long-lines* os animais permanecem imersos, o que minimiza a exposição a fatores estressantes. Nesta condição os animais alimentam-se constantemente o que acelera o seu crescimento (Borghetti & Silva, 2008; Dumbauld, *et al.*,

2009; Ezgeta-Bali *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011). O mexilhão *Perna viridis* em baixas de salinidades diminuiu o crescimento e a quantidade de carboidratos e gorduras acumulados em seus tecidos (Wang *et al.*, 2011). A comparação entre duas populações do mexilhão *Mytilus edulis*, de portes diferentes, concluiu que indivíduos de menor porte desviam energia para a excreção e a respiração em resposta as variações ambientais, o que diminui seu crescimento (Tedengren & Kautsky, 1986). A temperatura e o crescimento dos bivalves são relacionados, mas esta relação não é linear (Gosling, 2003). Variações de temperatura afetam o ciclo de vida dos organismos, o que pode diminuir a disponibilidade de alimentos no ambiente, o que vai afetar indiretamente o ganho de massa dos bivalves (Smaal & van Stralen, 1990). A redução do pH (acidificação dos oceanos) afeta gravemente os primeiros estágios de vida do mexilhão *M. edulis*, reduzindo seu crescimento e “bem estar” (Gazeau *et al.*, 2010) e a resposta imune destes bivalves também pode ser prejudicada (Bibby *et al.*, 2008). Animais jovens do gênero *Tridacna* apresentam altas taxas de mortalidade em função da acidificação (Toonen *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2012)

No estado de Santa Catarina onde estes dois moluscos são cultivados, existe uma separação regional das espécies. O cultivo do mexilhão *P. perna* encontra-se centralizado no município de Penha, já o cultivo da ostra *C. gigas* é baseado em Florianópolis, cidades distantes cerca de 100 km apenas. Segundo produtores locais a ostra não se desenvolve satisfatoriamente em Penha, mas o mexilhão pode ser bem sucedido em ambos os locais. O conhecimento (de modo comparativo) das características fisiológicas das espécies pode contribuir com a determinação dos motivos para o sucesso

comercial ostra em diversas áreas pelo mundo, e da baixa produtividade em outros locais, como no município de Penha/SC. Este trabalho tem por objetivo comparar as respostas fisiológicas das espécies *P. perna* e *C. gigas* a experimentos que combinam salinidade, temperatura e pH, três dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento dos organismos (Yanfang & Shichun, 2006).

Supõe-se que a espécie *P. perna* apresente maior plasticidade fisiológica e demonstre maior estabilidade nas concentrações da hemolinfa nas temperaturas de 20 e 30°C, visto que o mexilhão é estabelecido na costa brasileira (Rios, 1994) e que a espécie *C. gigas* apresente melhor manutenção osmótica na temperatura de 10°C, visto que a ostra é uma espécie que originalmente tem distribuição subtropical (Cognie *et al.*, 2006). Os fatores salinidade e pH devem ocasionar variações na concentração da hemolinfa semelhantes nas duas espécies.

Materiais e Métodos

Os mitilídeos *P. perna* foram adquiridos em um cultivo no município de Penha (26° 46' 11" Sul, 48° 38' 46" Oeste) e as ostras *C. gigas* foram adquiridas no município de Florianópolis (27° 35' 49" Sul, 48° 32' 58" Oeste), ambos no estado de Santa Catarina. Os moluscos foram transportados em caixas de isopor com embalagens de "gelo gel" que mantiveram a temperatura até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), na Universidade Federal do Paraná em Curitiba/PR. No laboratório, os mesmos foram aclimatados em um aquário de 180 litros, com parâmetros semelhantes aos encontrados nos locais de onde foram coletados (salinidade 35, temperatura 22°C ± 2), por um período de pelo menos 5 dias. Os animais foram mantidos sob fotoperíodo natural de aproximadamente 12 horas de luz e de 12 horas de escuro, à temperatura ambiente (20°C ± 2).

Os experimentos foram conduzidos com seis indivíduos por condição, por um período de seis horas, com um animal por recipiente com 2L de água, sendo que cada animal foi testado apenas uma vez. Os mesmos foram submetidos a diferentes combinações de salinidade, temperatura e pH. A salinidade controle foi de 35‰ e as experimentais de 0 e 45‰. As temperaturas testadas foram de 10, 20 (controle) e 30°C. Tais valores foram escolhidos, pois são próximos aos encontrados em eventos extremos de variação de salinidade e temperatura na região (Silveira Jr., comunicação pessoal). O valor de pH controle foi 8 e os experimentais foram 6,5 e 9. Os valores de pH foram escolhidos levando em conta que os animais poderiam retirar carbonato de cálcio (Ca CO₃) das valvas e tamponar as variações

experimentais, assim os valores superaram amplamente as variações ambientais. No total foram 27 condições experimentais por espécie (Fig. 1.2). Não foi utilizado qualquer anteparo que interferisse no fechamento natural das conchas ou outra de reação que os animais pudessem expressar, em virtude das condições impostas experimentalmente. Após os experimentos foram coletadas uma amostra da água do aquário e uma da água retida na cavidade do manto. Cada amostra foi retirada de modo aleatório e independente e continha aproximadamente 500 μ L. Foram dosadas as concentrações osmóticas e iônicas destas amostras. De cada animal foi retirada uma amostra de hemolinfa de cerca de 300 μ L para as dosagens osmo-iônicas e um fragmento dos tecidos moles foi extraído para determinação do teor hídrico. O pH da água de cada aquários foi verificado no início e no final de cada experimento.

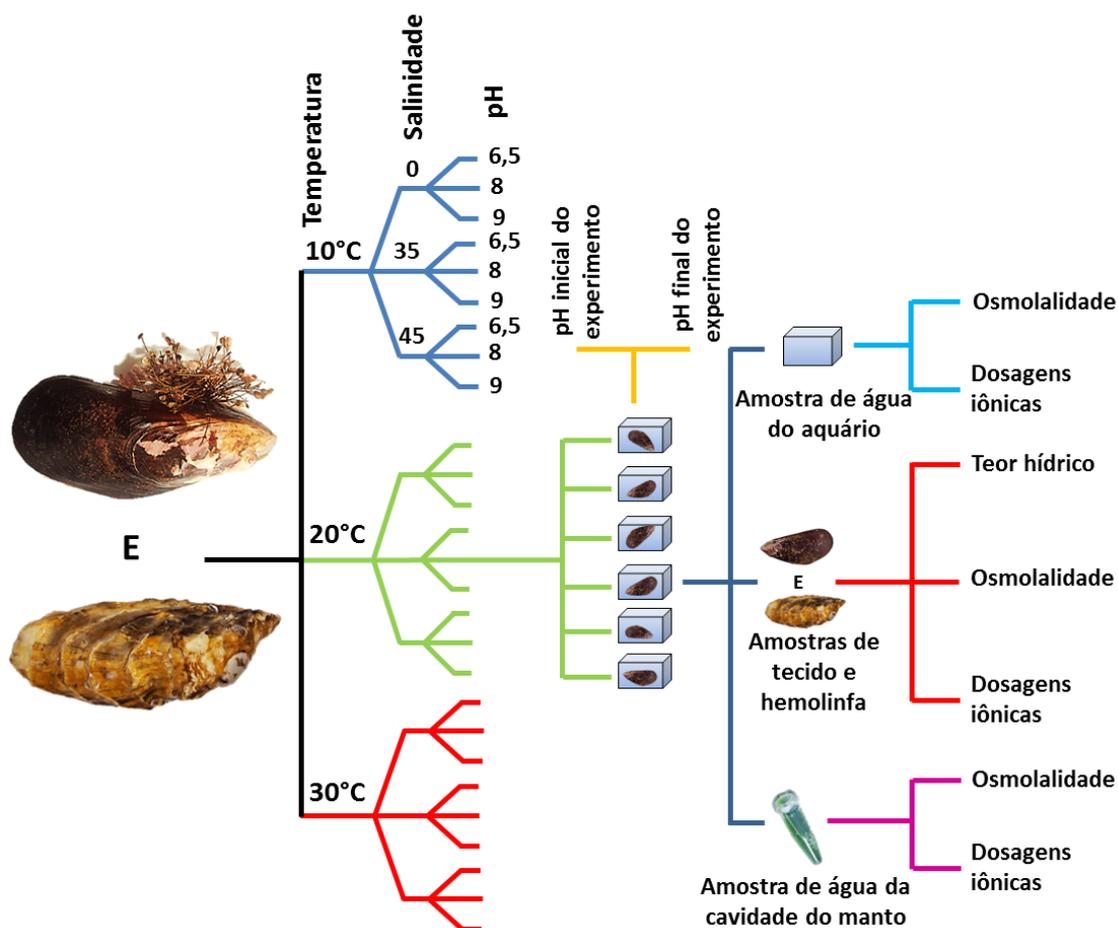


Figura 1.2. Fluxograma resumido dos experimentos realizados com *P. perna* e *C. gigas*. Os valores de salinidade e pH apresentados na temperatura de 10°C foram repetidos em 20 e 30°C. O pH foi aferido no início e no final dos procedimentos em todos os aquários. Os espécimes avaliados foram expostos individualmente. Foi retirada aleatória e independentemente uma amostra da água do aquário e da cavidade do manto por condição experimental para determinação das concentrações osmóticas e iônicas (sódio, cloreto, potássio e magnésio). De cada animal avaliado foi retirada uma amostra de tecido para determinação do teor hídrico e uma de hemolinfa para dosagens da osmolalidade e iônicas. Os procedimentos apresentados na temperatura de 20°C, salinidade 35 e pH 8 foram repetidos em todas as condições experimentais.

Para realização dos experimentos o pH da água dos aquários foi ajustado para condições ácidas com a adição de Ácido Clorídrico e para a condições básicas foi utilizado Hidróxido de Sódio. Para a salinidade 0 foi utilizada água bifiltrada (decolorada) e para a concentração à salinidade 45 foi adicionado sal marinho.

Dosagens de Osmolalidade e Íons

A leitura da osmolalidade das amostras de hemolinfa (não diluídas) foi realizada com micro osmômetro de pressão de vapor Wescor® 5520 VAPRO. As dosagens iônicas de sódio e potássio foram realizadas com amostras de hemolinfa diluídas na proporção de 1:300 a 1:500 em água ultra pura (Milli-Q) em um Fotômetro de Chama Digimed® (DM- 61). Para dosar os íons cloreto (diluição 1:5) e magnésio (1:50), foram utilizados *kits* comerciais Labtest®, com absorbâncias lidas em Espectrofotômetro Amersham Pharmacia Biotech® (Ultrospec 2100 PRO). Buscou-se a diluição que fosse mais adequada para a concentração da hemolinfa, que podia variar em função do experimento a que os animais foram submetidos (diluições testadas e determinadas previamente).

Teor hídrico

Para quantificar o teor hídrico (TH) dos tecidos moles, sendo gônadas para *P. perna* e músculo adutor da concha para *C. gigas*. Cada fragmento foi pesado em Balança Analítica Bioprecisa® (FA2104N, precisão 0,0001g). Primeiramente obteve-se o peso úmido (PU) com o tecido íntegro ($0,5 \pm 0,2$ g), em seguida ele foi desidratado em estufa a temperatura de 60°C durante o período de 24h e então pesado novamente para a obtenção do peso seco (PS). O TH do tecido foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{TH (\%)} = \frac{(\text{PU} - \text{PS})}{\text{PU}} \times 100$$

Experimentos "in vitro"

Nos experimentos *in vitro* *P. perna* e *C. gigas* foram retirados diretamente do aquário estoque, crioanestesiados a -20°C por 20 min e eutanasiados. Foram coletados três fragmentos do manto e músculo adutor ($\pm 0,5$ g) de cada espécime para realização de experimentos com variações de $\pm 30\%$, sendo que um foi colocado na salina controle, um na hipo e um na hiperosmótica. O total de seis fragmentos foi avaliado por salina (controle, hipo e hiperosmótica). Para experimentos com variação de 50% foram retirados apenas fragmentos do manto. Em seguida estes tecidos foram transferidos para um recipiente com cerca de 10 ml de solução salina controle, isosmótica ao fluido extracelular dos animais (Tab. 1). Após a dissecação foi removido suavemente com papel filtro o excesso de fluido dos fragmentos teciduais por ~ 3 segundos, cada fragmento tecidual foi pesado e incubado em soluções hiposmótica (-30 ou -50% da concentração osmótica do controle), controle (979 mOsm) ou hiperosmótica ($+30$ ou $+50\%$ acima do controle) total de seis indivíduos por condição (Tab. 1). Cada amostra de tecido foi mantida em sua respectiva solução e a cada 15 min sendo seca com papel filtro e pesada em Balança Analítica por 75 min. A primeira mensuração de peso de cada amostra foi usada como referência (100%) para os demais valores obtidos.

Tabela 1.1. Composição das salinas controle (isosmótica à hemolinfa) e experimentais (hipo e hiperosmótica de ± 30 e 50% em relação ao controle isosmótico) usadas em experimentos *in vitro* de regulação de volume tecidual (músculos adutor e do manto) de *P. perna* e *C. gigas*.

Salinas	Choque	Componentes variáveis				Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O)	Porcentagem do controle
		NaCl (mM)	KCl (mM)	MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)		
Isosmótica	Controle	470	10	54	10	979	100%
Hiposmótica	- 30%	329	7	38	7	672	32%
	- 50%	235	5	27	5	490	50%
Hiperosmótica	+ 30%	611	13	70	13	1253	127%
	+ 50%	705	15	81	15	1520	155%

Obs.: Componentes adicionais com concentração constante em todas as salinas: D-glicose (5 mM), Glicina (5 mM), HEPES (5 mM) e NaHCO₃ (2 mM), pH 8.2. A osmolalidade foi mensurada em uma amostra de cada salina preparada.

Análise estatística

A análise dos dados de dosagens osmóticas e iônicas foi realizada por *Two Way ANOVA* com *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal e por *Kruskal-Wallis Two Way ANOVA on Ranks* com *post hoc* de Dunn's para dados não normais. Os dados de teor hídrico tecidual *in vivo* e a análise dos dados do experimento *in vitro* foram avaliados por *Two Way ANOVA*, sendo o primeiro fator correspondente ao tratamento e o segundo ao tempo, com *post hoc* de Tukey para dados não normais. O limite de significância considerado foi 0,05.

Resultados

Osmolalidade

EFEITO DA SALINIDADE

A osmolalidade da hemolinfa de *P. perna* (Fig. 1.3 ABC) na salinidade 0 foi menor ou não apresentou diferenças em relação a salinidade 35, mas em todas as condições a osmolalidade apresentou aumento na salinidade de 45.

Na hemolinfa de *C. gigas* (Fig. 1.3 DEF) a osmolalidade em 10°C e pH 9 mantiveram-se estáveis nas salinidades 0 e 35 e aumentaram na salinidade 45. Nas temperaturas de 20 e 30°C a osmolalidade nas salinidades 0 e 35 foi semelhante, houve aumento na concentração em todos os pHs na salinidade 45.

EFEITO DO pH

Para *P. perna* apenas na temperatura de 20°C e salinidade 45 houve diferença entre os pHs, com menor osmolalidade no pH 9 (Fig. 1.3 B). A osmolalidade na hemolinfa de *C. gigas* na temperatura de 10°C e salinidade 45 no pH 9 foi maior do que nas demais condições (Fig. 1.3 D).

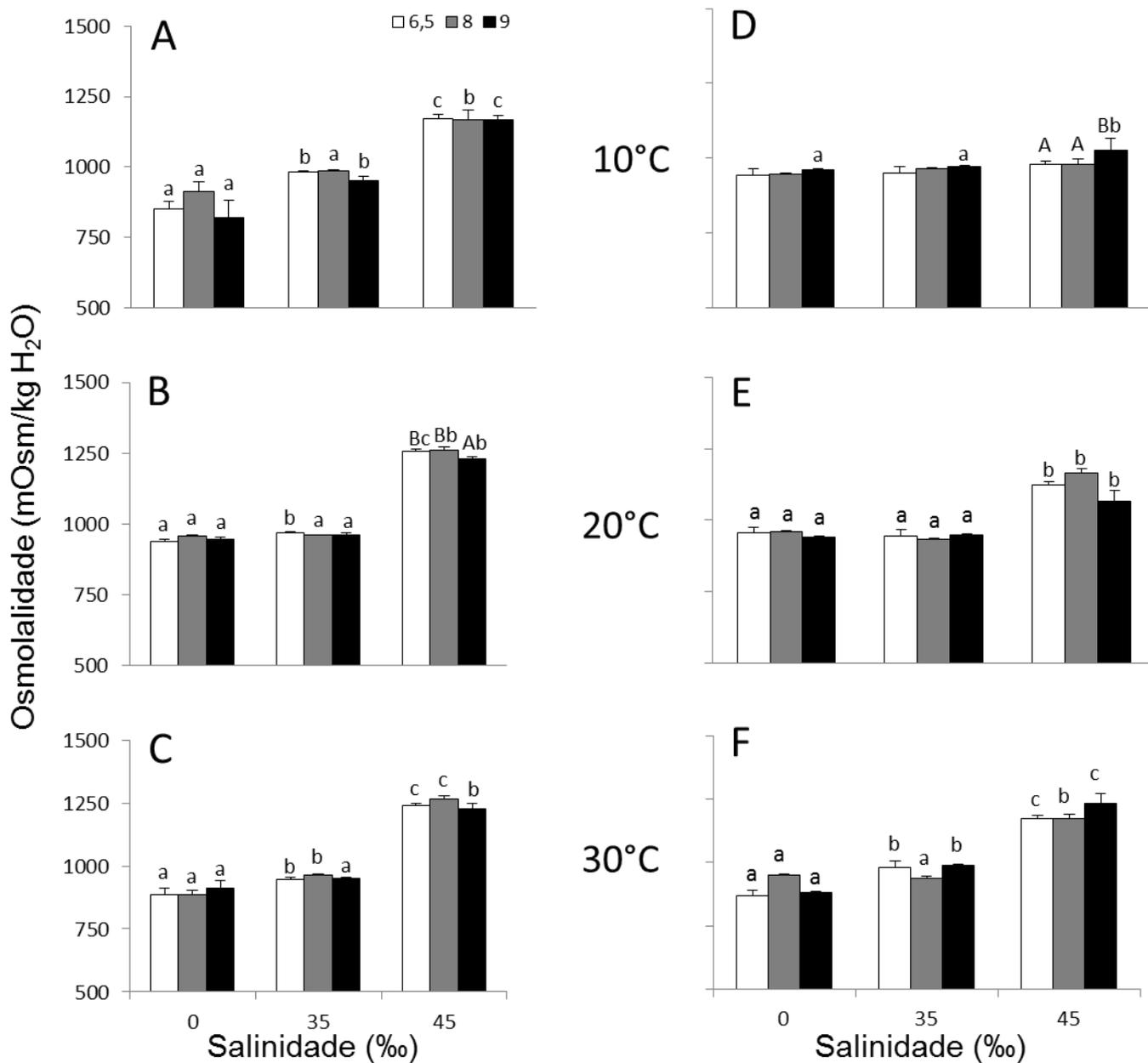


Figura 1.3. Osmolalidade da hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. $P < 0,05$.

Teor Hídrico

Efeito da Salinidade

Os valores de teor hídrico das gônadas do mexilhão *P. perna* (Fig. 1.4 AB) na temperatura de 10°C para o pH 6,5 expostos à salinidade 35 foram maiores do que na salinidade 45. No pH 8 os valores na salinidade 0 foram maiores do que os valores apresentados nas salinidades 35 e 45, os quais apresentavam estabilidades nas medidas. Na temperatura de 20°C no pH 8 os valores de teor hídrico na salinidade 35 foram maiores do que na salinidade 45.

O teor hídrico em *C. gigas* (Fig. 1.4 E) na temperatura de 20°C na salinidade 45‰ foi menor que o registrado nas demais salinidades para os pHs testados.

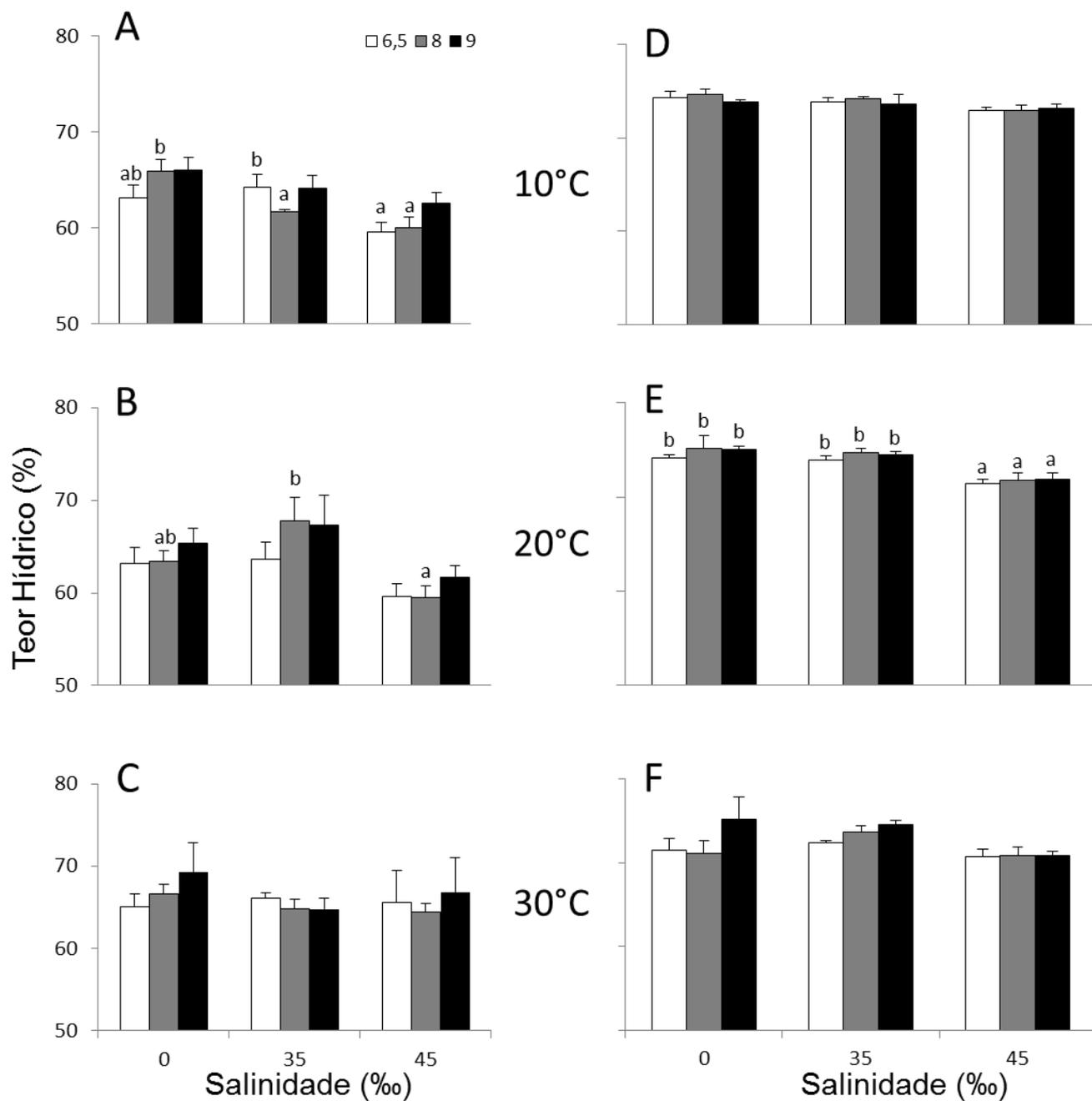


Figura 1.4. Teor hídrico das gônadas de *P. perna* nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C) e do músculo adutor em *C. gigas* nas temperaturas de 10°C (D), 20°C (E) e 30°C (F) barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades, $P < 0,05$.

Cloreto

EFEITO DA SALINIDADE

O cloreto de *P. perna* (Fig.7 ABC) na temperatura de 10°C manteve-se estável nas salinidades 0 e 35 aumentando na salinidade 45 para os 3 pHs. Na temperatura de 20°C e no pH 6,5, as concentrações de cloreto aumentaram sucessivamente a partir da salinidade 0, nas salinidades 0 e 35 as concentrações de cloreto foram estáveis nos pHs 8 e 9 aumentando na salinidade 45. À temperatura de 30°C as concentrações de cloreto nos pHs 6,5 e 8 aumentaram progressivamente iniciando na salinidade 0.

O cloreto de *C. gigas* (Fig. 1.5 DEF) em 10°C no pH 6,5 foram menores na salinidade 0 do que em 45. À temperatura de 20°C no pH 6,5 o cloreto foi estável nas salinidades 0 e 35, aumentando na salinidade 45. Para a temperatura de 30°C a concentração de cloreto no pH 6,5 aumentou sucessivamente a partir da salinidade 0, nos pHs 8 e 9 as concentrações do íon cloreto foram estáveis nas salinidade 0 e 35 aumentando em 45.

EFEITO DO pH

A concentração de cloreto em *P. perna* na temperatura de 10°C e salinidade 0 foi menor no pH 8 do que no pH 6,5. Na temperatura de 20°C e na salinidade 45 as dosagens de cloreto de *C. gigas* no pH 6,5 foi maior que nas demais condições. À temperatura de 30°C na salinidade 45 o menor valor de cloreto foi apresentado no pH 8, aumentando no pH 6,5.

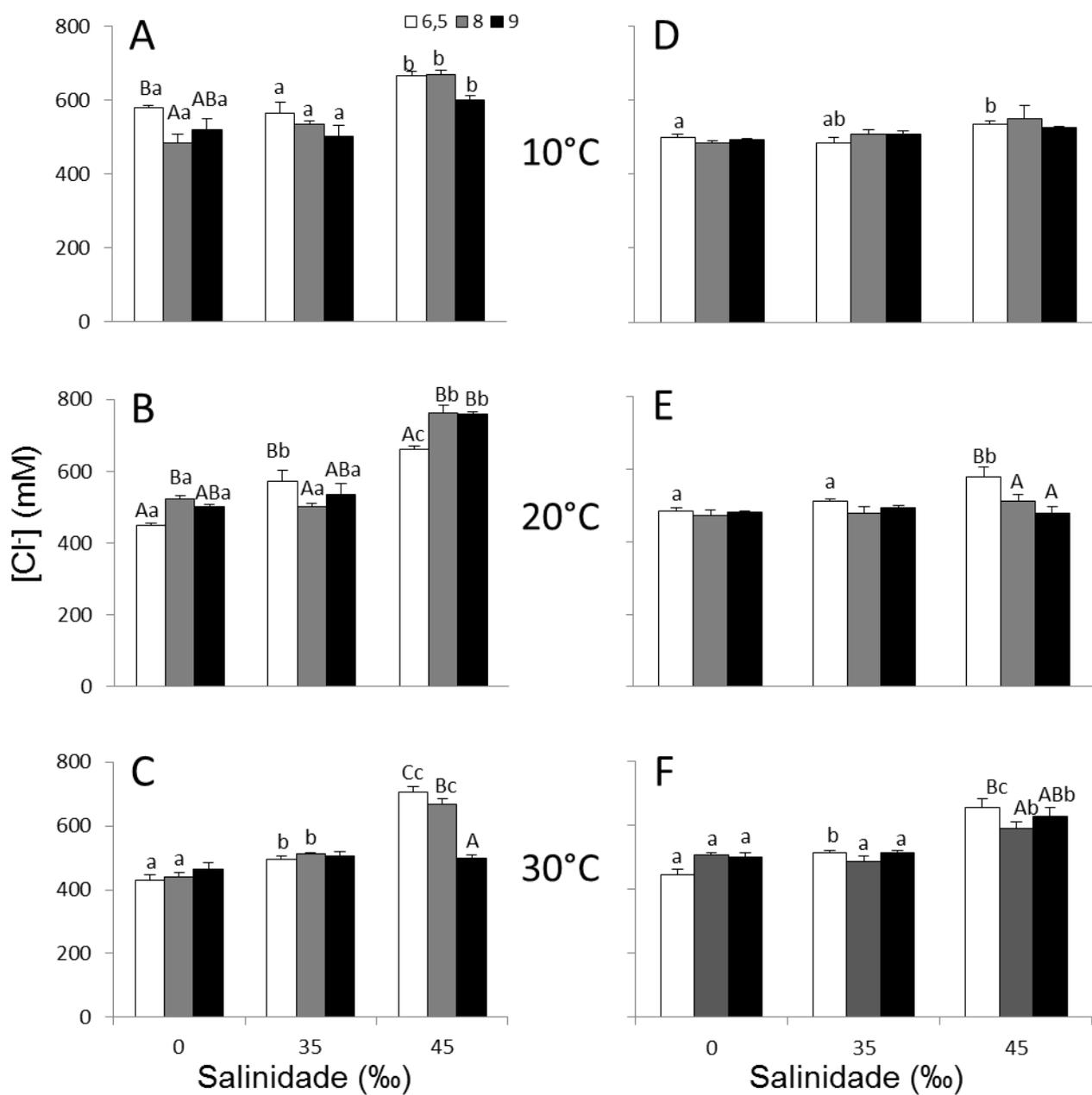


Figura 1.5. Concentração do íon cloreto na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. $P < 0,05$.

Sódio

EFEITO DA SALINIDADE

As dosagens de sódio na hemolinfa de *P. perna* (Fig. 1.6 ABC) na temperatura de 10°C apresentaram-se constantes nas salinidades de 0 e 35, com aumento de concentração na salinidade 45 para todos os pHs. Na temperatura de 20°C as concentrações de sódio no pH 6,5 aumentaram sucessivamente a partir da salinidade 0 e mantiveram-se estáveis nos pHs 8 e 9 nas salinidades 0 e 35 aumentando na salinidade 45. Nos experimentos de 30°C a concentração de sódio no pH 6,5 foi menor na salinidade 35, aumentando progressivamente nas salinidades 0 e 45, houve estabilidade nas concentrações nos pHs 8 e 9 nas salinidades 0 e 35 e aumento em 45.

As ostras *C. gigas* (Fig. 1.6 DEF) expostas a temperatura de 10°C no pH 6,5 apresentaram aumento progressivo da concentração de sódio partindo da salinidade 0, nos pHs 8 e 9 as concentrações verificadas não foram diferentes nas salinidades 0 e 45 e aumentaram na salinidade 35. Na temperatura de 20°C as concentrações de sódio no pH 6,5 na salinidade 35 foram menores do que em 45, nos pHs 8 e 9 as concentrações foram constantes nas salinidade 0 e 35 e aumentaram em 45. Nas exposições de 30°C as concentrações de sódio no pH 6,5 na salinidade 0 foram menores do que em 45, no pH 8 os resultados foram estáveis nas salinidades 0 e 35, aumentando em 45, para o pH 9 as concentrações aumentaram sucessivamente a partir da salinidade 0.

EFEITO DO pH

O mexilhão *P. perna* apresentou diferenças de concentração de sódio na temperatura de 30°C na salinidade 45, onde o pH 8 apresentou menor concentração, pH 9 intermediária e o pH 6,5 com a maior concentração.

O bivalve *C. gigas* em 10°C na salinidade 35 teve menor concentração de sódio no pH 6,5 e estabilidade nos demais, na salinidade 45 as concentrações foram constantes nos pH 8 e 9 e menores no pH 6,5. Em 30°C na salinidade 35 as concentrações no pH 6,5 foram maiores do que no pH 8 e na salinidade 45 a concentração de sódio manteve-se estável nos pHs 6,5 e 8 e aumentou no pH 9.

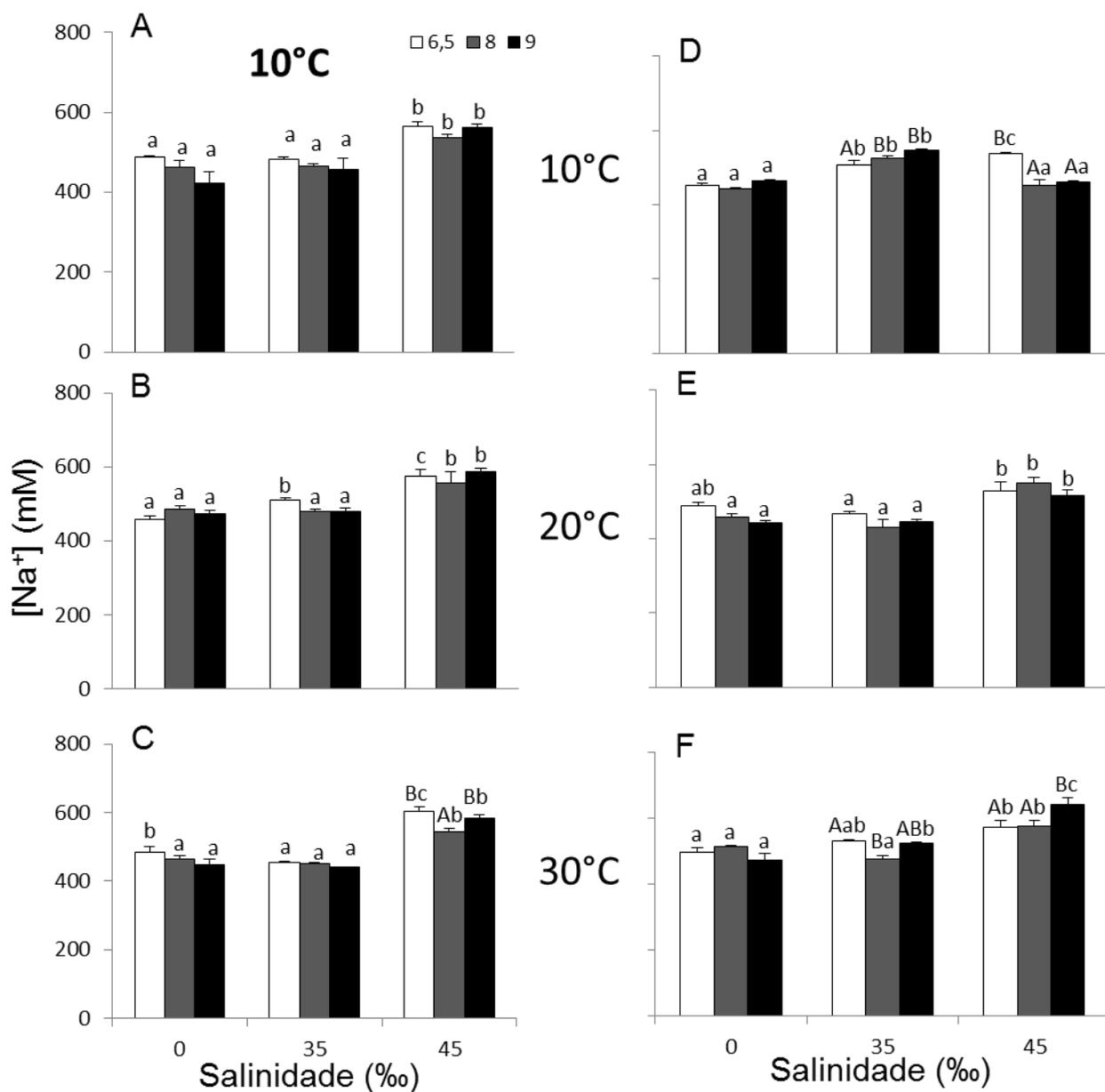


Figura 1.6. Concentração do íon sódio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. $P < 0,05$.

Potássio

EFEITO DA SALINIDADE

As concentrações de potássio na hemolinfa dos mexilhões *P. perna* (Fig. 1.7 ABC) na temperatura de 10°C nos pHs 6,5 e 8 de animais expostos a salinidade 35 foi menor do que a concentração em salinidade 45. No pH 9 as concentrações foram estáveis nas salinidades 0 e 35 e menores do encontrado salinidade 45. Na temperatura de 20°C as concentrações de sódio do pH 6,5 na salinidade 0 e diminuíram em 35 e novamente na salinidade 45, no pH 8 as concentrações na salinidade 0 foram maiores que nas demais salinidades. No pH 9 na salinidade 0 foram as concentrações maiores do que em 35 que foram menores do que na salinidade 45. Na temperatura de 30°C as concentrações de potássio no pH 8 foram constantes nas salinidades 0 e 35 e estas menores do que em 45.

No molusco *C. gigas* (Fig. 1.7 DEF) as concentrações de potássio na hemolinfa na temperatura de 10°C do pH 6,5 em salinidade 0 foram do que em salinidade 35 e 45 que foram estáveis. Para o pH 8 as concentrações na salinidade 0 foram menores do que na salinidade 45 e estas menores que em 35. No pH 9 as dosagens de potássio foram estáveis nas salinidades 0 e 45 que foram menores em 35. Na temperatura de 30°C ostras expostas ao pH 8 e salinidade 35 apresentaram concentrações de potássio menores do que em salinidade 45.

EFEITO DO pH

A espécie *P. perna* na temperatura de 20°C e a salinidade 35 no pH 6,5 apresentou maior concentração de potássio na hemolinfa do que nos demais pHs. Na temperatura de 30°C na salinidade 0 a concentração de potássio no pH 6,5 foi maior do que nas demais condições.

No bivalvo *C. gigas* as concentrações de potássio a 10°C na salinidade 35 em pH 6,5 foram menores do que no pH 8, na salinidade 45 a concentração no pH 6,5 foi maior do que nos demais pHs. Na temperatura de 30°C animais expostos a salinidade 0 e pH 6,5 apresentaram concentração de potássio maior do que nas demais condições. Na salinidade 35 a concentração de potássio no pH 8 foi menor do que no pH 9.

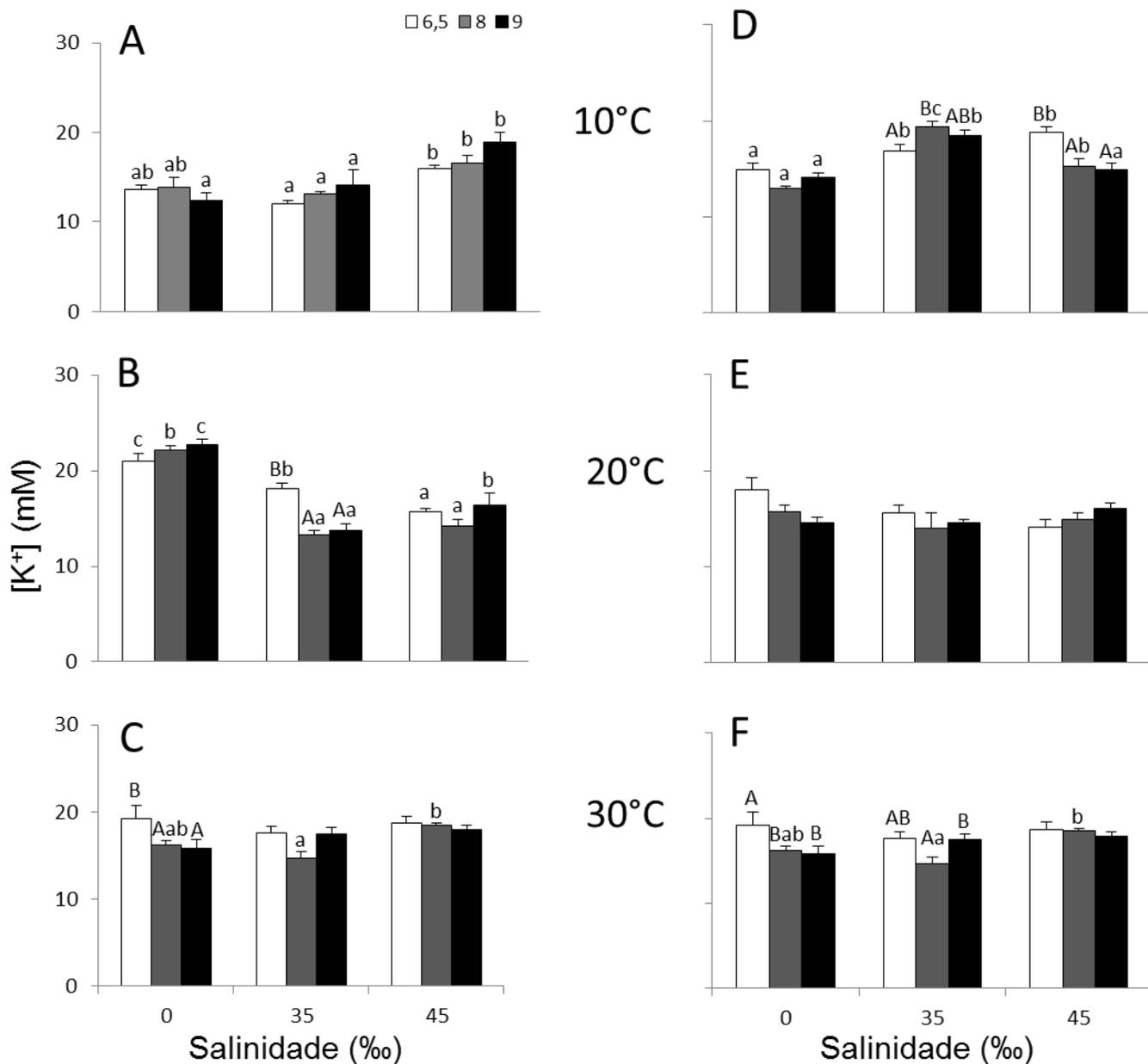


Figura 1.7. Concentração do íon potássio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade, $P < 0,05$.

Magnésio

EFEITO DA SALINIDADE

Em bivalves da espécie *P. perna* (Fig. 1.8 ABC) expostos a temperatura de 10°C a concentração de magnésio na hemolinfa no pH 9 e salinidade 35 foi menor do que em salinidade 45. Na temperatura de 20°C as concentrações iônicas nos pHs 6,5 e 8 se mantiveram estáveis nas salinidades 0 e 35 e foram menores do que em salinidade 45, no pH 9 as concentrações aumentaram sucessivamente partindo da salinidade 0. Para a temperatura de 30°C as concentrações de magnésio no pH 6,5 na salinidade 0 foram menores do que em 45, em pH 8 as concentrações na salinidade 0 foram menores do que nas salinidades 35 e 45, no pH 9 as concentrações aumentaram sucessivamente partindo da salinidade 0.

A concentração de magnésio nas ostras da espécie *C. gigas* (Fig. 1.8 DEF) na temperatura de 10°C e pH 8 na salinidade 0 foram maiores do que na salinidade 45. Na temperatura de 20°C pH 6,5 a concentração de magnésio nas salinidades 0 e 35 foram constantes e menores do que na salinidade 45. Para o pH 8 as menores concentrações foram encontradas na salinidade 35, aumentando sucessivamente nas salinidades 0 e 45 respectivamente. No pH 9 as concentrações de magnésio não variaram nas salinidades 0 e 35, e foram menores do que na salinidade 45. Na temperatura de 30°C as concentrações de magnésio foram invariáveis nas salinidades 0 e 35 as quais foram menores do que em salinidade 45, no pH 9 as concentrações aumentaram progressivamente partindo da salinidade 0.

EFEITO DE pH

No mexilhão *P. perna* em experimento de temperatura de 20°C na salinidade 35, a concentração de magnésio no pH 6,5 foi menor do que em pH 9, já na salinidade 45 a concentração no pH 6,5 foi menor que o resultado encontrado no pH 8.

Para a espécie *C. gigas* exposta a temperatura de 20°C nas salinidades 0 e 45 as concentrações de magnésio nos pHs 8 e 9 foram estáveis e maiores do que em pH 6,5, na salinidade 35 a concentração de magnésio no pH 6,5 foi menor do que no pH 9.

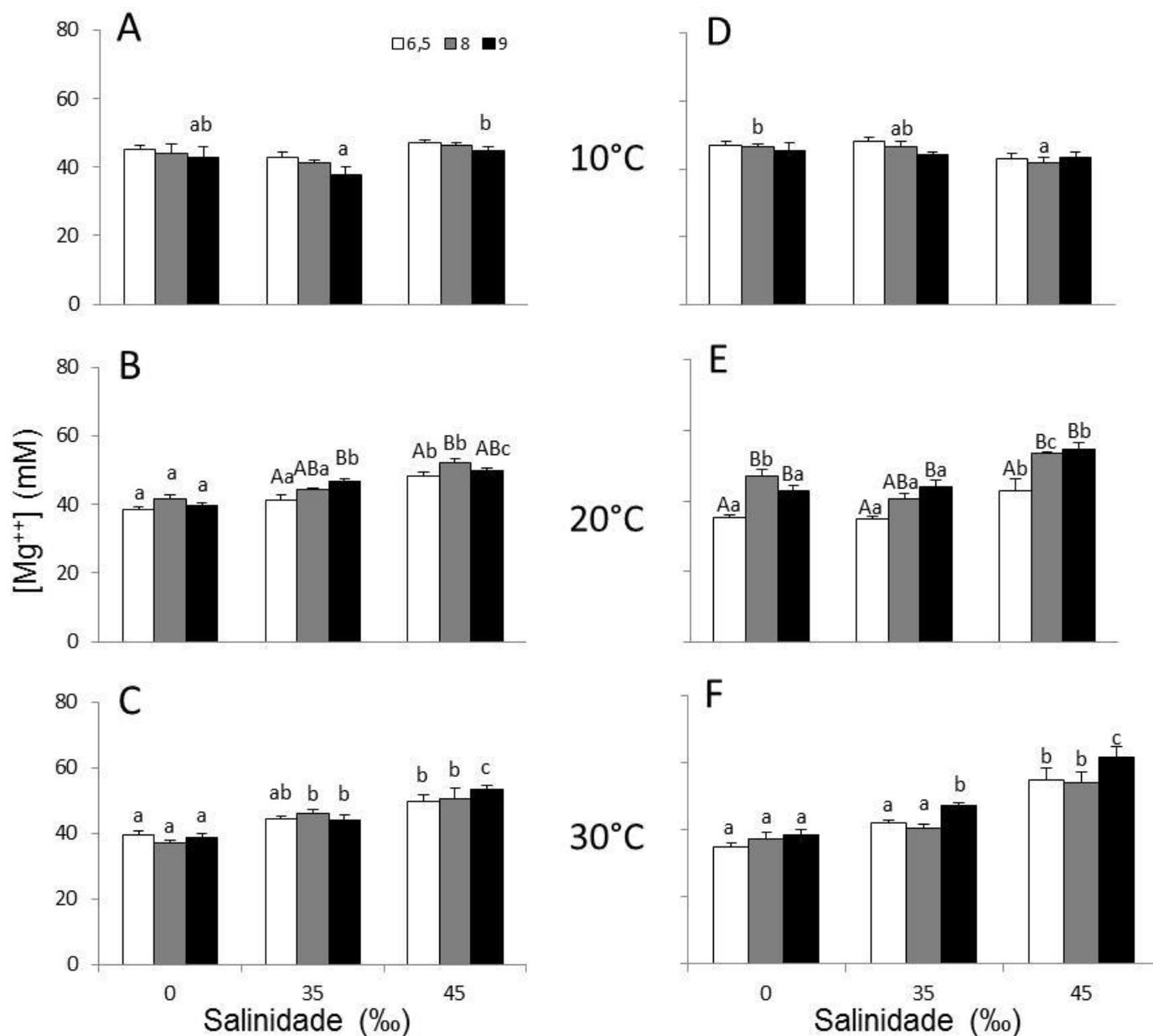


Figura 1. 8. Concentração do íon magnésio na hemolinfa de *P. perna* nas temperaturas de 10 (A), 20 (B) e 30°C (C) e em *C. gigas* em 10 (D), 20 (E) e 30°C (F); barras brancas pH 6,5, barras cinza pH 8 e barras pretas pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os 3 pHs na mesma salinidade. $P < 0,05$.

Regulação de volume

Os experimentos de regulação de volume em fragmentos do manto de *P. perna* (Fig. 1.9 B) foram incubados em salinas controle de 979 mOsm/kg H₂O e experimentais de +30% (hiposalinas) e de -30% (hipersalinas). Os pesos dos fragmentos apresentou queda progressiva em todos os tempos de todas as condições após 75 min de experimento. A condição hiposmótica manteve menor variação de peso, o resultado final foi de 88,9% do inicial, o controle foi intermediário com peso de 83,3% do peso no tempo 0 e a condição hiperosmótica apresentou maior queda no peso, com peso final de 79,7% do inicial.

Os tecidos do manto de *C. gigas* (Fig. 1.10 B) apresentaram queda progressiva de peso em todos os tempos de todas as condições após 75min de experimento. Na condição hiposmótica apresentou 87,5% de volume inicial, no controle a queda foi até 78,9% do peso inicial e no tratamento hiperosmótico o peso final foi 68,2% do peso inicial.

Em experimentos com variação de 50% do controle (Fig. 1.11) com fragmentos do manto, *P. perna* em choque hiposmótico apresentou aumento de peso após 15 min e queda progressiva nos demais tempos, com peso final de 91,8% do inicial. No controle o peso caiu no tempo 30 min estabilizando até o final com peso de 86% do inicial. No experimento hiperosmótico o peso caiu progressivamente até o tempo final com 73,8% do inicial (Fig. 1.11 A). Na salina hiposmótica *C. gigas* demonstrou aumento e manutenção de peso nos tempos de 15 a 45 min com peso final de 108,7%. No controle os tecidos perderam peso e estabilizaram entre os tempos 45 e 75min com peso final de

88,65% do inicial. Na condição hiperosmótica os tecidos perderam peso em 15min e mantiveram-se estáveis até o tempo final, com 74,36% do peso inicial (Fig.13B).

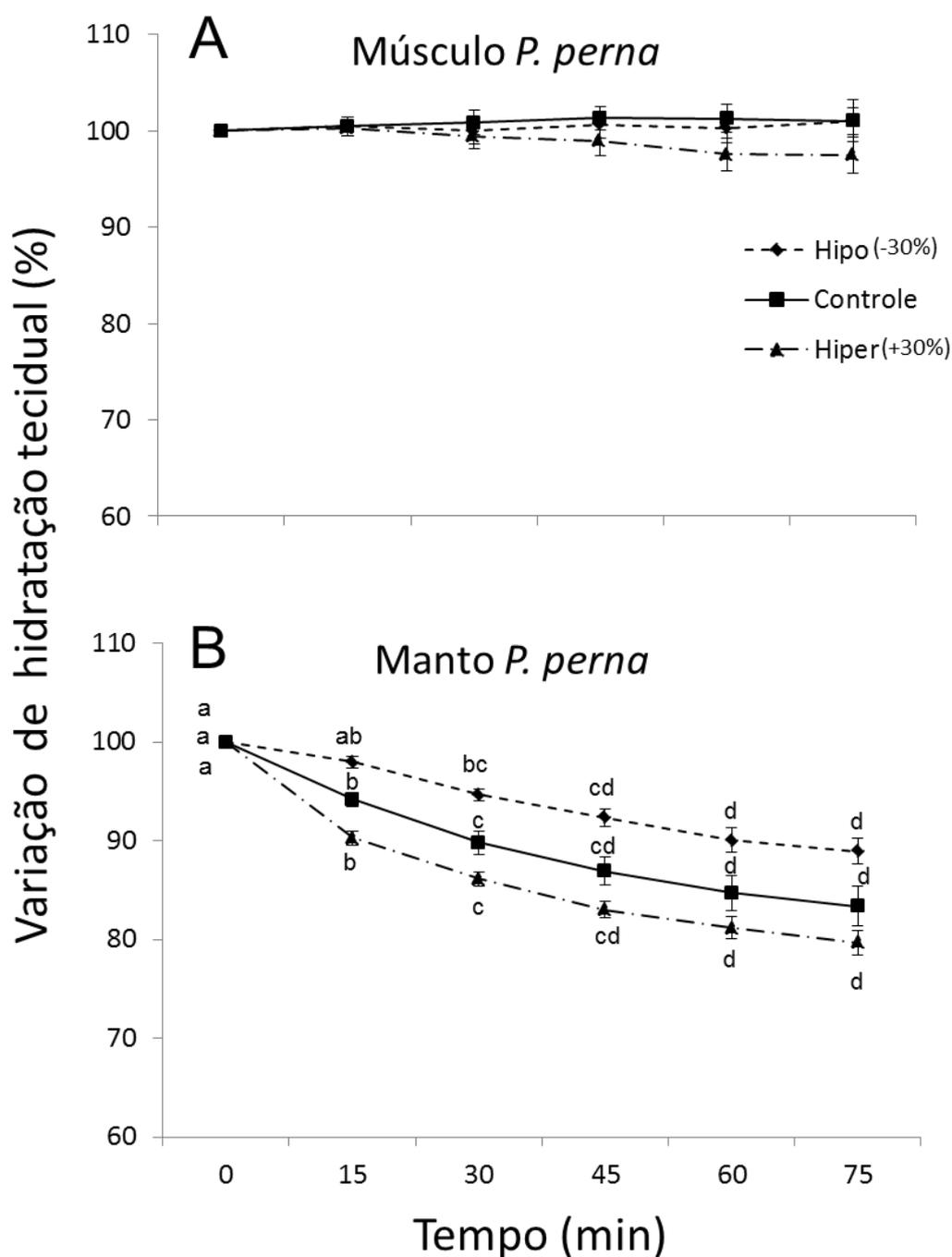


Figura 1.9. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos teciduais de *P. perna* expostos *in vitro* (n=6) aos tratamentos controle (979 mOsm), hiperosmótico (+30%) e hiposmótico (-30%). Tecido do músculo adutor (A) e tecido do manto (B). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o tempo inicial e os tempos experimentais. Em todos os tempos os valores experimentais foram diferentes do controle, exceto no tempo 0. $P > 0,05$.

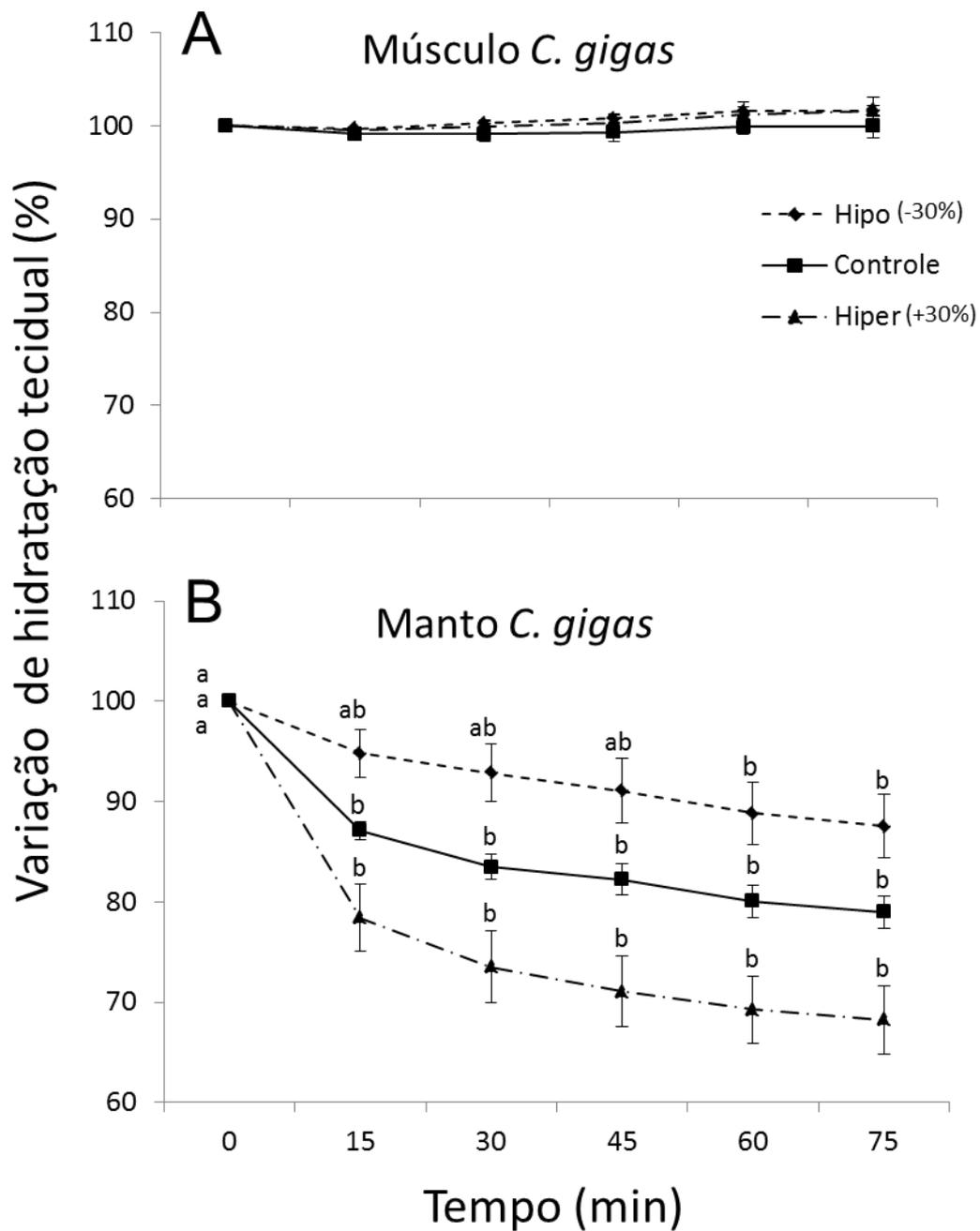


Figura 1.10. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos teciduais de *C. gigas* expostos *in vitro* (n=6) aos tratamentos controle (979 mOsm), hiperosmótico (+30%) e hiposmótico (-30%). Tecido do músculo adutor (A) e tecido do manto (B). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o tempo inicial e os tempos experimentais. Em todos os tempos os valores experimentais foram diferentes do controle, exceto no tempo 0. $P > 0,05$.

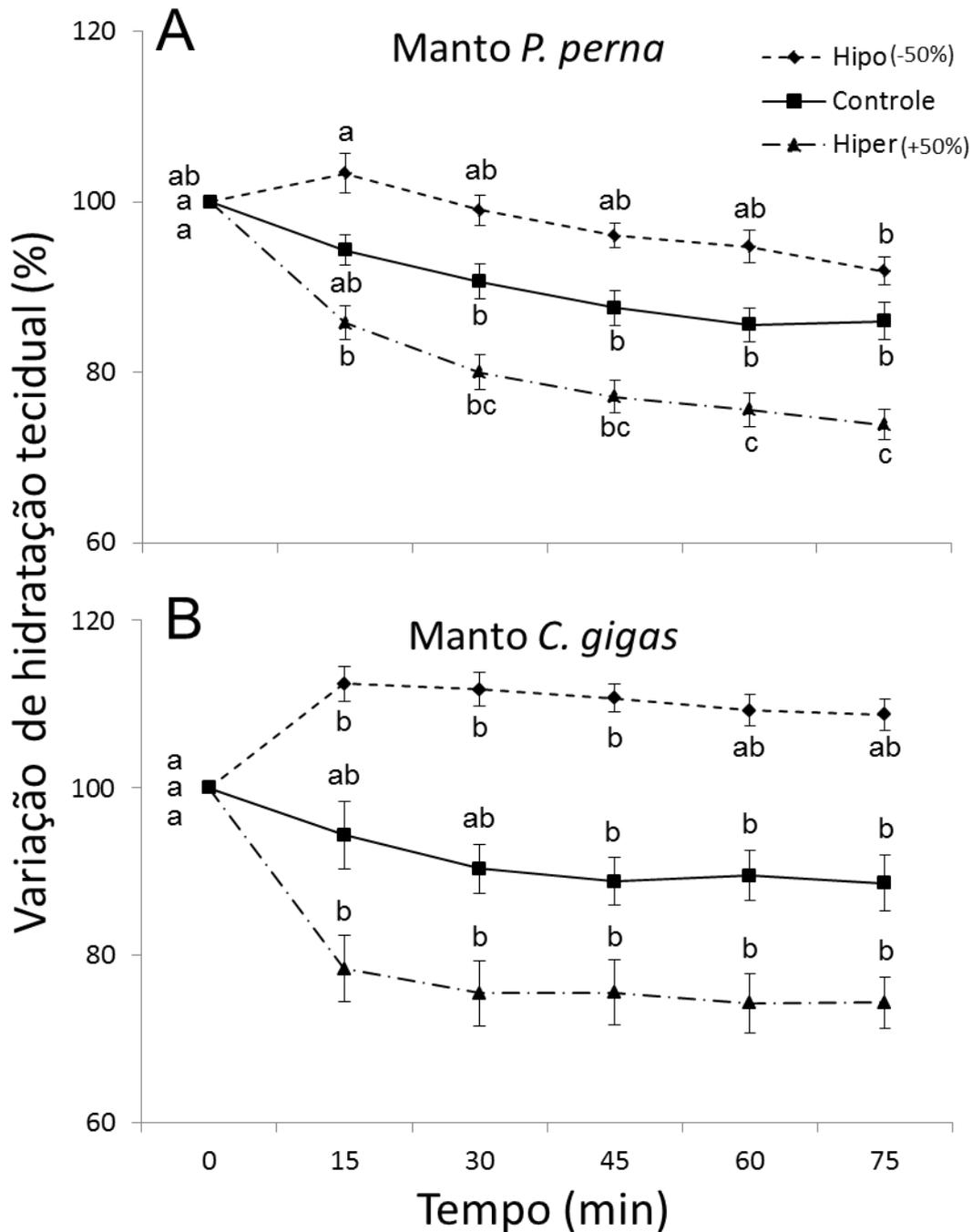


Figura 1.11. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos do manto de *P. perna* (A) e de *C. gigas* (B) expostos *in vitro* (n=6) aos tratamentos controle (979 mOsm), hiperosmótico (+50%) e hiposmótico (-50%). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre o tempo inicial e os tempos experimentais. Em todos os tempos os valores experimentais foram diferentes do controle, exceto no tempo 0 e para *P. perna* no tempo 75 min choque hiperosmótico. $P > 0,05$.

Variação entre pH inicial e final

Variação nos experimentos com *P. perna*

O EFEITO DA SALINIDADE

Nas leituras de pH após os experimentos com a espécie *P. perna* (Fig. 1.12) na temperatura de 10°C nos pHs 6,5, 8 e 9 em salinidade 0 foram menores do que nas salinidades 35 e 45, onde foram estáveis. Na temperatura de 20°C o pH final medido na salinidade 0 para os pHs 6,5 e 9 foram menores do que na salinidade 35 e 45 onde foram estáveis. Nos experimentos a 30°C no pH 6,5 os valores foram estáveis nas salinidades 0 e 35 e foram maiores na salinidade 45. Para o pH 9 os valores aumentaram sucessivamente a partir da salinidade 0.

O EFEITO DO pH

As leituras pós-experimentais de pH de mexilhão *P. perna* na temperatura de 10°C apresentaram os mesmos valores para as salinidades 0 e 35 para os pHs 6,5 e 8 e um valor maior que no pH 9. Na salinidade 45 as leituras aumentaram progressivamente a partir do pH 6,5. Em 20°C as leituras de pH na salinidade 0 foram iguais para os pHs 6,5 e 9 e maiores para o pH 8. Na salinidade 35 os valores aumentaram sucessivamente iniciando no pH 6,5. Na salinidade 45 as leituras foram equivalentes nos pH 6,5 e 8 e estas menores que as leituras do pH 9. Na temperatura de 30°C as leituras de pH na salinidade 0 no pH 6,5 foram menores do que nas demais condições, as quais tiveram valores estáveis. Na salinidade 35 as leituras exibiram aumento

progressivo começando no pH 6,5. Na salinidade 45 as leituras dos pHs 6,5 e 8 foram equivalentes e menores do que no pH 9.

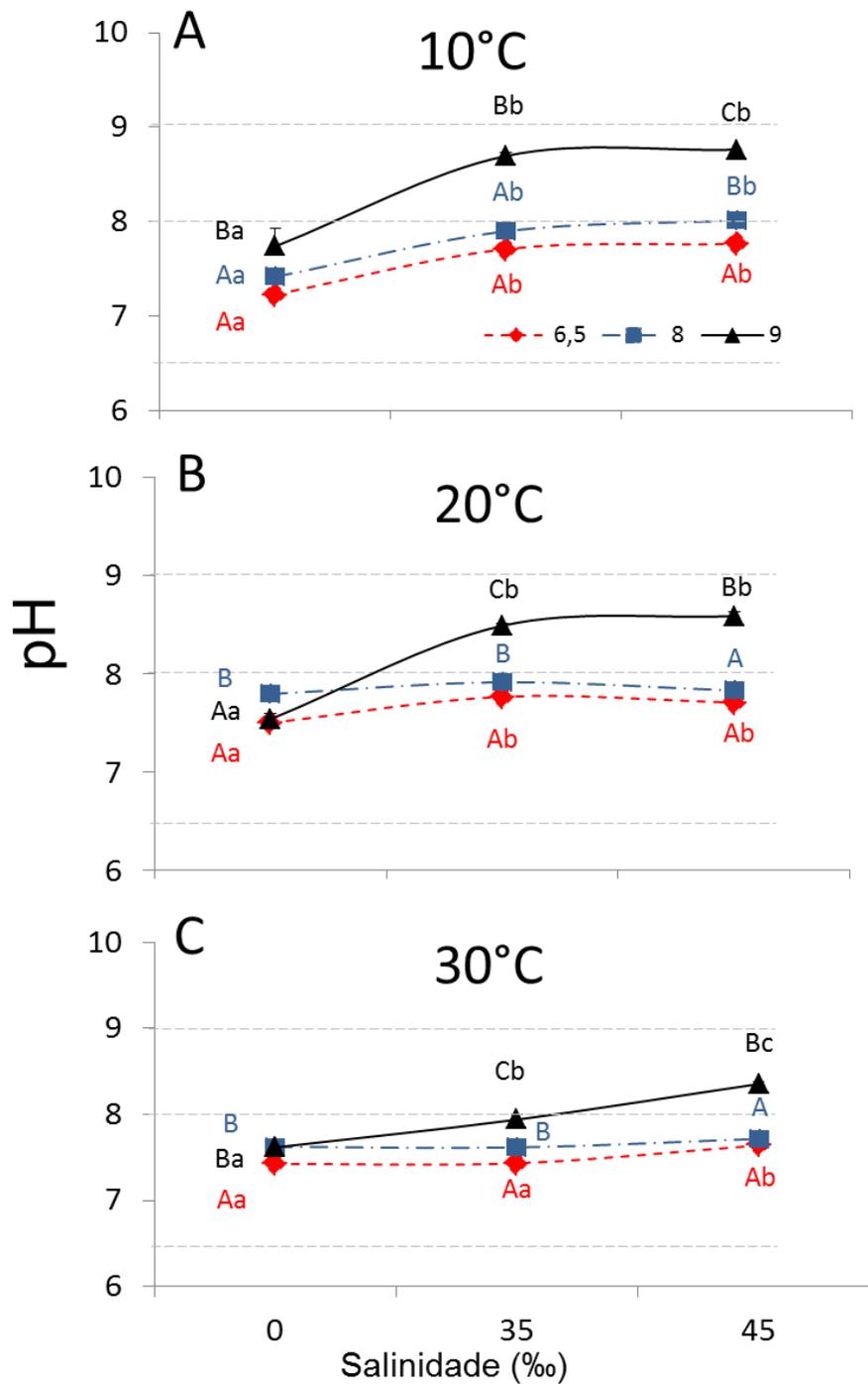


Figura 1.12. Valor do pH na água dos aquários após os experimentos para a espécie *P. perna*, nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C); losango indica o pH 6,5, quadrado o pH 8 e triângulo o pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade. Linhas cinza indicam os valores medidos no início dos experimentos, $P < 0,05$.

Variação nos experimentos com *C. gigas*

EFEITO DA SALINIDADE

Nas leituras finais dos experimentos com *C. gigas* (Fig. 1.13). Na temperatura de 10°C para os pHs 6,5 e 8 foi estável para as salinidades 0 e 35 e maior na salinidade 45. Para o pH 9 as leituras aumentaram sucessivamente conforme a concentração do meio. Para as temperaturas de 20 e 30°C os pHs apresentaram o mesmo padrão. O pH 6,5 não variou nas salinidades 0 e 35 e foi maior na salinidade 45. O pH 8 na foi menor na salinidade 0 do que nas demais salinidades. Para o pH 9 as leituras cresceram progressivamente iniciando na salinidade 0.

EFEITO DO pH

Nas leituras finais dos experimentos com a ostra *C. gigas* na temperatura de 10°C para a salinidade 0 apresentou valores estáveis para os pHs 6,5 e 9 e valor maior no pH 8. Na salinidade 35 as leituras aumentaram progressivamente começando no pH 6,5. Na salinidade 45 as leituras dos pHs 6,5 e 8 não foram diferentes, sendo o valor maior no pH 9. Na temperatura de 20°C nas salinidades 0 e 45 as leituras de pH mostraram que os valores nos pHs 6,5 e 8 foram constantes e que dos pHs 9 foram maiores. Na salinidade 35 as leituras aumentaram progressivamente a partir do pH 6,5. Para a temperatura de 30°C nas salinidades 35 e 45 as leituras do pH final apresentaram valores que aumentaram sucessivamente iniciando no pH 6,5.

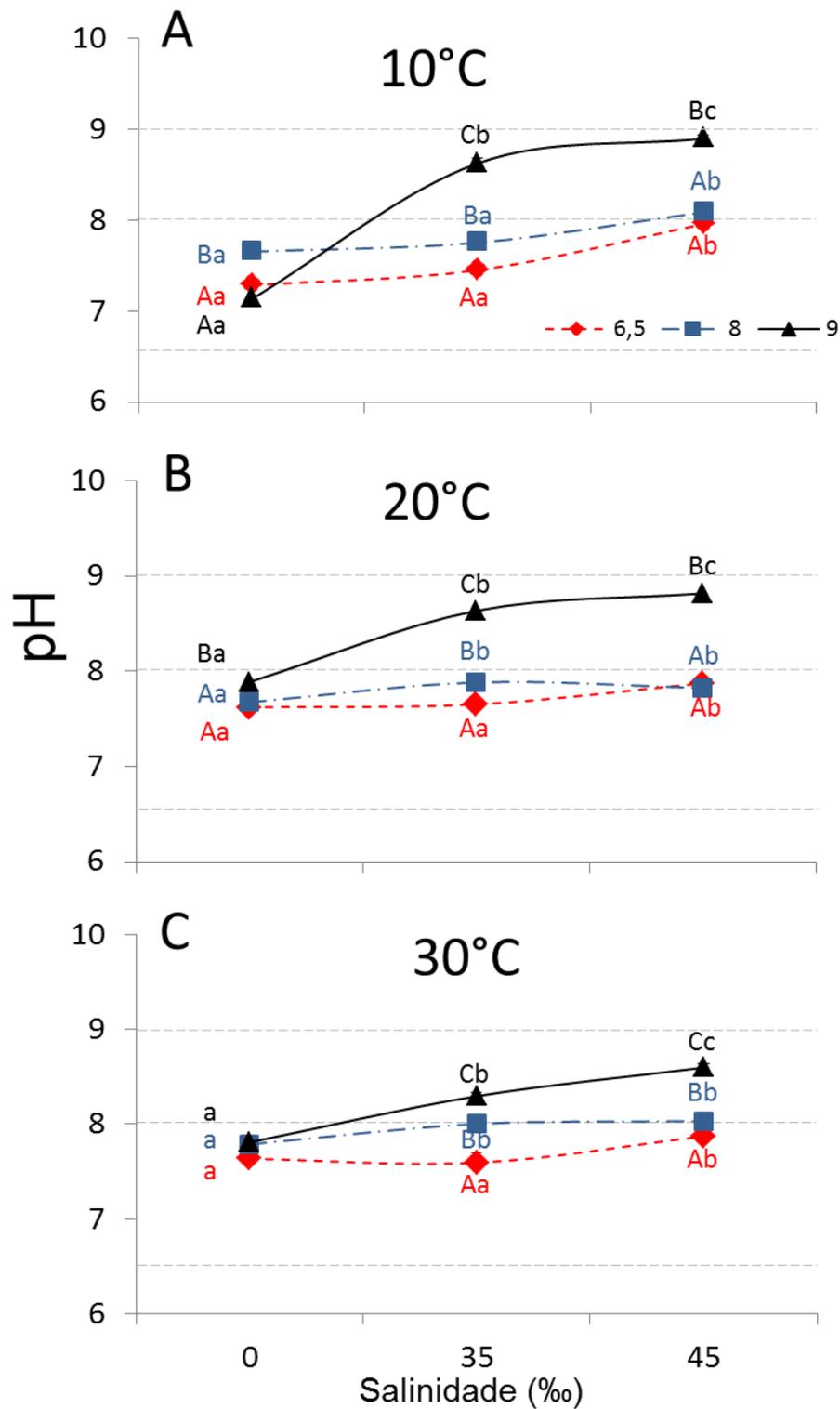


Figura 1.13. Valor do pH na água dos aquários após os experimentos para a espécie *C. gigas*, nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B) e 30°C (C); losango indica o pH 6,5, quadrado o pH 8 e triângulo o pH 9. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas no mesmo pH nas 3 salinidades; letras maiúsculas indicam diferenças entre os 3 pHs na mesma salinidade. Linhas cinza indicam os valores medidos no início dos experimentos, $P < 0,05$.

Comparação entre fluidos da cav. do manto e do aquário

As concentrações osmótica e iônicas de amostras da água dos aquários e da água da cavidade do manto foram medidas, para avaliação do estado aberto ou fechado da concha dos indivíduos das duas espécies. Quando os animais de ambas as espécies foram expostos a salinidade 0, as concentrações da água do aquário foram sempre próximos de 0, já o líquido contido na cavidade do manto apresentava concentração semelhante à da hemolinfa dos moluscos. Nas salinidades 35 e 45 os valores de concentração dos 2 líquidos foram semelhantes.

Tabela 1.2. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) na água dos aquários experimentais (valores antes das barras) e na água retida no interior da cavidade do manto (após as barras).

Temperatura	pH	<i>Perna perna</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
		Salinidade (psu)			Salinidade (psu)		
		0	35	45	0	35	45
10°C	6,5	9 / 916	994 / 966	1241 / 1220	11/937	977/986	1252/1009
	8	9 / 963	974 / 924	1245 / 1231	6/825	975/979	1257/1015
	9	8 / 953	971 / 961	1258 / 1226	1/859	988/982	1252/1012
20°C	6,5	23 / 865	970 / 955	1259 / 1259	6/1001	851/921	1230/996
	8	11 / 950	970 / 973	1253 / 1224	5/893	782/943	1205/1225
	9	32 / 888	961 / 975	1238 / 1242	4/916	944/893	1250/1004
30°C	6,5	20 / 916	958 / 943	1247 / 1243	27/754	995/997	1292/1289
	8	20 / 867	980 / 965	1258 / 1261	18/920	964/971	1267/1028
	9	16 / 968	964 / 977	1256 / 1239	31/641	816/986	1293/1289

Obs.: ao término dos experimentos as amostras foram coletadas aleatória e independentemente de um aquário e de um indivíduo por condição experimental. Válido para todas as tabelas.

Tabela 1.3. Concentração de cloreto (mM) na água dos aquários experimentais (valores antes das barras) e na água contida no interior da cavidade do manto (após as barras).

Temperatura	pH	<i>Perna perna</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
		Salinidade (psu)			Salinidade (psu)		
		0	35	45	0	35	45
10°C	6,5	0 / 398	643 / 646	660 / 640	2 / 413	507 / 542	551 / 541
	8	0 / 496	500 / 498	713 / 753	11 / 429	480 / 496	675 / 526
	9	0 / 653	544 / 570	642 / 668	9 / 453	543 / 484	698 / 485
20°C	6,5	0 / 439	522 / 553	689 / 712	20 / 492	517 / 476	515 / 519
	8	0 / 508	549 / 558	736 / 849	21 / 479	389 / 560	552 / 551
	9	0 / 516	542 / 518	721 / 736	2 / 448	476 / 440	555 / 454
30°C	6,5	9 / 487	644 / 506	696 / 733	16 / 395	516 / 507	693 / 691
	8	18 / 473	533 / 546	609 / 653	14 / 483	506 / 488	641 / 514
	9	0 / 376	514 / 553	514 / 518	6 / 322	514 / 549	678 / 649

Tabela 1.4. Concentração de sódio (mM) na água dos aquários experimentais (valores antes das barras) e na água contida no interior da cavidade do manto (após as barras).

Temperatura	pH	<i>Perna perna</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
		Salinidade (psu)			Salinidade (psu)		
		0	35	45	0	35	45
10°C	6,5	0 / 328	486 / 436	580 / 554	8 / 404	534 / 506	680 / 554
	8	4 / 470	466 / 424	530 / 566	0 / 406	524 / 530	596 / 516
	9	6 / 456	480 / 444	602 / 576	0 / 418	562 / 528	554 / 462
20°C	6,5	0 / 470	476 / 486	614 / 612	6 / 496	456 / 470	576 / 560
	8	0 / 478	476 / 490	572 / 610	0 / 434	368 / 432	554 / 576
	9	0 / 470	468 / 490	592 / 576	0 / 460	458 / 416	561 / 530
30°C	6,5	0 / 486	472 / 462	574 / 574	4 / 394	538 / 542	610 / 586
	8	0 / 486	458 / 472	566 / 578	4 / 348	516 / 510	604 / 492
	9	0 / 446	448 / 438	590 / 590	10 / 352	502 / 518	698 / 644

Tabela 1.5. Concentração de potássio (mM) na água dos aquários experimentais (valores antes das barras) e na água contida no interior da cavidade do manto (após as barras).

Temperatura	pH	<i>Perna perna</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
		Salinidade (psu)			Salinidade (psu)		
		0	35	45	0	35	45
10°C	6,5	0 / 10	11 / 9,5	16 / 15	0,5 / 11,5	13,5 / 15	17,5 / 16
	8	0 / 17,5	12 / 10,5	13,5 / 14,5	0 / 11	16,5 / 17,5	17,5 / 16,5
	9	0 / 12,5	12 / 12	15,5 / 13,5	0 / 10,5	15,5 / 17	14,5 / 12,5
20°C	6,5	0 / 18,5	13 / 17	14,5 / 15,5	0,5 / 14,5	11 / 12	14,5 / 14,5
	8	0 / 18,5	13 / 15,5	13 / 15	0 / 12	10 / 11	13 / 13,5
	9	0 / 18,5	12,5 / 13	14,5 / 14	0 / 12,5	11 / 10,5	12 / 11,5
30°C	6,5	0 / 14	14 / 13,5	15 / 15,5	0 / 14	14 / 13,5	15 / 15,5
	8	0 / 9,5	12,5 / 12	15 / 15,5	0 / 9,5	12,5 / 12	15 / 15,5
	9	0 / 10,5	13 / 13	14 / 10,5	0 / 10,5	13 / 13	16,5 / 15,5

Tabela 1.6. Concentração de magnésio (mM) na água dos aquários experimentais (valores antes das barras) e na água contida no interior da cavidade do manto (após as barras).

Temperatura	pH	<i>Perna perna</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
		Salinidade (psu)			Salinidade (psu)		
		0	35	45	0	35	45
10°C	6,5	0 / 29,7	47,6 / 50,5	59,3 / 58,9	0 / 40,4	47,6 / 43,9	56,6 / 49,7
	8	0 / 56	47,3 / 44	58,2 / 57,7	0 / 41,8	42,6 / 41	53,6 / 44,2
	9	0 / 51,7	43,9 / 39,6	59,9 / 59,5	0 / 50	46,5 / 48,8	61,5 / 48
20°C	6,5	0 / 38,9	33,8 / 46,8	62,6 / 57,1	0 / 38	32,1 / 34,1	51,5 / 46,6
	8	0 / 48,5	47,2 / 47,6	52,6 / 55,5	0 / 42,8	38,4 / 40,8	56,3 / 59
	9	0 / 42,1	52,1 / 54,5	56,6 / 55,2	0 / 43,5	53,3 / 45,8	62,5 / 56,1
30°C	6,5	0 / 49,5	49,6 / 49,2	62,6 / 61,1	0 / 30,7	41,5 / 27,1	61 / 60,5
	8	0 / 39,2	43 / 50,9	45,7 / 46,8	0 / 27,1	40 / 40,1	59,7 / 47,4
	9	0 / 43	46 / 43,1	53,8 / 60,5	0 / 43	47,5 / 45,9	62,7 / 68,6

Discussão

Na maioria das condições experimentais *in vivo* as espécies apresentaram respostas fisiológicas semelhantes. Na salinidade 0 a concentração osmótica da hemolinfa manteve-se semelhante ao controle e na salinidade 45 houve concentração da mesma. Os resultados de TH apresentaram resultados condizentes com as dosagens osmo-iônicas. Diferentemente, os experimentos *in vitro* mostraram que *P. perna* tem maior capacidade de regulação de volume do que *C. gigas*.

Experimentos in vivo

Salinidade

Para determinar as respostas fisiológicas à variação de fatores abióticos dos bivalves avaliados foram mensuradas a osmolalidade e as concentrações iônicas da hemolinfa, além do teor hídrico dos tecidos. A osmolalidade é a quantificação de partículas osmoticamente ativas por quilograma de água (Péqueux, 1995; Charmantier, 1998). A manutenção do teor hídrico constante é sinal de que as funções de regulação de volume celular operam satisfatoriamente (Lang, 1987; 2007), alterações nestes valores indicam que o fluxo iônico e de água na célula está desequilibrado, o que é causado pela superação da capacidade celular de equilibrar seu volume.

Os resultados do TH normalmente são inversos aos encontrados nas leituras de osmolalidade, quando são comparadas condições hipo e hiperosmóticas, visto que quando os tecidos são expostos a soluções diluídas (hiposmóticas), como na salinidade 0 deste trabalho, a água tende a entrar nas

células em função da diferença de concentração entre os compartimentos, o que diminui a osmolalidade e aumenta o TH tecidual. O oposto ocorre em condições onde a água é mais concentrada (hiperosmótica), como na salinidade 45 deste trabalho. A água tende a sair do interior das células, o que aumenta a osmolalidade e diminui o TH tecidual (Chamberlin & Strange, 1989, Lang *et al.*, 1998).

Os íons sódio e cloreto são os principais componentes do valor total da osmolalidade da água do mar e do fluido extracelular ou hemolinfa (Prosser, 1973), mudanças em suas concentrações na hemolinfa, assim como nas determinações de osmolalidade, indicam alterações nas respostas osmorregulatórias. O íon potássio está presente principalmente no interior das células e o aumento de sua concentração na hemolinfa acusa o extravasamento do conteúdo celular (lise) para o meio extracelular (Horisberger *et al.*, 1991; Jorgensen *et al.*, 2003). O íon magnésio está envolvido em diversas reações do metabolismo celular e suas concentrações em organismos saudáveis são mantidas extremamente estáveis (Grubbs *et al.*, 1989; Saris *et al.*, 2000). Variações em suas quantidades indicam prejuízo às funções celulares.

Os bivalves avaliados são animais osmoconformadores, nos quais a concentração osmótica dos fluidos internos é semelhante à da água circundante (Pierce & Greenberg, 1973; Pierce, 1982; Deaton, 2008). Porém, a proporção entre os componentes da hemolinfa e os da água do mar é diferente. Logo, seria compreensível se as concentrações osmo-iônicas diminuíssem significativamente na salinidade 0 e aumentassem na salinidade 45, quando comparadas com o controle em salinidade 35. Esta condição é encontrada em

diversos animais osmoconformadores marinhos, como equinodermos (Santos *et al.*, 2013), muitos crustáceos (Freire *et al.*, 2008a,b; Foster *et al.*, 2010; Romano & Zeng, 2012) e cnidários (Amado *et al.*, 2011). Entretanto se for analisada a característica distintiva da classe, a presença das duas valvas, as respostas dos bivalves aos experimentos são facilmente compreendidas. Em condições adequadas ou toleráveis, representadas pelos experimentos nas salinidades 35 e 45, mesmo que com algum custo energético, as valvas permanecem abertas, o que permite que o animal continue se alimentando. Porém quando o meio é muito estressante as conchas isolam fisicamente o animal do meio, diminuindo os impactos das alterações ambientais. Na salinidade 45 associada às demais variáveis foi observado que ambas as espécies liberaram maior volume de muco do que nas demais condições (valores não mensurados). Esta reação provavelmente indica que os animais estavam próximos de seu limite superior de tolerância à salinidade. O aumento na secreção de muco também é considerado um mecanismo de proteção adaptativo a condições ambientais estressantes (Shephard, 1994; Davies & Hawkins, 1998). Tal resposta pode ser observada em peixes expostos a choques osmóticos (Souza-Bastos e Freire, 2009; Riuo *et al.*, 2012), em cnidários expostos à dessecação (Amado *et al.*, 2011) e em crustáceos expostos a ambientes contaminados por cádmio (Barbieri & Paes, 2011).

Na salinidade 45 os animais permaneceram com as conchas abertas e produziram uma quantidade de muco maior do que a normal, provavelmente em função da exposição súbita à alta salinidade, mas esta condição é menos agressiva do que a água doce, onde os animais permanecem com as conchas fechadas. A afirmação de que na salinidade 0 os animais são isolados do

ambiente pelas conchas, assim como a de que os bivalves permanecem com as valvas abertas na salinidade 45 são confirmados pelos resultados apresentados nas tabelas 2 a 6. Estas tabelas apresentam os resultados das dosagens de osmolalidade e iônicas (Cl, Na, Mg e K) entre a água do aquário e a água retida na cavidade da concha. Cabe ressaltar que o líquido contido inicialmente na cavidade do manto era a água do aquário estoque onde os animais foram aclimatados. Assim como faz o molusco *Nucella lapillus*, que durante períodos de dessecação, ou seja, de exposição a estresse ambiental, a espécie também retém água na cavidade do manto (Boyle *et al.*, 1979). Resposta semelhante é encontrada em crustáceos cirripédios (Chan *et al.*, 2001). Do mesmo modo, animais osmorreguladores possuem órgãos especializados, como brânquias e porções do tubo digestório, que os auxiliam a ajustar a concentração osmótica de seus fluidos internos, os quais possibilitam que eles enfrentem as variações ambientais até certo limite. Deste modo, estes metazoários podem ser caracterizados como “osmorreguladores temporários”, “estenorreguladores” ou “pseudorreguladores”, pois com algumas limitações, do mesmo modo que ocorrem com osmorreguladores “verdadeiros”, estes animais conseguem manter estáveis as concentrações osmo-iônicas de seus fluidos diante de variações ambientais de salinidade.

Os bivalves avaliados neste trabalho permaneceram longos períodos encerrados em suas conchas. A conformação do pigmento respiratório é um dos fatores que permite que tolerem esta condição. Em muitos bivalves a proteína que desempenha este papel é a hemoglobina, o mesmo pigmento dos vertebrados. Todavia, nos bivalves esta proteína tem maior afinidade pelo oxigênio do que, por exemplo, na espécie humana, e isto colabora com a

permanência das conchas fechadas por longos períodos (Van den Thillart *et al.*, 1992; Schmidt-Nielsen, 2002). Como os pigmentos respiratórios encontrados nos mexilhões da espécie *M. edulis*, que toleraram períodos de até 72h de exposição ao ar, nos quais permanecem com as conchas fechadas, apresentando taxas moderadas de mortalidade (Brenner *et al.*, 2012). A espécie *Licina pectinata* que habita locais com grande concentração de sulfetos é caracterizada pela grande quantidade de hemoglobina, além da associação com bactérias o que aumenta ainda mais sua capacidade de absorver oxigênio (Frenkiel *et al.*, 1996).

Os resultados de TH não apresentaram diferenças entre as espécies na maioria das condições em virtude de um erro metodológico, ocorrido na escolha de tecidos diferentes (Fig. 1.4). Embora não se aplique neste caso, normalmente as diferenças entre os THs das condições experimentais não são muito amplas. Esta afirmação é amparada por resultados de estudos realizados com anuros (Wu & Kan, 2009), peixes (Bath & Eddy, 1979; Jensen *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2012) crustáceos (Amado *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2012), cnidários (Kasschau *et al.*, 1984) e de outros bivalves (Graney & Giesy, 1988; Ngo *et al.*, 2011). Embora seja indevida a comparação entre as espécies, estes dados amparam os dados que indicam diferenças nas respostas entre tecidos distintos (Figs. 11 a 13)

pH

Dos parâmetros testados, o pH mostrou menor influência sobre as respostas fisiológicas dos bivalves avaliados. Este fato não indica que a variação deste fator ambiental é pouco importante para a fisiologia dos animais.

Na verdade, é justamente o contrário, grande parte das reações celulares/fisiológicas dos seres vivos, sendo muitas delas essenciais para a manutenção da vida, dependem de um pH ótimo para que aconteçam (Schmidt-Nielsen, 2002; Willmer *et al.*, 2005). No ambiente marinho as alterações nos valores de pH são muito menores do que as testadas neste trabalho. Mesmo previsões mais pessimistas estimam que até o final do século a queda do pH oceânico seja entre 0,14 a 0,35 (IPCC, 2007). Os valores aqui avaliados propositalmente excedem amplamente as previsões de acidificação oceânica. A escolha se deu em função de dois motivos: o curto tempo de experimentação ao qual foram expostos os animais (6h); a resposta fisiológica dos animais à acidificação de sua hemolinfa. Bivalves expostos ao ar fecham suas conchas e baixam suas taxas metabólicas, entrando em metabolismo anaeróbio, o que acidifica seus organismos (De Vooy & De Zwaan, 1978; Schmidt-Nielsen, 2002; Willmer *et al.*, 2005). Em condições de acidose estes moluscos utilizam o carbonato de cálcio previamente depositado na concha para tamponar a hemolinfa, buscando restabelecer o equilíbrio ácido-base (Dugal, 1939; De Zwaan *et al.*, 1975; Dwyer III & Burnett, 1996). Mesmo mexilhões azuis *M. edulis* criados em cultivos submersos, que nunca tiveram contato prévio com o ar apresentaram reações semelhantes a de animais de bancos naturais expostos ao ar duas vezes por dia (Brenner *et al.*, 2012). Os bivalves avaliados em nossos experimentos de alteração de pH na maioria das condições, também mantiveram estáveis as concentrações mensuradas dentro da mesma salinidade independente do pH avaliado. Provavelmente os resultados seriam menos constantes diante de experimentos com maior tempo de duração. O que foi obtido em experimentos com duração de 12 dias

realizados com o bivalve de água doce *Anodonta cygnea*, a variação de pH aplicada também foi maior (pHs 3 - 6,7 - 11), neste estudo ambas as alterações de pH provocaram aumento das taxas metabólicas e utilização do CaCO_3 contido na hemolinfa para neutralizar o pH (Machado *et al.*, 1988). Entretanto a base mais robusta de discussão é encontrada no trabalho de Ewald e colaboradores (2009), que só encontraram alterações significativas no gastrópodo *Elimina flava* em experimentos com pH 4 e 72h de duração. Cabe salientar que o isolamento do ambiente de gastrópodos normalmente é menos eficiente que de bivalves.

Temperatura

O padrão de resposta das espécies às alterações de temperatura foi semelhante na maioria dos tratamentos. Na maioria das condições hiperosmóticas a concentração da hemolinfa aumentou. Porém na temperatura de 10°C *C. gigas* manteve estáveis as concentrações da hemolinfa. Certamente este resultado está relacionado à origem da espécie no Mar do Japão, região de clima subtropical a temperado (Cognie *et al.*, 2006). A tolerância a baixas temperaturas facilitou a introdução da espécie em diversas regiões temperadas na Europa (Grizel & Héral, 1991; Diederich, 2005; 2006) e na América do Norte (Boom *et al.*, 1994; Barton *et al.*, 2012).

A homeostasia na concentração osmótica da hemolinfa mantida na temperatura de 10°C, seguida da redução de gradientes com a água do entorno em maiores temperaturas pode indicar, que para *C. gigas*, a menor temperatura testada pode estar mais relacionada com a temperatura ótima para a realização das funções metabólicas da espécie (Gosling, 2003; Willmer

et al., 2005). Outros bivalves de águas frias como *Laternula elliptica* quando são expostos a temperaturas mais elevadas aumentam suas taxas respiratórias (Peck *et al.*, 2002). Por outro lado, embora a espécie seja oriunda de águas frias, a atividade reprodutiva é concentrada nos meses mais quentes (Ruiz *et al.*, 1992). Ocorrendo em laboratório menor maturação de seus oócitos na temperatura de 16°C do que a 22°C (Chávez-Villalba *et al.*, 2002). Como a temperatura exerce papel preponderante na fisiologia animal, a resposta diferenciada encontrada na temperatura de 10°C em *C. gigas* pode ser relacionada à sua origem geográfica. Em *P. perna* não foram encontradas alterações no padrão de resposta em todas as temperaturas avaliadas. Independente da temperatura *P. perna* apresentou o mesmo padrão de resposta às variações impostas. Esta resposta é semelhante a apresentada por animais euritérmicos, ou seja, animais que conseguem tolerar uma ampla faixa de variação térmica e mantem seu metabolismo com poucas alterações (Van Dijk *et al.*, 1999; Willmer *et al.*, 2005). O gastrópodo *Littorina saxatilis* é um molusco extremamente euritérmico. A espécie tolera uma variação de temperatura de 0 a 32°C, porém o animal apresenta picos de consumo de oxigênio nas condições mais extremas (Sokolova & Pörtner, 2003). A tolerância das espécies a grande amplitude de variação térmica depende de uma série de mecanismos fisiológicos, como a presença de enzimas de estresse térmico (HSPs), proteínas estruturais flexíveis, manutenção da fluidez das membranas, etc., (Pörtner *et al.*, 2007). Na verdade as duas espécies de bivalves resistiram à variação de temperatura imposta, contudo apenas *P. perna* manteve o mesmo padrão de resposta diante de todas as condições experimentais.

Experimentos “in vitro”

Neste procedimento foram testados dois tipos de tecidos. O tecido muscular envolvido com o fechamento das conchas, com células próximas e robustas (Kier, 1988), o que explica a pouca suscetibilidade a alterações provocadas pela exposição às salinas controle e experimentais. Outro tipo de tecido avaliado neste experimento foi o do manto. Este sim, com uma consistência mais flexível, além do que, está diretamente relacionado com as trocas osmóticas no corpo dos bivalves (Deaton *et al.*, 1989). O tecido do manto mostrou variações de volume compatíveis com as exposições que foram impostas. Os fragmentos teciduais expostos às salinas hiposmóticas apresentaram-se com peso acima do controle, e estes mais pesados do que os cortes expostos à salina hiperosmótica. O que indica resposta de regulação de volume apresentada por moluscos (Pierce & Greenberg, 1973; Silva & Wright, 1994; Deaton, 2001). Entretanto observou-se queda no peso da maioria das condições experimentais. A diminuição no peso dos fragmentos pode ser explicada pela liberação de muco dos tecidos expostos. Isto ocorreu mesmo na salina controle a qual não deveria representar um desafio para os tecidos. Porém a maior liberação de muco ocorreu na salina hiperosmótica. A liberação de muco em condições estressantes é um mecanismo conhecido em moluscos (Davies & Hawkins, 1998). Esta resposta a condições adversas também é encontrada em grupos distintos como cnidários (Amado *et al.*, 2011) e peixes (Shephard, 1994; Souza-Bastos & Freire, 2009). A liberação deste material orgânico pode explicar a queda no peso dos fragmentos, inclusive na condição controle.

Conclusões

Dentre os parâmetros avaliados, a variação do pH foi o que causou menores variações nas concentrações osmo-iônicas dos bivalves. O tempo de exposição relativamente curto provavelmente foi responsável por esta resposta. Outro aspecto que pode ter causado estes resultados, pode ser a variação do pH da água durante os experimentos (Figs. 14 e 15). Futuros experimentos talvez devam utilizar tempos maiores ou usar um artefato que mantenha as conchas abertas, o que ira potencializar os efeitos do experimento. Além de usar um meio de manter o pH estável.

A salinidade 0 foi a condição que se mostrou mais prejudicial aos animais, que sequer abriram as valvas nesta condição. Fato que foi comprovado pelas dosagens osmo-iônicas da água retida na cavidade do manto (Tab. 2 a 5). Na salinidade 45, embora a concentração da hemolinfa tenha aumentado, com relação ao controle, os animais permaneceram com as conchas abertas. Esta concentração do meio mostrou-se estressante, identificada pela liberação mais abundante do que na condição controle.

A temperatura de 10°C (Fig. 1.3D) mostrou um dado interessante, a manutenção das concentrações da hemolinfa por *C. gigas*. A espécie oriunda de águas mais frias manteve a estabilidade fisiológica nesta condição. Esta resposta cria duas possibilidades: 1° a espécie não tolera baixas temperaturas, independente de sua origem de águas temperadas, e fechou as conchas como no ensaio com salinidade 0; ou 2° a ostra possui mecanismos que permitem que nesta temperatura ela mantenha estável a concentração de sua hemolinfa. Esta dúvida é reduzida pelos resultados apresentados pelos ensaios *in vitro* (Figs. 11, 12 e 13). Os resultados indicam que a capacidade de regulação de

hidratação de tecidual de *C. gigas* é menor do que a de *P. perna*. Isto ajudaria a explicar os resultados se a espécie com melhor manutenção da concentração da hemolinfa fosse *P. perna*. Novas pesquisas que busquem decifrar a resposta de *C. gigas* em 10°C poderiam responder a este questionamento.

Referências

- Abessa, D.M.S., Zaroni, L.P., Sousa, E.C.P.M., *et al.*, 2005. Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (2): 217-225
- Agudo-Padrón, A.I., 2011a. Mollusca and environmental conservation in Santa Catarina State (SC, Southern Brazil): current situation. *Biodiversity Journal*, 2 (1): 3-8
- Agudo-Padrón, A.I., 2011b. Exotic molluscs (Mollusca, Gastropoda et Bivalvia) in Santa Catarina State, Southern Brazil region: check list and regional spatial distribution. *Biodiversity Journal*, 2 (2): 53-58
- Allen Jr., S.K. & Gaffney, P.M., 1993. Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). *Aquaculture* 113: 291–300
- Allen Jr., S.K., Gaffney, P.M., Scarpa, J. & Bushek, D., 1993. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 113: 269-289
- Amado, E.M., Freire, C.A. & Souza, M.M., 2006. Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquatic toxicology*, 79(1): 1-8

- Amado, E.M., Vidolin, D., Freire, C.A. & Souza, M.M., 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 158 (4): 542-551
- Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C. & Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research* 50: 411-416
- Barbieri, E. & Paes, E.T., 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere*, 84 (1): 9-16
- Barton, A., Hales, B., Waldbusser, G.G., *et al.*, 2012. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, shows negative correlation to naturally elevated carbon dioxide levels: Implications for near-term ocean acidification effects. *Limnology Oceanography*, 57 (3): 698-710
- Bath, R.N. & Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *The Journal of Experimental Biology*, 83(1): 193-202
- Beiras, R. & His, E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Marine Pollution Bulletin*, 30: 47-49

- Bhat, B. A., Elanchezhiyan, C., Ravichandran, S., *et al.*, 2012. Neuroendocrine Control of Water Content and Calcium Concentration in the Crab *Ocypode macrocera* (H. Milne-Edwards 1852)(Brachyura, Ocypodae). Pakistan Journal of Biological Sciences, 15: 296-300
- Bibby, R., Widdicombe, S., Parry, H., Spicer, J. & Pipe, R., 2008. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquatic Biology, 2: 67-74
- Boom, J.D.G., Boulding, E.G. & Beckenbach, A.T., 1994. Mitochondrial dna variation in introduced populations of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in british columbia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51(7), 1608-1614.
- Borghetti, J.R. & Silva, U.A.T., 2008. Principais sistemas produtivos empregados comercialmente. In: Ostrensky, *et al.* Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/FAO, 73-94.
- Borghetti, N.R.B., Ostrensky, A. & Borghetti, J.R., 2003. Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Curitiba, 129 pp
- Boscardin, N.R., 2008. A produção aqüícola brasileira. In: Ostrensky, A. *et al.* Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/FAO, 27-72
- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene, 329: 147-157

- Boyle, P.R., Sillar, M. & Bryceson, K., 1979. Water balance and the mantle cavity fluid of *Nucella lapillus* (L.)(Mollusca: Prosobranchia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40 (1): 41-51
- Brenner, M., Broeg, K., Wilhelm, C., Buchholz, C. & Köhler, A., 2011. Effect of air exposure on lysosomal tissues of *Mytilus edulis* L. from natural intertidal wild beds and submerged culture ropes. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 161: 327-336
- Callapez, P.M., Danielsen, R. & Castilho, A., 2012. Occurrences of the amphiatlantic brown mussel *Perna perna* (Linné, 1758)(Mollusca, Bivalvia) in South Portugal since the Atlantic “climatic optimum”. *Estudos do Quaternário/Quaternary Studies*, 1(8): 13-21
- Castilho, G.G., Pereira, L.Â. & Pie, M.R., 2007. Aqüicultura, segurança alimentar, sanidade e meio ambiente. Em: Ostrensky, A. *et al.* Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/FAO, 183-208
- Chamberlin, M.E. & Strange, K., 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 257: 159-173
- Chan, B.K.K., Morritt, D. & Williams, G.A., 2001. The effect of salinity and recruitment on the distribution of *Tetraclita squamosa* and *Tetraclita japonica* (Cirripedia; Balanomorpha) in Hong Kong. *Marine Biology*, 138 (5): 999-1009

- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., *et al.*, 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214 (1): 115-130
- Claremont, M., Williams, S.T., Barraclough, T.G., & Reid, D.G., 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38 (6): 1016-1032
- Cognie, B., Haure, J., & Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 259 (1): 249-259
- Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., *et al.*, 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environmental Pollution* 168: 145-150
- Cuddington, K. & Hastings, A., 2004. Invasive engineers. *Ecological Modelling* 178: 335-347
- Dafre, A.L., Medeiros, I.D., Müller, I.C., Ventura, E.C. & Bainy, A.C.D., 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chemico-Biological Interactions* 149 (2-3): 97-105
- Davies, M.S., & Hawkins, J., 1998. Mucus from marine molluscs. *Advances in Marine Biology*, 34: 1-71

- De Vooy, C.G.N. & De Zwaan, A., 1978. The rate of oxygen consumption and ammonia excretion by *Mytilus edulis* after various periods of exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 60 (3): 343-347
- De Zwaan, A., Holwerda, D.A. & Addink, A.D., 1975. The influence of divalent cations on allosteric behaviour of muscle pyruvate kinase from the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 52 (4): 469-472
- Diederich, S., 2005. Differential recruitment of introduced Pacific oysters and native mussels at the North Sea coast: coexistence possible? *Journal of Sea Research* 53: 269- 281
- Diederich, S., 2006. High survival and growth rates of introduced Pacific oysters may cause restrictions on habitat use by native mussels in the Wadden Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328: 211-227
- Dugal, L.P., 1939. The use of calcareous shell to buffer the product of anaerobic glycolysis in *Venus mercenaria*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 13 (2): 235-251
- Dumbauld, B.R., Ruesink, J.L. & Rumrill, S.S., 2009. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*, 290 (3): 196-223
- Dwyer III, J.J. & Burnett, L.E., 1996. Acid-base status of the oyster *Crassostrea virginica* in response to air exposure and to infections by *Perkinsus marinus*. *The Biological Bulletin*, 190 (1): 139-147

- Ewald, M.L., Feminella, J.W., Lenertz, K.K. & Henry, R.P., 2009. Acute physiological responses of the freshwater snail *Elimia flava* (Mollusca: Pleuroceridae) to environmental pH and Calcium. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 150 (2): 237-245
- Ezgeta-Balić, D., Rinaldi, A., Peharda, M., *et al.*, 2011. An energy budget for the subtidal bivalve *Modiolus barbatus* (Mollusca) at different temperatures. *Marine Environmental Research*, 71 (1): 79-85
- Fernandes, F.C., Souza, R.C.C.L., Junqueira, A.O.R., Rapagnã, L.C. & Breves-Ramos, A., 2008. Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. In: Resgalla Jr., C., Weber, L.I. & Conceição, M.B. (eds.). *O Mexilhão Perna perna* (L.): Biologia, Ecologia e Aplicações. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 25-30
- Ferreira, R.P. & Salomão, L.C., 2000. The ionic basis of cardiac activity in the bivalve mollusk *Perna perna*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 249: 1-12
- Ferreira, J.G., Hawkins, A.J.S. & Bricker, S.B., 2011. The role of shellfish farms in provision of ecosystem goods and services. In: Shumway, S., *Shellfish Aquaculture and the Environment*. Wiley-Blackwell, Oxford, 3-31
- Foster, C., Amado, E.M., Souza, M.M. & Freire, C.A., 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology A*, 313 (2): 80-94

- Frenkiel, L., Gros, O., & Mouëza, M., 1996. Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Marine Biology*, 125 (3): 511-524
- Galil, B.S., 2000. A sea under siege – alien species in the Mediterranean. *Biological Invasions* 2: 177-186
- Gazeau, F.P.H., Gattuso, J.A., Dawber, C., *et al.*, 2010. Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences*, 7: 2051-2060
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., Seaman, M.N.L. & Garrigues, P., 2002. Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects upon embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2310-2318
- Graney, R.L. & Giesy, J.P., 1988. Alterations in the oxygen consumption, condition index and concentration of free amino acids in *Corbicula fluminea*, (mollusca: Pelecypoda) exposed to sodium dodecyl sulfate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7 (4): 301-315
- Greenberg, A.E., 1956. Survival of enteric organisms in sea water. A review of the literature. *Public Health Reports*, 71 (1): 77-86
- Grizel, H. & Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science*, 47 (3): 399-403
- Grubbs, R.D., Snavelly, M.D., Hmiel, S.P. & Maguire, M.E., 1989. Magnesium transport in eukaryotic and prokaryotic cells using magnesium-28 ion. *Methods in Enzymology*, 173: 546-563

- Horisberger, J.D., Lemas, V., Kraehenbühl, J.P. & Rossier, B.C., 1991. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*, 53: 565-584
- IPCC, 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report*. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (Eds). IPCC, Geneva, 104 pp
- Jensen, M.K., Madsen, S.S. & Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology*, 282 (3): 290-300
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O. & Karlsh S. J. D., 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65: 817-849
- Jourmi, L.E., Amine, A., Alaoui, M.M., Lazar, S., Hmyene, A. & Antri, S.E., 2012. Assessment of water quality in coastal environments of Mohammedia applying responses of biochemical biomarkers in the brown mussel *Perna perna*. *International Journal of Computer Science Issues*, 9 (1): 505-510
- Kang, C. K., Liu, F. C., Chang, W. B. & Lee, T. H., 2012. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38 (3): 665-678

- Kasschau, M.R., Ragland, J.B., Pinkerton, S.O. & Chit, E., 1984. Time related changes in the free amino acid pool of the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*, during salinity stress. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 79 (1): 155-159
- Kier, W.M., 1988. The arrangement and function of molluscan muscle. In: *The Mollusca, Form and Function*, Trueman, E.R. & Clarke, M.R. (Eds.), Wilbur, K.M. (Ed.-in-Chief). Academic Press, New York, 11: 211-252
- Kobayashi, M., Hofmann, E.E., Powell, E.N., Klinck, J.M. & Kusaka, K., 1997. A population dynamics model for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 149: 285-321
- Kochmann, J., Buschbaum, C., Volkenborn, N. & Reise, K., 2008. Shift from native mussels to alien oysters: Differential effects of ecosystem engineers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364: 1-10
- Lang, M.A., 1987. Correlation between osmoregulation and cell volume regulation. *American Journal Physiology*, 252: R768-R773
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M, *et al.*, 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 78 (1): 247-306
- Lang, F., 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American College of Nutrition*, 26 (5): 613S-623S
- Machado, J., Coimbra, J., Sá, C. & Cardoso, I., 1988. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 91 (4): 645-651

- Matsumoto, T., Nakamura, A.M. & Takahashi, K.G., 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 145: 325-330
- Metri, R., Rocha, R.M., & Marenzi, A., 2002. Epibiosis reduction on productivity in a mussel culture of *Perna perna* (Linné, 1758). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (3): 325-331L
- Ngo, H.T.T., Gerstmann, S. & Frank, H., 2011. Subchronic effects of environment-like cadmium levels on the bivalve *Anodonta anatina* (Linnaeus 1758): II. Effects on energy reserves in relation to calcium metabolism. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93 (9): 1802-1814
- Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Cantone, G., *et al.*, 2011. Alien species along the Italian coasts: an overview. *Biological Invasions*, 13: 215-237
- Orsi, M.L. & Agostinho, A.A., 1999. Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (2): 557-560
- Peck, L.S., Pörtner, H.O., & Hardewig, I., 2002. Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(2), 123-133.
- Pessatti, M.L., Resgalla Jr., C., Reis F^o., R.W., Kuehn, J., Salomão, L.C. & Fontana, J.D., 2002. Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (mxr) mechanism in the

mussel *Perna perna* under lead influence. Brazilian Journal of Biology, 62 (4A): 651-656

Pierce, S. K., 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. Biological Bulletin, 163: 405-419

Pierce, S. K. & Greenberg, M. J., 1973. The initiation and control of free amino acid regulation of cell volume in salinity-stressed marine bivalves. Journal of Experimental Biology, 59: 435- 440

Pogoda, B., Buck, B.H. & Hagen, W., 2011. Growth performance and condition of oysters (*Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*) farmed in an offshore environment (North Sea, Germany). Aquaculture, 319: 484-492

Prosser, C.L., 1973. Comparative Animal Physiology. 3^{ed}. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 966 pp

Resgalla Jr., C., Brasil, E.S. & Salomão, L.C., 2006. Physiological rates in different classes of sizes of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) submitted to experimental laboratory conditions. Brazilian Journal of Biology, 66: 325-336

Resgalla Jr, C. & Brasil, E.S., 2011. Efeito da concentração e da qualidade do alimento nas taxas fisiológicas do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Atlântica (Rio Grande), 29 (1): 47-59

Resgalla Jr, C., Manzoni, G., Kuroshima, K.N., REIS, F. & Laitano, K.S., 2010. Variabilidade nas taxas fisiológicas do mexilhão *Perna perna* em dois sítios

de cultivo do litoral norte de Santa Catarina. Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 3 (1): 33-40

Riou, V., Ndiaye, A., Budzinski, H., *et al.*, 2012. Impact of environmental DDT concentrations on gill adaptation to increased salinity in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 156: 7-16

Romano, N. & Zeng, C., 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. Aquaculture, 334: 12-23

Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., *et al.*, 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in: El Grove, Galicia, Spain. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 155 (2): 249-262

Sá, F.S., Nalesso, R.C. & Paresque, K., 2007. Fouling organisms on *Perna perna* mussels: is it worth removing them? Brazilian Journal of Oceanography, 55 (2): 155-161

Santos, A.A., Novaes, A.L.T., Silva, F.M., Souza, R.V. & Costa, S.W., 2011. Síntese informativa da maricultura 2011. Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (Cedap) – Epagri, Florianópolis, 17 pp

Santos, I.A., Castellano, G.C. & Freire, C.A., 2013. Direct relationship between osmotic and ionic conforming behavior and tissue water regulatory capacity in echinoids. Comparative Biochemistry and Physiology A: 164: 466-476

- Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. & Lewenstam, A., 2000. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 294: 1-26
- Seubert, E.L., Gellene, A.G., Howard, M.D.A., *et al.*, 2013. Seasonal and annual dynamics of harmful algae and algal toxins revealed through weekly monitoring at two coastal ocean sites off southern California, USA. *Environmental Science and Pollution Research*, published online. DOI 10.1007/s11356-012-1420-0
- Shephard, K. L., 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4 (4): 401-429
- Shumway, S.E., 2011. Shellfish aquaculture and the environment. Wiley-Blackwell, Oxford, 507 pp
- Sokolova, I. M., & Pörtner, H. O. (2003). Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *Journal of Experimental Biology*, 206 (1): 195-207
- Souza-Bastos, L.R., & Freire, C.A., 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 289 (1): 167-174
- Souza, R.C.C.L., Fernandes, F.C. & Silva, E.P., 2004. Distribuição atual do mexilhão *Perna perna* no mundo: um caso recente de bioinvasão. In: Silva, J.S.V. & Souza, R.C.C.L. (eds.). *Água de Lastro e Bioinvasão*. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 157-172

- Souza, R.C.C.L., Lima, T.A. & Silva, E.P., 2010. Holocene molluscs from Rio de Janeiro state coast, Brazil. *Check List*, 6(2): 301-308
- Stucchi-Zucchi, A. & Salomão, L.C., 1992. Effect of osmo-ionic concentration on the compound action potential of the cerebro-visceral connective of *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 101: 109-112
- Stucchi-Zucchi, A. & Salomão, L.C., 1998. The ionic basis of membrane potentials and adaptation to hiposmotic stress in *Perna perna*, an osmoconforming mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 121: 143-148
- Tedengren, M. & Kautsky, N., 1986. Comparative study of the physiology and its probable effect on size in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from the North Sea and the northern Baltic proper. *Ophelia*, 25 (3): 147-155
- Toonen, R.J., Nakayama, T., Ogawa, T., Rossiter, A. & Delbeek, J.C., 2012. Growth of cultured giant clams (*Tridacna* spp.) in low pH, high-nutrient seawater: species-specific effects of substrate and supplemental feeding under acidification. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1 (1): 1-10
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P. & Massabuau, J.C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298: 338-345
- Van den Thillart, G., Van Lieshout, G., Storey, K., Cortesi, P., & De Zwaan, A., 1992. Influence of long-term hypoxia on the energy metabolism of the

- haemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis*: critical O₂ levels for metabolic depression. *Journal of Comparative Physiology B*, 162 (4): 297-304
- Van Dijk, P.L., Tesch, C., Hardewig, I., & Portner, H.O., 1999. Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *Journal of Experimental Biology*, 202 (24): 3611-3621
- Wagner, E., Dumbauld, B.R., Hacker, S.D., *et al.*, 2012. Density-dependent effects of an introduced oyster, *Crassostrea gigas*, on a native intertidal seagrass, *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 468: 149-160
- Wang, W.N., Wang, A.L., Chen, L., Liu, Y. & Sun, R.Y., 2002. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na⁺-K⁺ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquatic Toxicology*, 60: 75-83
- Wang, Y., Hu, M., Wong, W.H., Cheung, S.G. & Shin, P.K.S., 2011. Combined effects of dissolved oxygen and salinity on growth and body composition of juvenile green-lipped mussel *Perna viridis*. *Journal of Shellfish Research*, 30 (3): 851-857
- Ward, R.D., English, L.J., McGoldrick, D.J., *et al.*, 2000. Genetic improvement of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. *Aquaculture Research*, 31: 35-44

- Watson, S.A., Southgate, P.C., Miller, G.M., Moorhead, J.A. & Knauer, J., 2012. Ocean acidification and warming reduce juvenile survival of the fluted giant clam, *Tridacna squamosa*. *Molluscan Research*, 32: 177-180
- Willmer, P., Stone, G. & Johnston, I., 2005. Environmental physiology of animals. Blackwell Publishing. Malden, 754 pp
- Wu, C.S. & Kam, Y.C., 2009. Effects of salinity on the survival, growth, development, and metamorphosis of *Fejervarya limnocharis* tadpoles living in brackish water. *Zoological science*, 26 (7): 476-482
- Yanfang, Z. & Shichun, S., 2006. Effects of salinity, temperature and pH on the survival of the nemertean *Procephalothrix simulus* Iwata, 1952. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328: 168-176
- Zhang, Y., Wang, Z., Yan, X., *et al.*, 2012. Laboratory hybridization between two oysters: *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis*. *Journal of Shellfish Research*, 31 (3): 619-625
- Zhou, J., Wang, W-N., Wang, A-L., He, W-Y., Zhou, Q-T., Liu, Y. & Xu., J., 2009. Glutathione S-Transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 150 (2): 224-230

Capítulo 2: Resistência, regulação osmo-iônica e manutenção de água tecidual de *Stramonita brasiliensis* (Mollusca: Gastropoda) diante de estresse salino hipo e hiper-osmótico²

Veiga, M.P.T.¹; Gutierre, S.M.M.²; Castellano, G.C.³; Freire, C.A.*⁴

¹UFPR – Programa de Pós-Graduação em Zoologia, (Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brasil), marcosptv@gmail.com

²UFPR – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, (Caixa Postal 19031, 81531-980 Curitiba, PR, Brasil), silvia_mmg@hotmail.com

³UFPR - Programa de Pós-Graduação em Zoologia, (Caixa Postal 19020, 81531-980 Curitiba, PR, Brasil), gccastellano@hotmail.com

⁴UFPR – Departamento de Fisiologia, (Caixa Postal 19031, 81531-980 Curitiba, PR, Brasil), osmolab98@gmail.com

*Autor de Correspondência: Dra. Carolina A Freire, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 55-41-3361-1712, FAX 3361-1714, cafreire@ufpr.br

Resumo

Animais que habitam costões rochosos são expostos a constantes variações ambientais. Dentre eles estão os moluscos gastrópodos, que por sua capacidade de deslocamento, ainda que lenta, podem alcançar diversos micro habitats, para fuga ou alimentação. O caramujo *Stramonita brasiliensis* é um eficiente predador que utiliza o deslocamento como mecanismo para alcançar as presas. A permanência em diversos micro habitats durante a maré alta

² Capítulo desenvolvido em colaboração com Silvia Maria Millan Gutierre e Giovanna Carstens Castellano. Texto em processo de correção para publicação na revista *Marine Biology*.

pressupõe uma ampla resistência fisiológica às variações abióticas destes diferentes ambientes. O objetivo deste capítulo foi o de relacionar as respostas fisiológicas e comportamentais de *S. brasiliensis* às variações salinas com sua habilidade de permanência em diferentes micro habitats. Para isso, foram realizados experimentos *in vivo* e *in vitro* testando a resistência, a capacidade osmorregulatória e de manutenção de hidratação tecidual de *S. brasiliensis* em desafios hipo e hipersalinos. As dosagens iônicas e de osmolalidade, bem como a determinação do teor hídrico e da hidratação tecidual, demonstraram que ambientes diluídos são fisiologicamente mais estressantes, do que os mais concentrados, podendo inclusive ser letais. Em condições experimentais extremas o fechamento do opérculo minimiza os danos causados pelas alterações salinas, porém em ambientes naturais o animal pode minimizar tais efeitos locomovendo-se ou aumentando a produção de muco.

Keywords: Osmorregulação, regulação de volume, entremarés, salinidade, predador

Abstract

Animals that inhabit rocky shores are exposed to constant environmental changes. Among them are the gastropod molluscs, which due to its ability to move, albeit slowly, can reach different microhabitats to escape or feeding. The snail *Stramonita brasiliensis* (previously called *Stramonita haemastoma*) is an efficient predator that uses displacement as a mechanism to reach the prey. Transit through various micro habitats requires a broad physiological resistance to abiotic variations of these different environments in high tide. The aim of this chapter was to relate the physiological and behavioral responses of *S. brasiliensis* to salinity fluctuations with their ability to stay in different microhabitats. For this, experiments were performed *in vivo* and *in vitro*, testing the resistance, the osmoregulatory ability, and the capacity of maintenance of tissue hydration of *S. brasiliensis* face to in hypo- and hypersaline challenges. The osmotic and ionic concentrations measured, as well as the determination of tissue water content, and the tissue hydration changes demonstrated that dilute environments are physiologically more stressful than the concentrated ones, and may even be lethal. In extreme experimental conditions, the operculum closure minimizes the damage caused by salt changes, but the animal in natural environments can minimize such effects moving to another place or increasing the mucus secretion.

Introdução

Regiões de entremarés apresentam amplas variações de fatores abióticos. Animais que ocupam este extrato do costão rochoso são constantemente expostos a desafios, como dessecação e alterações de salinidade, temperatura e pH (Connell, 1972; Fokina *et al.*, 2007; Poloczanska *et al.*, 2011). A tolerância a estas oscilações pode estar associada a mecanismos comportamentais, ecológicos ou fisiológicos (Drouin *et al.*, 1984; Helmuth, 1998; Zardi *et al.*, 2006; Michalec *et al.*, 2010). Em respostas a alterações no meio, moluscos podem enterrar-se, deslocar-se para locais menos hostis ou, espécies portadoras de conchas, podem isolar-se no interior das mesmas (Drouin *et al.*, 1984; Berger & Kharazova, 1997; HRS-Brenko, 2006). As respostas ecológicas a variações ambientais são evidenciadas na distribuição das populações e nas agregações (Muñoz *et al.*, 2008; Okuda *et al.*, 2010). Além disso, estes animais podem utilizar mecanismos fisiológicos, como usar a regulação osmo-iônica, para controlar o volume celular e manter a homeostasia do fluido extracelular (Prusch, 1983; Chamberlin & Strange, 1989; Berger & Kharazova, 1997). Essa função fisiológica possibilita a manutenção da estabilidade das concentrações nos solutos do fluido extracelular. Quando há gasto de energia em órgãos especializados, os indivíduos são chamados de osmorreguladores e realizam a Regulação Anisomótica Extracelular (AER) (Florkin, 1962; Freire *et al.*, 2008). Os invertebrados marinhos, inclusive os moluscos, são predominantemente osmoconformadores, essencialmente isosmóticos com relação à água do mar e não gastam energia para manter estáveis as quantidades de solutos no meio extracelular (De Vooy, 1991;

Péqueux, 1995; Deaton, 2008). Entretanto, a composição de solutos da água do mar e dos fluidos corpóreos destes animais pode ser diferente, o que demanda certa capacidade de regulação iônica dos mesmos (Freire *et al.*, 2008).

Frente a alterações extracelulares, os organismos, principalmente os osmoconformadores, necessitam regular o volume de suas células para que suas funções não sejam prejudicadas (Pierce, 1982; Diehl & Lawrence, 1984; Diehl, 1986; Gilles, 1987; Chamberlin & Strange, 1989; Mongin & Orlov, 2001; Wehner *et al.*, 2003; Choe & Strange, 2008). Tal regulação, denominada Regulação Isosmótica Intracelular (RII), é realizada através de tomada ou eliminação de osmólitos orgânicos e/ou inorgânicos pela célula (Pierce, 1982; Gilles, 1987; Chamberlin & Strange, 1989; Pierce & Politis, 1990; Hoffmann & Dunham, 1995; Häussinger, 1996; Deaton, 2001; Wehner *et al.*, 2003; Kirschner, 2004; Deaton, 2008). Diante de um choque hiposmótico ocorre a Redução Regulatória de Volume (RVD) quando são liberados solutos e água (Chamberlin & Strange, 1989; Häussinger, 1996; Lang, 2007). O oposto ocorre sob choque hiperosmótico, no qual são tomados solutos e água, através do Aumento Regulatório de Volume (RVI). Quanto maior for o grau de eurihalidade do animal mais rápido será o retorno ao volume celular inicial, porém raramente a célula retorna à condição anterior ao estresse (Pierce, 1982; Häussinger, 1996). Já foi observada em moluscos bivalves expostos a estresse salino a capacidade de regular o volume celular acumulando aminoácidos em função do tempo de exposição e do tipo de tecido (Pierce, 1971; Pierce & Greenberg, 1973; Willmer, 1978; Silva & Wright, 1994; Deaton, 2001). Além disso, já foi verificada a capacidade de regulação de volume

celular em moluscos, com realização tanto de RVD quanto de RVI (Pierce, 1971; Pierce & Greenberg, 1973; Willmer, 1978; Silva & Wright, 1994; Deaton, 2001).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta a alterações de salinidade ambiental estão dentre os fatores determinantes do grau de eurihalinidade de um animal (Diehl & Lawrence, 1985). Este grau de tolerância pode ser demonstrado pela taxa de sobrevivência proporcionada pela capacidade de regulação osmo-iônica e controle do volume tecidual ou celular. Crustáceos, contrariamente à maioria dos invertebrados marinhos, apresentam alta capacidade osmorregulatória, o que explica a ampla distribuição do grupo em habitats de diversas salinidades (Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008). Moluscos também ocupam uma grande variedade de ambientes (Lydeard *et al.*, 2002), sendo encontrados em águas marinhas, estuarinas e continentais (Deaton, 2008). Assim, espera-se encontrar nestes animais, uma taxa de sobrevivência relativamente alta, e manutenção de concentrações osmo-iônicas e de hidratação tecidual estáveis, se comparados a invertebrados marinhos estenohalinos que também podem ocupar as regiões de entremarés dos costões rochosos, tais como ascídias e equinodermos (Goodbody, 1961; Binyon, 1966; Catarino *et al.*, 2012).

Dentre os moluscos, a classe Gastrópoda apresenta o maior número de espécies (vivas e fósseis) e ocupa ambientes variados, entretanto, isto não se reflete no volume da literatura fisiológica, principalmente com relação ao conhecimento do processo de regulação de volume celular. O caramujo *Stramonita brasiliensis* é uma espécie com elevada importância ecológica e econômica, que constantemente é exposto a variações de salinidade,

encontradas durante seus deslocamentos em busca de alimento por diferentes micro habitats do costão rochoso. O conhecimento de seus limites de resistência e de plasticidade fisiológica é uma importante ferramenta para o manejo e o cultivo da espécie. O objetivo deste trabalho foi o de relacionar as respostas fisiológicas e de resistência de *S. brasiliensis* diante de desafios salinos à sua habilidade de permanência nos diferentes extratos do costão rochoso. Visto que *S. brasiliensis* é um animal vágil e que em condições adversas pode deslocar-se, mas que também pode ser encontrado em poças de maré e exposto ao ar no supra litoral, acredita-se que gastrópodo tenha elevada amplitude de tolerância a variações de salinidade.

Materiais e métodos

A espécie estudada

A espécie *S. brasiliensis* (Fig. 2.1) é um gastrópodo comumente encontrado na região de entremarés. Possui concha sólida que reduz os impactos das variações ambientais e da predação. A espécie habita todos os estratos dos costões rochosos de regiões tropicais, na costa atlântica da América do Sul, embora seja mais raro na porção superior da região de entremarés durante a maré baixa (Claremont *et al.*, 2011). Este caramujo é um predador extremamente bem sucedido em áreas naturais e em cultivos de bivalves (Garton & Stickle, 1980; Butler, 1985; Brown, 1997). Além disso, é fonte alimentar de seres humanos e pesquisas visam aperfeiçoar sua produção (Manzoni & Lacava, 1998).

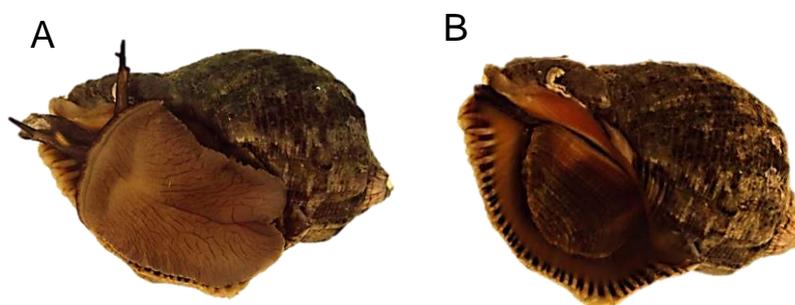


Figura 2.1. Exemplos de *Stramonita brasiliensis* com o opérculo aberto (A) e com o opérculo fechado (B). Tamanho aproximado 5 centímetros.

Coleta e aclimatação

As coletas de *S. brasiliensis* foram realizadas manualmente durante a maré baixa, na Praia da Paciência (26° 46' 59"S e 48° 36' 07" W), Penha, Santa Catarina, Brasil. Os animais foram aclimatados em laboratório, em aquário estoque de 160 L, por cerca de 4 dias em salinidade 35, temperatura da água de 20°C ± 2, aeração e filtração constantes, fotoperíodo natural (12h dia/ 12h noite). Os animais foram alimentados com fragmentos de peixe a cada 2 dias.

Concentração e diluição da água do mar

Nos experimentos hipossalinos a água do mar foi diluída em água bifiltrada (declorada). Para a realização dos testes hipersalinos, a água foi concentrada através da adição de sal marinho. A água doce consistiu em água bifiltrada (declorada) e o experimento controle foi realizado na salinidade 35. A salinidade das águas foi aferida com a utilização de Refratômetro Instrutherm® (RTS-101TC).

Teste de resistência

Cada animal foi retirado diretamente do aquário estoque e exposto individualmente à salinidade 0, 10, 20, 25, 35, 40, 45 ou 55 (n=6 para cada salinidade) por 24h, em recipiente de 700 ml. Os indivíduos foram avaliados de hora em hora durante as primeiras 6h, posteriormente em 12h e novamente ao final do experimento, quanto a posição do opérculo (aberto ou fechado).

Indivíduos com o opérculo fechado receberam um estímulo mecânico (com uma pinça) para testar seus reflexos e verificar se estavam vivos. Os animais foram considerados vivos quando, ao ter seus opérculos pressionados os mesmos reagiam recolhendo-os. Os gastrópodos foram considerados mortos quando não esboçavam resposta aos estímulos mecânicos e não se recuperavam ao serem recolocados em salinidade 35.

Experimentos “in vivo”

Os animais foram retirados do aquário estoque, colocados em grupos de 3 indivíduos em aquários de 2 litros e expostos às salinidades 0, 35 (controle) e 45 com 15 indivíduos para cada salinidade, com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e aeração constante, durante 3h, tempo no qual os animais demonstraram respostas (morte) no teste de resistência. Os animais foram crioanestesiados por 20 minutos para coleta de hemolinfa para dosagem de íons e osmolalidade, realizada com uma seringa de insulina, através de uma perfuração feita no opérculo. As amostras foram armazenadas a -20°C .

Outros espécimes, também retirados diretamente do aquário estoque, foram expostos às mesmas condições experimentais, mas em recipientes individuais de 700 ml por 3h e 6h ($n=5$ para cada salinidade e tempo). Ao final do experimento, os animais foram crioanestesiados por 20 minutos para a coleta de um fragmento do tecido muscular do pé de cada indivíduo, para a mensuração do teor hídrico (TH) tecidual. O tempo de 3h de exposição foi baseado nos resultados dos experimentos de resistência, nos quais houve mortalidade após este período na salinidade 0. O tempo de 6h foi avaliado para

simular o intervalo de um ciclo de maré. No experimento de TH comparou-se os resultados dos dois tempos.

Dosagens

A partir das amostras de hemolinfa foram dosados osmolalidade e íons sódio, cloreto, magnésio e potássio (n=10 amostras do total de 15 escolhidas aleatoriamente). As leituras de osmolalidade foram realizadas em Micro-osmômetro de Pressão de Vapor Wescor® (VAPRO 5520), em amostras não diluídas, e as dosagens iônica de sódio e potássio em Fotômetro de Chama Digimed® (DM- 61), em amostras diluídas em água ultra-pura. Para dosar os íons cloreto e magnésio, foram utilizados *kits* comerciais Labtest®, com absorbâncias lidas em Espectrofotômetro Amersham Pharmacia Biotech® (Ultrospec 2100 PRO).

Teor hídrico (TH)

Para a mensuração do TH do pé muscular (n=5 para cada salinidade e tempo), cada fragmento muscular foi pesado em Balança Analítica Bioprecisa® (FA2104N, precisão 0,0001g). Primeiramente obteve-se o peso úmido (PU) com o tecido fresco, em seguida o fragmento foi desidratado em estufa a 60°C durante 24h e então pesado novamente para a obtenção do peso seco (PS). O TH do tecido foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{TH (\%)} = \frac{\text{PU} - \text{PS}}{\text{PU}} \times 100$$

PU

Experimentos “*in vitro*”

Nos experimentos *in vitro* os animais foram retirados diretamente do aquário estoque e crioanestesiados por 20 min, para coleta de fragmento do pé muscular de cada espécime. Em seguida estes tecidos foram transferidos para uma solução salina controle, isosmótica ao fluido extracelular dos animais (Tab. 2.1). Após o término da dissecação, foi removido suavemente o excesso de água de cada fragmento tecidual com papel filtro, o qual foi pesado e incubado em soluções hiposmótica (50% da concentração osmótica do controle), controle (1035 mOsm) ou hiperosmótica (50% acima do controle), num total de 15 indivíduos por condição (Tab. 7). Cada amostra de tecido foi mantida em sua respectiva solução por 75 min, sendo seca com papel filtro e pesada em Balança Analítica a cada 15 min. A primeira mensuração de peso de cada amostra foi usada como referência (100%) para os demais valores obtidos.

Tabela 2.1. Composição das salinas controle (isosmótica) e experimentais (hipo and hiperosmótica de $\pm 50\%$ relacionada ao controle isosmótico) salinas usadas para o experimento *in vitro* tecidos (pé muscular).

Salinas	Componentes				Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O)	Percentual da salina isosmotica
	NaCl (mM)	KCl (mM)	MgCl ₂ (mM)	CaCl ₂ (mM)		
Isosmótica	470	10	54	10	945	100%
Hiposmótica (-50%)	235	5	27	5	461	49%
Hiperosmótica (+50%)	705	15	81	15	1466	155%

Obs.: Componentes adicionais de concentração constante em todas as salinas: Glicina (5mM), D-glucose (5mM), HEPES (5mM), e NaHCO₃ (2mM), pH 8.2. Osmolalidade foi mensurada em 1 ou 2 amostras das salinas preparadas.

Análise estatística

Os resultados do teste de resistência foram analisados através da similaridade entre as salinidades de acordo com as respostas dos animais. Os dados de abundância de indivíduos abertos foram utilizados para gerar um dendograma a partir da matriz de similaridade de Bray-Curtis (Manly, 2008). A análise dos dados de dosagens osmótica e iônicas foi realizada por *One Way ANOVA* com teste Tukey *a posteriori* para dados com distribuição normal e por *Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks* com *post hoc* de Dunn's para dados não normais. Os dados de teor hídrico tecidual e a análise dos dados do experimento *in vitro* foram avaliados por *Two Way ANOVA*, sendo o primeiro fator correspondente ao tratamento e o segundo ao tempo, com *post hoc* de Tukey para dados não normais. O limite de significância considerado foi 0,05.

Resultados

Nos experimentos de resistência, os caramujos apresentaram 100% de mortalidade em salinidade 0 a partir de 3h de exposição. Nas salinidades 0, 10 e 15 os gastrópodos permaneceram com o opérculo fechado por todo o período experimental. Em salinidade 20, 50% dos indivíduos mantiveram o opérculo fechado nas primeiras duas horas, após esse tempo todos permaneceram abertos. Na primeira hora em salinidade 25 todos os caramujos estavam abertos, entre a segunda e a terceira hora 25% se fecharam e após 4h todos abriram o opérculo. Nas salinidades 35, 40, 45 e 55 todos os indivíduos permaneceram com o opérculo aberto durante todo o tempo experimental (Fig. 1.6).

A partir da abundância de indivíduos abertos em cada salinidade, foi feita uma análise de agrupamento, indicando que as salinidades 25, 35, 40 e 45 compuseram um grupo, e 15, 20 e 55 formaram o outro grupo. A salinidade de 10 ficou mais distante destes dois grupos, e a água doce separada das demais devido à ausência de abertura das conchas (Fig. 2.2).

Com relação às dosagens osmo-iônicas dos experimentos *in vivo*, na condição controle (salinidade 35) os valores de osmolalidade ($p=0,05$) e Cl^- ($p=0,003$) ($\text{Osm}=953\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$; $\text{Cl}^-=482\text{mM}$) foram maiores aos encontrados em água doce ($\text{Osm}=776\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$; $\text{Cl}^-=372\text{mM}$) e inferiores aos obtidos em salinidade 45 ($\text{Osm}=1261\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$; $\text{Cl}^-=719\text{mM}$) (Fig. 2.3A e E). Os demais íons em água hipersalina ($\text{Na}^+=259\text{mM}$; $\text{Mg}^{2+}=64\text{mM}$; $\text{K}^+=15,6\text{mM}$) apresentaram valores superiores aos das outras condições (Fig. 2.3C,E e F) e em água doce ($\text{Na}^+=202\text{mM}$; $\text{Mg}^{2+}=47\text{mM}$; $\text{K}^+=11,7\text{mM}$) igualara-

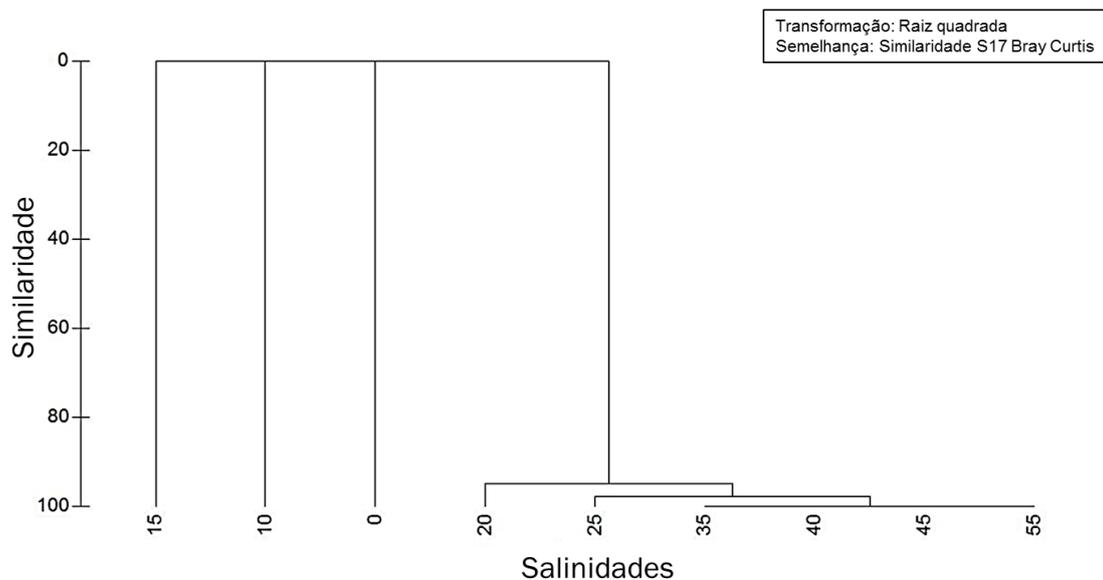


Figura 2.2. Dendrograma de similaridade de Bray-Curtis baseado na porcentagem de indivíduos de *Stramonita brasiliensis* com os opérculos abertos nas salinidades (0, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45, 55) e tempos (1 a 6h) amostrais do experimento de resistência. Similaridade de 100% para grupos que mantiveram a concha aberta o tempo todo.

se ao controle ($\text{Na}^+=192\text{mM}$; $\text{Mg}^{2+}=50\text{mM}$; $\text{K}^+=11,1\text{mM}$) ($p=0,021$; $p=0,585$; $p=0,066$; respectivamente para Na^+ , Mg^{2+} e K^+). Não houve diferença entre o TH tecidual do controle (TH 3h=77%; TH 6h=81%), da salinidade 0 (TH 3 e 6h=80%) e 45 (TH 3 e 6h=77%) após 3 e 6 horas de exposição ($p=0,575$) (Fig. 2.3B).

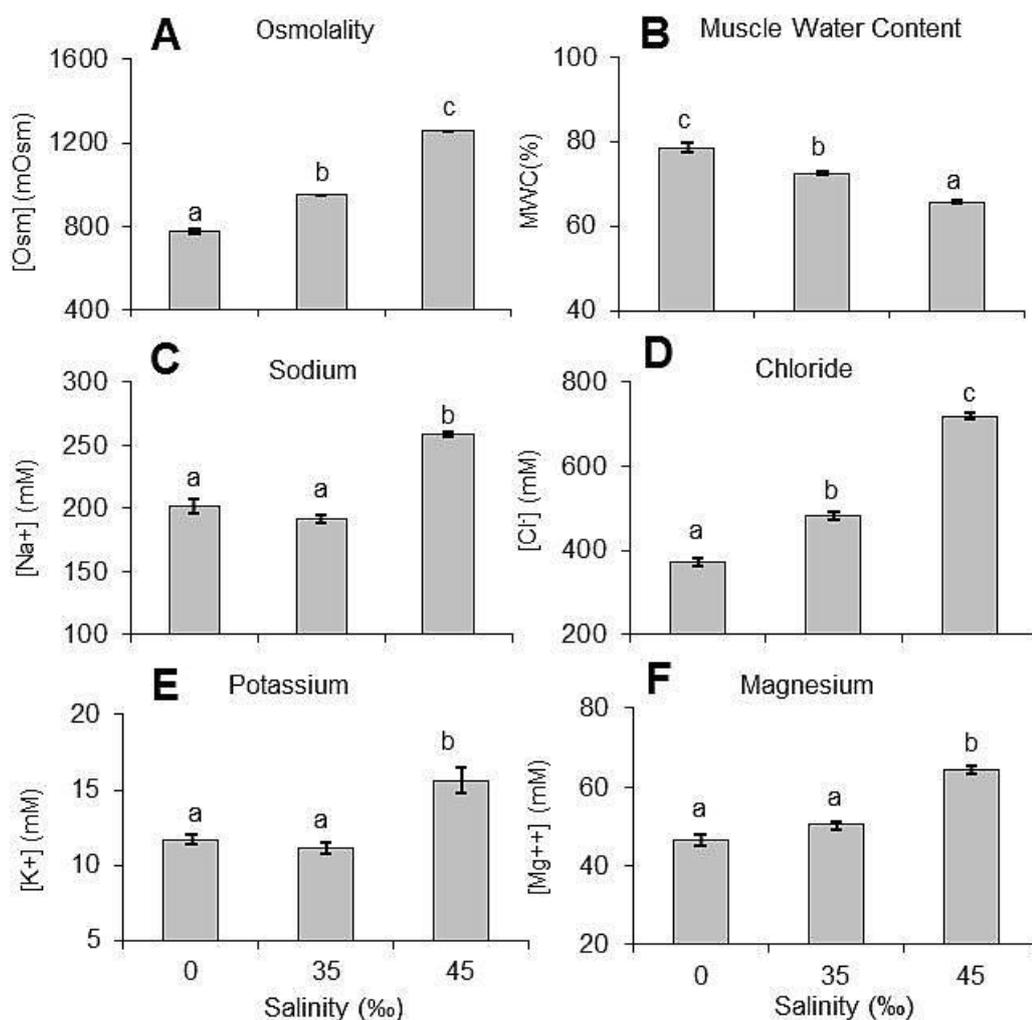


Figura 2.3. Concentrações osmótica (A), teor hídrico (B), e de íons sódio (C), cloreto (D), potássio (E) e magnésio (F) da hemolinfa de *S. brasiliensis* submetida aos desafios hiposmótico (salinidade 0) e hiperosmótico (salinidade 45), e à salinidade controle (35) por 3h. Letras diferentes representam diferenças entre as respostas de *S. brasiliensis* às diferentes salinidades.

Nos experimentos *in vitro*, a hidratação tecidual manteve-se estável no controle (Tempo inicial $T_0=100\%$; Tempo final $T_f=100\%$). No choque hiposmótico os valores de hidratação aumentaram com o tempo ($T_0=100\%$; $T_f=138\%$) e no experimento hiperosmótico os valores caíram progressivamente até 30 minutos e mantiveram-se estáveis entre 30 e 75 minutos ($T_0=100\%$; $T_{30min}=88\%$; $T_f=86\%$). Em todos os tempos, com exceção do inicial, o volume

tecidual da condição hiposmótica mostrou-se maior do que o do controle e o do desafio hipersalino menor (Fig. 2.4).

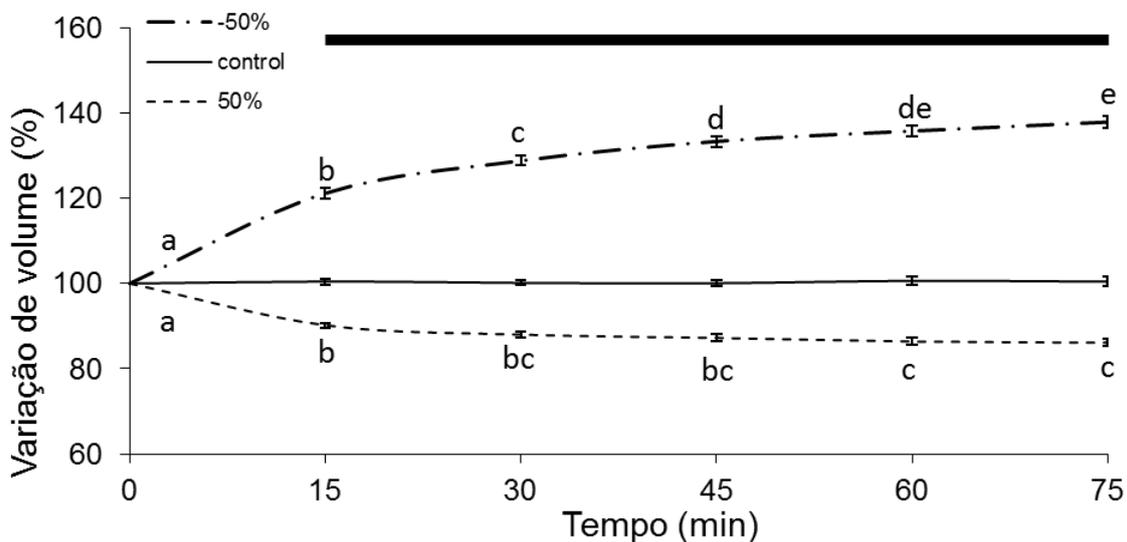


Figura 2.4. Curso temporal da variação de hidratação tecidual (pé muscular) (n=15) de *S. brasiliensis* exposto a choque osmótico de, respectivamente, 50% de redução (linhas salpicadas) e aumento (linhas tracejadas) com relação à salina isosmótica. A linha contínua corresponde aos fragmentos teciduais expostos à salina isosmótica (controle). A linha contínua espessa representa os tempos em que houve diferença entre as condições experimentais (hipo e hiperosmótica) e o controle. Letras diferentes representam diferenças ao longo do tempo, dentro de uma mesma condição (hipo ou hiperosmótica).

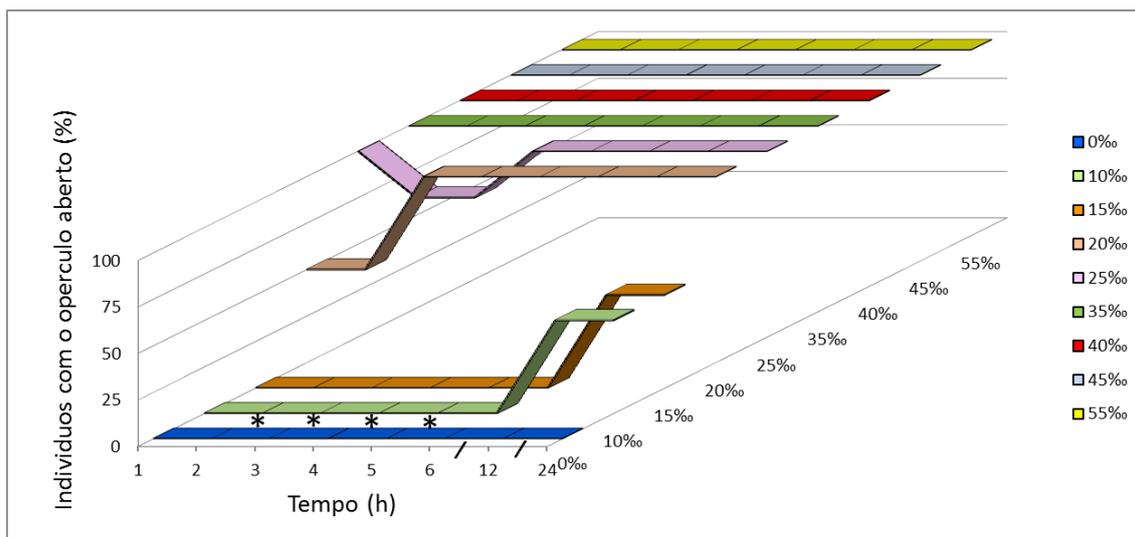


Figura 2.5. Curso temporal do experimento de resistência, indicando a porcentagem de gastrópodos com o opérculo aberto. Asteriscos indicam os tempos na salinidade 0 onde houve morte de indivíduos. Barras no eixo X indicam quebra na linha temporal.

Discussão

Indivíduos de *S. brasiliensis* apresentaram mortalidade apenas na salinidade mais baixa (0), demonstrando que para essa espécie a água doce é letal e como nas salinidades mais baixas (10 e 15) os animais fecharam o opérculo, principalmente nas primeiras horas, fica evidente que o choque hiposmótico gera estresse e induz a alterações comportamentais (Fig. 2.5). Experimentos com *Thais haemastoma* (Stickle & Howey, 1975) demonstram que esta espécie é encontrada em estuários onde a salinidade pode chegar a menos que 5, diferentes de *S. brasiliensis* que é encontrada em locais com salinidades próximas à água do mar (35), porém a tolerância de *S. haemastoma* a salinidades experimentais variando de 5 a 30, é semelhante ao resultado encontrado no presente trabalho para *S. brasiliensis*.

Diferenças na tolerância/sobrevivência à água doce também são encontradas entre bivalves e gastrópodes. O mexilhão estuarino *Mytella charruana*, semelhante à *S. brasiliensis*, é diariamente exposto a variações ambientais de salinidade. Porém, quando submetido a experimentos de 6h com salinidade variando entre 0 e 45, não apresentaram mortalidade (Yuan et al., 2010). A sobrevivência dos mexilhões e mortalidade dos caramujos pode ser explicada pelo fato de que bivalves de ambientes oligohalinos apresentam a osmolalidade dos fluidos mais diluídos que gastrópodos do mesmo ambiente (Deaton, 2008). Isso indica que esses bivalves estão mais adaptados a viver em ambientes diluídos do que gastrópodes. Outro fato que pode influenciar esta diferença entre as respostas destes animais é a questão do isolamento provido pelas conchas. O bivalve *Anadara granosa* em condições estressantes

pode se isolar eficientemente do ambiente fechando suas conchas (Davenport & Wong, 1986). De forma diferente gastrópodos como *S. brasiliensis* não conseguem isolar-se do ambiente de maneira hermética como pode ocorrer com os bivalves (Berger & Kharazova, 1997).

De maneira geral, observou-se que as concentrações de solutos da hemolinfa de *S. brasiliensis* acompanharam a variação salina do ambiente. Entretanto, em água doce, houve manutenção das concentrações de sódio, magnésio e potássio em níveis iguais aos do controle (salinidade 35). A espécie estudada é considerada eurihalina e osmoconformadora (Stickle & Howey, 1975), ou seja, altera as concentrações do seu meio interno de acordo com as alterações salinas do meio externo, mas isso só ocorre caso o opérculo permaneça aberto durante essa variação na salinidade, o que foi observado em salinidade 45. Porém a resposta comportamental de fechar as conchas, o opérculo ou enterrar-se, é comum entre moluscos, e os permite isolar-se de um ambiente estressante minimizando, ou até evitando totalmente, o estresse (Shumway et al., 1977; Drouin et al., 1984; Davenport & Wong, 1986). A manutenção das concentrações de alguns íons em água doce deveu-se provavelmente ao fechamento opercular, observado no teste de resistência e no experimento de salinidade. No entanto, variações na osmolalidade e na concentração de cloreto nesta mesma salinidade indicam que o fechamento opercular não representa um isolamento do animal com relação ao ambiente, e sim, uma minimização de fluxos difusivos.

A estabilidade nas concentrações de sódio e potássio sob estresse hiposmótico pode estar relacionada a funções celulares relativas aos gradientes destes íons, como a manutenção do potencial de membrana e do

volume celular e a promoção do transporte ativo de outros solutos (Horisberger et al., 1991; Jorgensen et al., 2003). Mais especificamente, o sódio exerce importante função na regulação do pH dos neurônios de gastrópodes (Thomas, 1977). A regulação deste íon em invertebrados osmoconformadores é algo incomum, pois em geral ele é encontrado em equilíbrio com o meio, assim como o cloreto (Robertson, 1949).

A concentração de potássio em água doce (concentração igual à controle) pode ter relação com o efluxo deste íon das células para a hemolinfa durante a redução regulatória de volume, como já observado em células de moluscos (Silva & Wright, 1994). A estabilidade dos níveis de magnésio sob a mesma condição pode se dever à grande importância deste íon, um dos mais abundantes no meio intracelular, na síntese proteica (Grubbs et al., 1989; Saris et al., 2000) e no transporte de K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} (Saris et al., 2000; Hartwig, 2001; Kaplan, 2002).

A manutenção do TH diante dos desafios salinos de 3h e 6h de duração indica alta capacidade de manutenção de hidratação tecidual e, possivelmente, de regulação de volume celular por *S. brasiliensis*. Em água doce houve também a contribuição do fechamento da concha para tal manutenção. Esta é uma estratégia comportamental bem conhecida em animais com conchas para evitar ou minimizar a exposição a um estresse ambiental (Shumway et al., 1977; Drouin et al., 1984; Davenport & Wong, 1986). Embora tenha sido detectada a morte dos animais após a exposição de 6h, estes mantiveram o opérculo fechado, o que explica a manutenção do TH inalterado após este tempo.

No experimento de volume tecidual, *in vitro*, a redução osmótica provocou aumento de peso do tecido e elevação da osmolalidade causou diminuição de hidratação. Neste experimento os desafios hipo e hiperosmóticos foram impostos aos tecidos (sem possibilidade de isolamento), por isso houve diferença de resposta de hidratação tecidual entre os experimentos de teor hídrico *in vivo* e *in vitro*. Os tecidos não se comportaram como um osmômetro perfeito, pois suas hidratações variaram menos do que a concentração das soluções às quais foram expostos. Isto demonstra alguma capacidade de regulação de volume celular, como já verificado em bivalves (Pierce, 1971; Pierce & Greenberg, 1973; Willmer, 1978; Silva & Wright, 1994; Deaton, 2001). Bivalves marinhos do gênero *Modiolus*, por exemplo, são capazes de regular volume celular sob estresse hipossalino (Pierce, 1971) e manter estável a hidratação tecidual diante de condições hipo e hiperosmóticas com relação à água do mar (Pierce & Greenberg, 1973). *Geukensia demissa*, habitante de estuário, apresenta sinal de RVI diante de exposição tecidual a solução hiperosmótica (250 – 1000 mOsm). Além disso, o acúmulo rápido de aminoácidos livres intracelulares sob esta condição demonstra sua capacidade de regular volume celular (Deaton, 2001). Ainda, o mexilhão marinho *Mytilus edulis* apresenta moderada capacidade de regulação de volume celular quando exposto a água do mar em concentração de 25% (Willmer, 1978) e *Mytilus californianus*, também marinho, apresenta capacidade de RVD na brânquia exposta a água do mar 60% concentrada (Silva & Wright, 1994). A verificação de RVD e RVI, já reportada anteriormente para moluscos bivalves (Silva & Wright, 1994; Deaton, 2001) não foi observada aqui devido à ausência deste tipo de resposta em *S. brasiliensis*, ou devido a limitações da metodologia

empregada, que fornece resultados atenuados e diferenciados com relação ao que supostamente se observaria em células isoladas (Freire et al., 2008). Além disso, as hidratações verificadas na condição hiperosmótica mantiveram-se mais estáveis com relação às observadas na hiposmótica, prevenindo danos causados por excesso de sal intracelular, como prejuízo às funções de proteínas intracelulares (Burg & Ferraris, 2008). Estes resultados corroboram dados anteriores, segundo os quais em *Bunodosoma cavernata* (anêmona), *Eriocheir sinensis* (caranguejo) e *Rangia cuneata* (bivalve) o processo de RVD é muito mais rápido do que o de RVI, sendo que esse último pode levar vários dias para se completar (Gilles, 1987).

Por fim, é possível relacionar os resultados comportamentais encontrados no teste de resistência e as respostas fisiológicas aos experimentos de salinidade e nos de água tecidual indicando congruência entre os mesmos. Isso porque o fechamento opercular provocou manutenção de concentrações de solutos e de hidratação tecidual. Além disso, a maior estabilidade de hidratação tecidual sob o desafio hipersalino tem um significado de proteção, em uma condição em que não ocorre osmorregulação. Tal relação corrobora a afirmação de que quanto menor a capacidade osmorregulatória, maior a de regulação de volume (Foster et al., 2010).

Conclusões

Conclui-se que *S. brasiliensis*, quando exposto a situações extremas, pode fechar o opérculo e retardar o estresse e os fluxos de íons e água, como ocorreu em água doce. O ambiente de água doce é extremamente estressante para o animal, ocasionando a morte do mesmo após três horas de exposição abrupta, o que indica que este animal não se impermeabiliza totalmente pelo fechamento do opérculo. Ainda, observou-se que a espécie estudada apresenta capacidade de regulação de hidratação tecidual. Embora seja claro que as condições impostas nos experimentos *in vivo* e *in vitro* tenham sido diferentes, as respostas obtidas foram coerentes. A literatura que aborda a osmorregulação em moluscos apresenta grande parte de seu conteúdo direcionada à bivalves, porém os gastrópodos compõem um grupo mais numeroso e que ocupa uma maior diversidade de habitats. Este trabalho avaliou as reações fisiológicas de *Stramonita brasiliensis* e constatou que se ajustam perfeitamente ao esperado para animais osmoconformadores, o que configura a espécie como um excelente modelo para o estudo de processos osmorregulatórios, não apenas de gastrópodos, mas de animais marinhos em geral.

Referências

- Berger, V. J. & Kharazova, A. D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*, 355: 115-126.
- Binyon, J., 1966. Salinity tolerance and ionic regulation. In *Physiology of Echinodermata* (Edited by Boolootian R. A.), pp. 359-377. Interscience, New York.
- Burg, M. B. & Ferraris, J. D., 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 7309-7313.
- Butler, P. A., 1985. Synoptic Review of the Literature on the Southern Oyster Drill *Thais haemastoma floridana*. NOAA Technical Report, NMFS, 35: 1-9.
- Brown, K. M., 1997. Size-specific aspects of the foraging ecology of the southern oyster drill *Stramonita haemastoma* (Kool 1987). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 214: 249-262.
- Catarino, A.I., Bauwens, M. & Dubois, P., 2012. Acid–base balance and metabolic response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different seawater pH and temperatures. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 2344-2353.
- Chamberlin, M. E. & Strange, K., 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 257: 159-173.

- Choe, K. & Strange, K., 2008. Volume Regulation and Osmosensing in Animal Cells. In Evans, D.H. (ed), Osmotic and ionic regulation: cells and animals. CRC Press, New York 37-67.
- Claremont, M., Williams, S.T., Barraclough, T.G., & Reid, D.G., 2011. The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38 (6): 1016-1032.
- Connell, J. H., 1972. Community interactions on marine rocky intertidal shores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3: 169-192.
- Davenport, J. & Wong, T. M. 1986. Responses of the blood cockle *Anadara granosa* (L.) (Bivalvia: Arcidae) to salinity, hypoxia and aerial exposure. *Aquaculture*, 56: 151-162.
- Deaton, L. E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260: 185–197.
- Deaton, L. E., 2008. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs. In: Evans, D.H. (ed), Osmotic and ionic regulation: cells and animals. CRC Press, New York 107-133.
- Deaton, L. E., Derby, J. G., Subhedar, N., & Greenberg, M. J., 1989. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 133(1), 67-79.
- De Vooy, C. G. N., 1991. Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* in the mediterranean—IV. Role of amino acids in

adaptation to low salinities during anaerobiosis and aerobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 100: 423-431.

Diehl, W. J., 1986. Osmoregulation in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 84: 199-205.

Diehl, W. J. & Lawrence, J. M., 1984. The effect of salinity on coelomic fluid osmolyte concentration and intracellular water content in *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79A:1, 119-126.

Diehl, W. J. & Lawrence, J. M., 1985. Effect of salinity on the intracellular osmolytes in the pyloric caeca and tube feet of *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 82: 559- 566.

Drouin, G., Himmelman, J. H. & Béland, P., 1984. Impact of tidal fluctuations on echinoderm and mollusk populations. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 1377-1387.

Florkin, M., 1962. La régulation isosmotique intracellulaire chez les invertébrés marins euryhalins. *Bulletin de l'academie Royale de Belgique Clinical Sciences*, 48: 687-694.

Fokina, N. N., Nefedova, Z. A., Nemova, N. N. & Khalaman, V. V., 2007. Modulating role of lipids and their fatty acids in adaptation of the White Sea Mussels *Mytilus edulis* L. to environmental salinity change. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 43 (4): 379-387.

- Foster, C., Amado, E. M., Souza, M. M. & Freire, C. A., 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 313A: 80-94.
- 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, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 149: 435-446.
- Garton, D. & Stickle, W. B., 1980. Effects of salinity and temperature on the predation rate of *Thais haemastoma* on *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*, 158: 49-57.
- Gilles, R., 1987. Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. *Current Topics in Transport*, 30: 205-247.
- Goodbody, I. 1961. Mass Mortality of a Marine Fauna Following Tropical Rains. *Ecology*, 42(1):150-155.
- Grubbs, R. D., Snavely, M. D., Hmiel, S. P. & Maguire, M. E., 1989. Magnesium Transport in eukaryotic and prokaryotic cells using magnesium-28 ion. *Methods in enzymology*, 173: 546-563.
- Hartwig, A., 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research*, 475:13-121.
- Häussinger, D., 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochemistry Journal*, 313: 697- 710.

- Helmuth, B. S. T., 1998. Intertidal mussel microclimates: Predicting the body temperature of a sessile invertebrate. *Ecological Monographs*, 68: 51-74.
- 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.
- Horisberger, J-D., Lemas, V., Kraehenbihl, J-P. & Rossier, B. C., 1991. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*, 53: 565-584.
- HRS-Brenko, M., 2006. The basket shell, *Corbula gibba* Olivi, 1792 (Bivalve Mollusks) as a species resistant to environmental disturbances: A review. *Acta Adriat.*, 47 (1): 49-64
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O. & Karlsh S. J. D., 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65: 817-849.
- Kaplan, J. H., 2002. Biochemistry of NA,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 511-535.
- Kirschner, L. B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*, 207:1439-1452.
- Lang, F., 2007. Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation. *Journal of the American College of Nutrition*, 26: 6135–6235.

- Lydeard, C., Holznagel, W.E., Glaubrecht, M. & Ponder, W.F., 2002. Molecular phylogeny of a circum-global, diverse gastropod superfamily (Cerithioidea: Mollusca: Caenogastropoda): pushing the deepest phylogenetic limits of mitochondrial LSU rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(3): 399–406
- Manly, B. J. F., 2008. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. 3ª Ed. Bookman, Porto Alegre.
- Manzoni, G. C. & Lacava, L. A., 1998. Crescimento dos gastrópodes *Thais* (*Stramonita*) *haemastoma* e *Cymatium parthenopeum parthenopeum* em cultivo experimental na enseada da armação do Itapocoroy (26° 47'S - 48° 36'W) (Penha - SC). *Notas Técnicas Facimar*, 2: 167-173.
- Michalec, F., Souissi, S., Dur, G., Mahjoub, M., Schmitt, F. & Hwang, J., 2010. Differences in behavioral responses of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) adults to salinity variations. *Journal of Plankton Research*, 32: 805-813.
- Mongin, A. A. & Orlov, S. N., 2001. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology*, 8: 77-88.
- Munoz, J. L. P., Camus, P. A., Labra, F. A., Finke, G. R., & Bozinovic, F., 2008. Thermal constraints on daily patterns of aggregation and density along an intertidal gradient in the periwinkle *Echinolittorina peruviana*. *Journal of Thermal Biology*, 33 (3): 149-156.

- Okuda, T., Noda, T., Yamamoto, T., Hori, M. & Nakaoka, M., 2010. Contribution of environmental and spatial processes to rocky intertidal metacommunity structure. *Acta Oecologica*, 36 (4): 413-422.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 1-60.
- Pierce, S. K., 1971. A source of solute for volume regulation in marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 38: 619-635.
- Pierce, S. K., 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biological Bulletin*, 163: 405-419.
- Pierce, S. K. & Greenberg, M. J., 1973. The initiation and control of free amino acid regulation of cell volume in salinity-stressed marine bivalves. *Journal of Experimental Biology*, 59: 435- 440.
- Pierce, S. K. & Politis, A. D., 1990. Ca²⁺ activated cell volume recovery mechanisms. *Annual Review of physiology*, 52: 27-42.
- Poloczanska, E. S., Smith, S., Fauconneta, L., Healy, J., Tibbetts, I. R., Burrows, M. T. & Richardson, A. J., 2011. Little change in the distribution of rocky shore faunal communities on the Australian east coast after 50 years of rapid warming. *Journal of Experimental Marine Biology and ecology*, 400: 145-154.
- Prusch, R. D., 1983. Evolution of invertebrate homeostasis: Osmotic and ionic regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 76: 753-761.

- Robertson, J. D., 1949. Ionic regulation in some marine invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 26: 182-200.
- Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. & Lewenstam, A., 2000. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 294:1–26.
- Shumway, S. E., Gabbott, P. A. & Youngson, A., 1977. The effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin-positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29: 131-150.
- Silva, A. L. & Wright, S. H., 1994. Short-term cell volume regulation in *Mytilus californianus* gill. *Journal of Experimental Biology*, 194: 47–68.
- Stickle, W. B. & Howey, T. W., 1975. Effects of tidal fluctuations of salinity on hemolymph composition of the southern Oyster drill *Thais haemastoma*. *Marine Biology*, 33: 309-322.
- Thomas, R. C., 1977. The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurons. *Journal of Physiology*, 273: 317-338.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E. & Kinne, R. K. H., 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, 148: 1-80.
- Widdows, J., Bayne, B. L., Livingstone, D. R., Newell, R. I. E. & Donkin, P., 1979. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to

exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 62 (2): 301-308.

Willmer, P. G., 1978. Volume regulation and solute balance in the nervous tissue of an osmoconforming bivalve (*Mytilus edulis*). *Journal of Experimental Biology*, 77: 157-179.

Yuan, W., Walters, L. J., Schneider, K. R. & Hoffman, E. A., 2010. Exploring the survival threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytella charruana*. *Journal of Shellfish Research*, 29: 415-422.

Zardi, G. I., Nicastro, K. R., McQuaid, C. D., Rius, M. & Porri, F., 2006. Hydrodynamic stress and habitat partitioning between indigenous (*Perna perna*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) mussels: constraints of an evolutionary strategy. *Marine Biology*, 150: 79-88.

Capítulo 3. Avaliação de moluscos relacionados com cultivo em Sistema de Alteração de Fatores Abióticos (SAFA)

Resumo

A determinação do momento específico em que um organismo expressa uma reação a um estímulo ambiental pode ser uma importante informação para avaliar suas respostas fisiológicas. Este conhecimento pode facilitar a elaboração de um desenho experimental baseado em fatos concretos evitando determinações empíricas. A utilização de sistemas que permitam a determinação destes momentos pode facilitar esta tarefa. O objetivo deste capítulo foi testar um sistema que possibilite observações de comportamentos específicos de animais diante de variações graduais de salinidade. Para isto foram avaliados 2 bivalves, o mexilhão *Perna perna* e a ostra *Crassostrea gigas*, além do gastrópodo *Stramonita brasiliensis*. Os animais foram expostos em um Sistema de Alteração de Fatores Abióticos (SAFA) que impunha choques graduais a partir da salinidade 35. Os choques hiposmóticos, de salinidade 0, e hiperosmóticos, de salinidade 70 foram impostos aos moluscos. Foram registrados o tempo e a salinidade em que os bivalves fecharam as conchas, e que os gastrópodos se desprenderam de uma superfície vertical. Foi observado que, em choques hiperosmóticos, o mexilhão fecha as conchas em salinidades mais altas do que a ostra. Com relação ao gastrópodo, o momento da queda variou de cerca de 1 a 9h após o início da exposição ao choque hiposmótico, e de 1 a 7h diante do choque hiperosmótico. Dentre os bivalves, *P. perna* mostrou-se mais tolerante a condições hiperosmóticas do

que *C. gigas*. O caramujo *S. brasiliensis* mostrou-se extremamente tolerante aos dois tipos de choques.

Abstract

The determination of the specific time at which an organism expresses a reaction to an environmental stimulus may be important information to assess their physiological responses. This knowledge can help you to develop an experimental design based on facts, and avoiding empirical determinations. The use of systems that allow the determination of these moments can facilitate this task. The purpose of this chapter was to test a system that allows the observations of animal specific behaviors under salinity variations. For this, 3 molluscs were evaluated, 2 clams, the mussel *Perna perna*, and the oyster *Crassostrea gigas*, and the gastropod *Stramonita brasiliensis*. The animals were exposed to hypo (salinity 0), and hyperosmotic (salinity 70) shocks. We recorded the time and salinity in which occurred the shells closure by the bivalves, and the came off of a vertical surface by the gastropod. It was observed that, in hyperosmotic shock, the mussel closed the shells in higher salinities than the oyster did. With respect to the gastropod, the timing of the fall ranged from about 1 to 9h after the start of exposure to hypoosmotic shock, and 1 to 7h before the beginning of the hyperosmotic shock. Among the bivalves, *P. perna* was more tolerant to hyperosmotic conditions than *C. gigas*. The snail *S. brasiliensis* was extremely tolerant to both types of shocks.

Introdução

Ambientes naturais estão sujeitos a alterações dos parâmetros abióticos de diferentes magnitudes (Blanchet *et al.*, 2008; Barnosky, 2001). Estas mudanças podem ocorrer lentamente através de processos geológicos como vulcanismo (Overpeck *et al.*, 1997) ou as glaciações que ocorreram a 23, 41 e 100 mil anos (Imbrie *et al.*, 1993). Fenômenos temporários que podem durar meses, como El Niño e La Niña que ocorrem no Oceano Pacífico influenciam o meio em muitas áreas do planeta (Hansen *et al.*, 2006; Wingfield, 2013). Algumas condições ambientais podem variar progressivamente. A acidificação dos oceanos e o aquecimento global são processos graduais que com o passar do tempo tendem a aumentar seu impacto sobre o meio (Hansen *et al.*, 2006; Melzner *et al.*, 2011). Chuvas intensas que ocorrem sazonalmente também causam variações de fatores abióticos, como as monções na Índia ou as cheias do pantanal no Brasil, (Medina Jr. & Rietzler, 2005; Escalera-Vázquez & Zambrano, 2010; Rajalakshmi *et al.*, 2010). Existem ainda ambientes extremamente variáveis que podem mudar suas características físicas do dia para a noite e até várias vezes no mesmo dia, como costões rochosos (Alberti *et al.*, 2010), estuários (Heip, 1988; Nicolas *et al.*, 2010) e riachos (Tockner *et al.*, 1999; Rocha, 2010). Além das inúmeras influências naturais no ambiente, existem as interferências antrópicas como poluição e urbanização, que também alteram expressivamente o comportamento dos fatores abióticos (Sherman *et al.*, 2007; Wingfield, 2013)

A variação de fatores ambientais abióticos pode gerar graves perturbações ao meio e prejuízos aos organismos que o habitam. Os efeitos

podem variar da redução do bem estar até a extinção de espécies (Colbert *et al.*, 1946; Hoffmann & Hercus, 2000; Barnosky, 2001). Para lidar com as alterações ambientais e manter sua homeostasia, todos os organismos devem apresentar algum tipo de mecanismo de resposta a estas variações (Freire *et al.*, 2008; Wingfield, 2013). O estudo do modo como os seres vivos respondem a oscilações de fatores ambientais contempla vários aspectos da biologia, como: reprodução (Jaspers *et al.*, 2011); evolução (Barnosky, 2001; Benton, 2009); ecologia (Escalera-Vázquez & Zambrano, 2010; Singh *et al.*, 2012) e fisiologia (Sastry, 1963; Santos *et al.*, 2013). As pesquisas sobre as respostas de organismos a alterações ambientais podem ser conduzidas em campo (Sih *et al.*, 1985; Prodocimo & Freire, 2004). Neste tipo de manipulação, a maioria dos fatores extrínsecos ao organismo foco não estão sob controle do pesquisador (Schoener, 1983). Contudo, estes procedimentos devem adequar sua condução à heterogeneidade espacial do local (Dutilleul, 1993) para não incorrer em pseudoreplicação de seus resultados (Hurlbert, 1984; Oksanen, 2001).

Outra abordagem experimental consiste na utilização de sistemas em pequena escala, que permitem avaliar a integração de alterações de fatores abióticos com as respostas de indivíduos ou comunidades (Clements, 2004; Newman & Clements, 2007). Sistemas em pequena escala podem ser: microcosmos ou mesocosmos. Sistemas fechados desenhados para representar aspectos ambientais específicos são ditos microcosmos (Fraser, 1999; Newman & Clements, 2007). Mesocosmos são sistemas com área externas delimitadas e parcialmente fechadas (Odum, 1984; Clements, 2004). Nestes sistemas o meio e os organismos podem ser observados por uma

equipe de pesquisadores, o que potencializa a verificação dos eventos simulados. Embora possibilite grande proximidade com os tratamentos aplicados, os sistemas reduzidos sofrem críticas a respeito da extrapolação dos resultados para ambientes naturais (Dudzik *et al.*, 1979). O que exige dos pesquisadores que conduzem testes em escala reduzida a elaboração de um delineamento experimental adequado de sua realidade (Drenner & Mazumder, 1999). Uma das formas de dar mais robustez às pesquisas desenvolvidas é complementar as informações de experimentos em pequena escala, com estudos em campo e avaliações realizadas em laboratório (Culp *et al.*, 2000; Cash *et al.*, 2003).

Experimentos conduzidos em laboratórios representam grande parte da literatura dedicada a avaliação dos efeitos das variações de fatores ambientais que incidem em organismos aquáticos (Ganning, 1967; Freire *et al.*, 2008, Jaspers *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013). Várias metodologias são utilizadas para testar as respostas dos organismos. As variações de fatores ambientais como salinidade podem ser obtidas através de longos períodos de diluição (Shumway & Youngson, 1979; Prodocimo e Freire, 2006) ou de forma mais abrupta (Santos *et al.*, 2013). Independente da forma com que os parâmetros são alterados a manipulação do animal ou do reservatório onde é conduzido o experimento pode estressar os animais a alterar sua resposta. A utilização de um sistema que minimize as variações externas às que são foco dos experimentos conduzidos pode aumentar a confiabilidade nos dados que são gerados.

O objetivo deste trabalho é propor um sistema que possibilite a alteração lenta e gradual de fatores abióticos em um reservatório experimental onde encontra-se um organismo em teste, sem a necessidade de interferir diretamente neste reservatório. Utilizando-se de outro reservatório ligado a este por uma tubulação ligada a uma bomba submersa, a qual possibilitará a mistura dos líquidos dos dois reservatórios. Acredita-se que a utilização deste método (SAFA) possibilite a observação do momento em que ocorre o fechamento da concha em moluscos, diante de mudanças lentas e gradativas na salinidade a partir da água do mar.

Materiais e Métodos

Para realização dos experimentos foram utilizadas duas configurações graduais do Sistema Alteração de Fatores Abióticos (SAFA), uma com um circuito fechado (Fig. 3.1A) e outra com o sistema aberto (Fig. 3.1B). Em sistema fechado, onde o volume de solução é constante, são necessários dois reservatórios com o mesmo volume de água, um para acomodar o organismo em experimentação, chamado de Reservatório Teste (RT) e outro chamado Reservatório Estoque (RE), onde fica a solução que será misturada. Para ligar um reservatório ao outro podem ser utilizadas mangueiras, por serem mais flexíveis e poderem ser transparentes. O RT deve ter dois orifícios, preferencialmente desalinhados, na altura onde chegará o volume de líquido desejado. A bomba submersa que irá movimentar o fluxo da solução deve ficar no RE. Dependendo do desenho experimental ao qual se destina o procedimento, a velocidade de mistura dentro do RT pode ser alterada, para isto dois artifícios podem ser utilizados: o RT pode ser montado sobre um agitador magnético e uma barra magnética pode ser inserida no interior do mesmo; ou uma bomba submersa de pequeno porte pode ser instalada no interior do RT. Obs.: o simples aumento da vazão da bomba no RE não garante a mistura das soluções no RT.

Para garantir a reprodutibilidade dos experimentos todos os parâmetros devem ser padronizados. Um dos mais relevantes é a quantificação do fluxo que chega ao RT. Para isto este valor deve ser cuidadosamente aferido e regulado. Sugere-se a instalação de uma válvula na tubulação para facilitar a regulação do fluxo. Como dentro do RT cria-se um gradiente de salinidade

entre o líquido que chega e o que já estava no recipiente que varia com o tempo de funcionamento e com a altura da coluna de líquido, é aconselhável que se retirem amostras para controlar a velocidade de mistura e para isto deve ser padronizado o ponto onde serão retiradas as amostras. O sistema fechado é mais aconselhável para a realização de experimentos com menor amplitude de variação entre o líquido do RT e do RE. Em circunstâncias em que o objetivo seja verificar a resposta a maiores limites de alteração de fatores no RT, é mais adequado a adoção do sistema aberto.

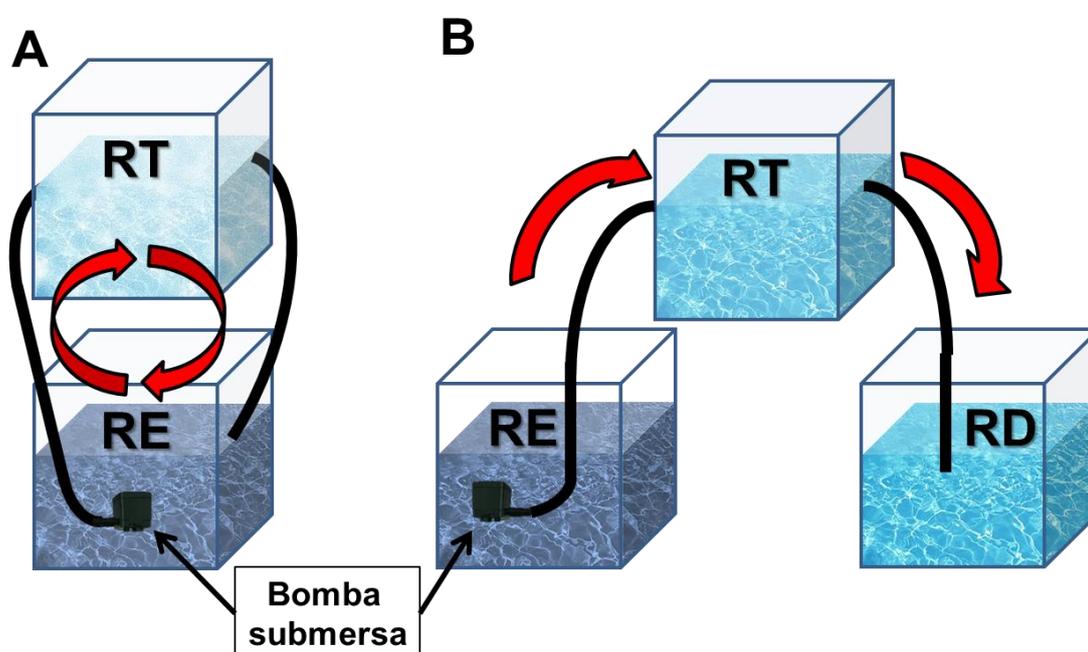


Figura 2.1. Esquema de funcionamento do sistema fechado (A) e sistema aberto (B). Setas vermelhas indicam o sentido de circulação da água impulsionada pela bomba submersa. Reservatório Estoque RE; Reservatório Teste RT; Reservatório de Descarte RD.

No sistema aberto um terceiro recipiente é adicionado ao conjunto, chamado de Reservatório de Descarte (RD). Para este tipo de experimento o RE permanece com a bomba submersa, entretanto a tubulação de saída do

líquido passa a despejar no RD o líquido resultante da mistura no RT. Em função desta saída de solução do sistema, o RE deve ser constantemente abastecido para manter a velocidade de mistura no RT. A diferença na coluna de líquido no RE pode causar variação no fluxo para o RT, logo é importante que o RE mantenha um volume estável garantido por constante reposição. O RD também deve ser observado para evitar o extravasamento de seu conteúdo.

Nos experimentos foram avaliados gastrópodos da espécie *Stramonita brasiliensis* (Fig. 2.1) e os bivalves *Perna perna* e *Crassostrea gigas* (Fig. 1.1.). Os experimentos com sistema aberto iniciaram com o RT com salinidade 35‰ e o RE com salinidade 0 ou 70‰. A velocidade de bombeamento foi de 200 ml/min. Nos experimentos com *S. brasiliensis* os animais apresentaram grande tolerância às variações de salinidade, permanecendo por horas em salinidade 0, a partir do tempo de 50min, a água foi trocada manualmente até alcançar o mesmo valor do RE, o tempo para este procedimento foi padronizado em 10 min, o que resultou em um período de 1h para alcançar a concentração final estabelecida. Este procedimento foi adotado porque a partir deste ponto (60 min) a alteração na salinidade no RT ocorre de maneira muito lenta, e, principalmente porque não foi observada mudança no padrão de comportamento dos gastrópodos avaliados. Este procedimento não foi adotado com os bivalves, que são mais sensíveis à movimentação no ambiente. Além disso, estes animais fechavam definitivamente as valvas antes desse ponto. Para melhorar a visualização do animal em experimento e para evitar o contato do mesmo com a barra magnética no fundo do RT, foi colocado um anteparo

que evitava que os organismos entrassem em contato com o fundo do recipiente.

Para a realização dos experimentos foram avaliados 6 animais por condição experimental. Os bivalves tinham maior comprimento da concha de 13 ± 2 cm, os gastrópodos tinham o maior comprimento da concha de 4 ± 1 cm. O RT no qual os animais foram acondicionados tinha capacidade de 5L de solução, a qual variou a salinidade conforme passava o tempo de experimento. A água permaneceu em temperatura ambiente $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante a primeira hora de experimento os moluscos foram assistidos ininterruptamente, na segunda hora a cada cinco minutos e posteriormente a cada dez minutos.

Análise estatística

A análise dos dados de dosagens osmótica e iônicas foi realizada por *Two Way ANOVA* com *post hoc* de Tukey para dados com distribuição normal e por *Two Way ANOVA on Ranks* com *post hoc* de Dunn's para dados não normais. Os dados de teor hídrico tecidual e a análise dos dados do experimento *in vitro* foram avaliados por *Two Way ANOVA*, sendo o primeiro fator correspondente ao tratamento e o segundo ao tempo, com *post hoc* de Tukey para dados não normais. O limite de significância considerado foi 0,05.

Resultados

O sistema aberto sem interferência (Fig. 3.2) apresentou na condição hiperosmótica o aumento progressivo na salinidade do RT do tempo 0 até 50 min. e manteve a concentração estável até o tempo final (60 min). Na variação hiposmótica, a salinidade diminuiu sucessivamente até o tempo de 45 min que não foi diferente de 50min e este igual a 55 min que teve salinidade igual a 60min. Em exposição a este sistema (Fig. 3.3) indivíduos de *P. perna* em choque hiperosmótico fecharam as conchas em tempos que variaram de 28 a 48 min e salinidades de 57 a 65. A ostra *C. gigas* em choque hiperosmótico fechou a concha entre os tempos de 18 e 29 min e salinidade de 52 a 60. Em exposições hiposmóticas indivíduos de *P. perna* fecharam a concha em tempos de 15 a 32 min e salinidades de 20 a 11. As ostras *C. gigas* na mesma condição fecharam as conchas nos tempos de 24 a 35 min e salinidade de 15 a 10.

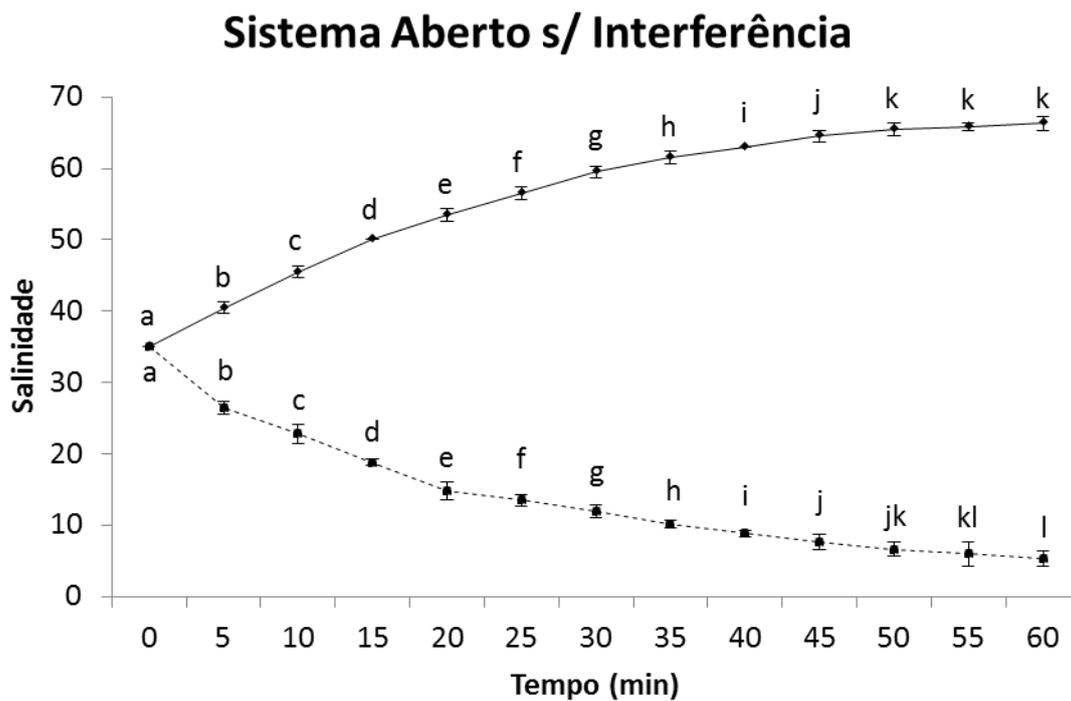


Figura 3.2. Curso temporal das alterações de salinidade observadas no reservatório teste, em sistema aberto (com reposição constante).

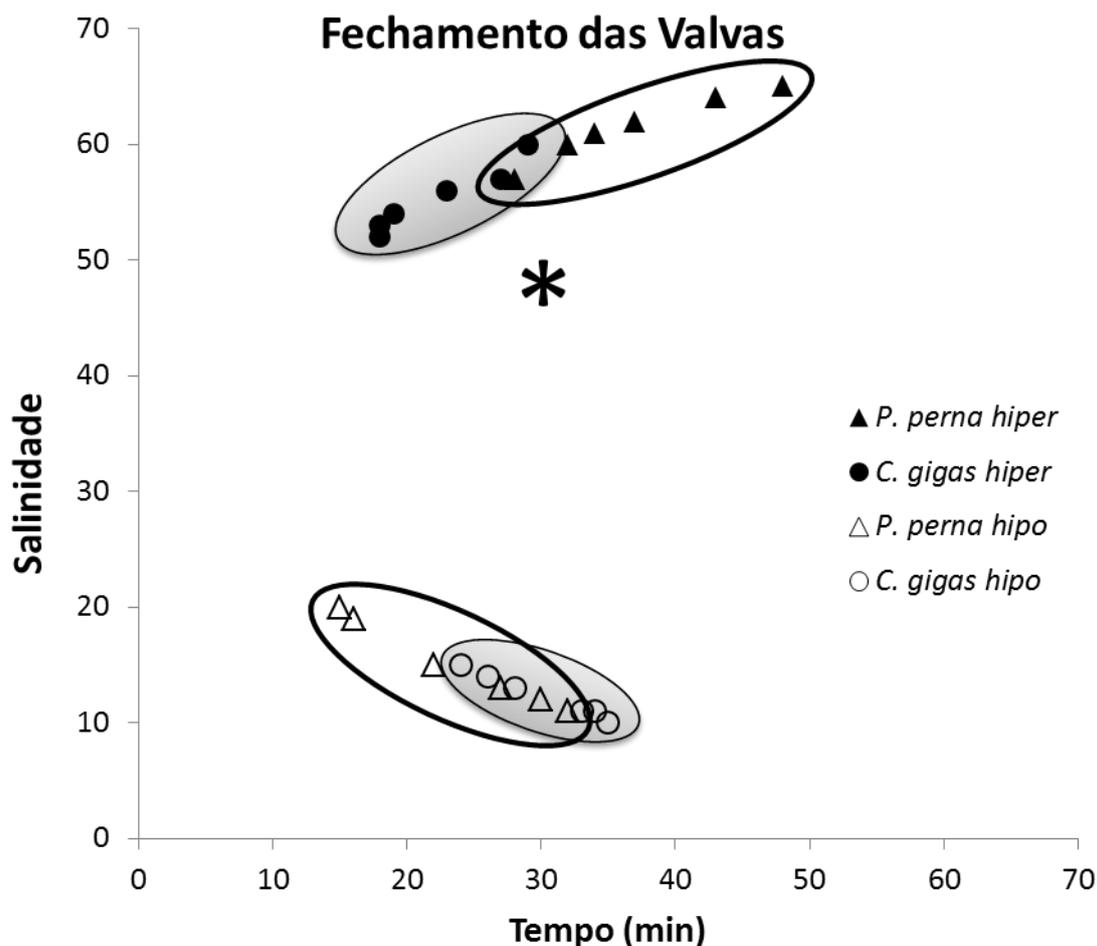


Figura 3.3. Curso temporal representando individualmente (n=6) o momento de fechamento das valvas diante das alterações de salinidade. Marcadores sem preenchimento indicam redução de salinidade; marcadores preenchidos indicam aumento de salinidade. Asterisco indica condição em que as respostas das espécies foram estatisticamente diferentes. Elipses sem preenchimento destacam os grupamentos de *P. perna*; elipses cinza destacam os grupamentos de *C. gigas*.

Na padronização do sistema fechado com interferência (Fig. 3.4A) na condição hiperosmótica a concentração salina aumenta rapidamente até 15min, na sequência a alteração é mais lenta até o tempo de 50min, a partir deste ponto com a substituição manual da água a salinidade desejada (~52) é alcançada. Na condição hiposmótica a salinidade baixa mais rapidamente até 25min, então cai mais lentamente até 50min e com a manipulação volta a cair rapidamente para a salinidade de ~17. No sistema aberto com interferência (Fig. 3.4B) de variação hipersalina a salinidade aumentou rapidamente até os

40min, subindo mais lentamente até 50min e com manipulação alcançou a salinidade 70 em 60min. A variação no sistema aberto com interferência no teste hiposmótico a salinidade caiu mais rapidamente até 25min, depois disso caiu lentamente até os 50min e após a manipulação chegou a salinidade 0 em 60min.

A avaliação das respostas de *S. brasiliensis* ocorreu em sistema aberto com interferência (Tab. 9). O tempo foi contado até o momento da queda dos indivíduos da superfície vertical. Em choque hiposmótico o tempo de queda variou de 1:14h a >9h (n=6). Em choque hipersalino a variação no tempo de queda foi de 50min até 7:10h.

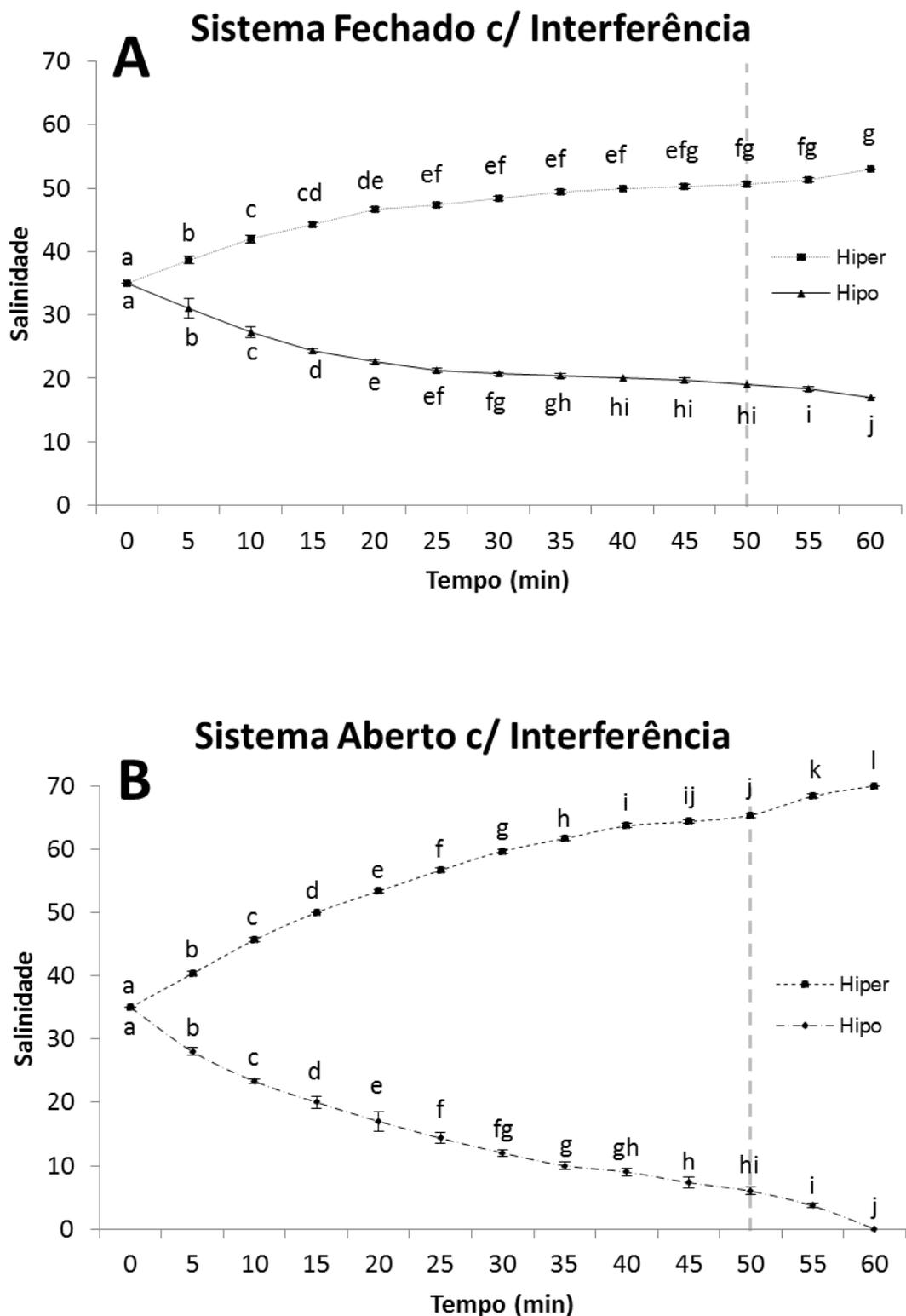


Figura 3.4. Curso temporal da variação de salinidade com alteração manual do conteúdo no reservatório teste a partir de 50 min. Traço sectionado cinza indica o momento que iniciou a troca manual da solução. Sistema fechado de circulação (A); Sistema aberto de circulação (B).

Tabela 3.1. Tempos em que os indivíduos de *S. brasiliensis* soltaram-se das superfícies verticais após variação que iniciou na salinidade 35.

Tempo de queda	
Choque Hiposmótico Salinidade 0	Choque Hiperosmótico Salinidade 70
01:14	00:59*
01:16	01:07
04:09	02:45
06:12	02:48
06:20	04:20
>09:00	07:10

Obs.: Asterisco (*) indica um indivíduo que se soltou da superfície vertical antes da água do reservatório teste alcançar a salinidade final. Salinidade de ~70 no momento da queda.

Reações intermediárias

Durante o período de exposição os animais apresentaram respostas comportamentais anteriores às aqui consideradas “respostas finais”, que no caso de *S. brasiliensis* seriam queda e para os bivalves *P. perna* e *C. gigas* foi o fechamento definitivo das valvas. Foi considerado fechamento definitivo o momento em que os animais uniam as conchas sem deixar espaço entre elas e após 15min não foi observada a reabertura das valvas. Para estes comportamentos intermediários não foram realizadas observações sistematizadas. Os mesmos são descritos com base na tendência comportamental observada durante o período em que se aguardou as respostas finais.

Com o aumento da variação nas salinidades tanto no choque hiposmótico quanto no choque hiperosmótico, cada espécie expressou reações

distintas. Nos gastrópodos que se deslocam pelo interior do RT a primeira reação foi parar o deslocamento. Na sequência os caramujos recolheram gradual e lentamente seus órgãos sensoriais (olhos) e posteriormente os sifões. O recolhimento dos olhos e do sifão ocorre antes da salinidade alcançar o seu ápice. Simultaneamente os animais se contraíam diminuindo o espaço entre a concha e a parede do RT. Foi possível perceber que com o passar do tempo a camada de muco que envolve o corpo destes caracóis se tornou mais espessa. Variando de tempo e entre os indivíduos, porém de modo semelhante foi observado que os gastrópodos soltavam aos poucos a “sola” do pé muscular da superfície a qual estavam aderidos, até que a parte aderida não era suficiente para suportar o peso do animal.

O mexilhão *P. perna* em condição controle/normal permanece por longos períodos com as valvas abertas liberando os resíduos de sua alimentação. Quando transcorre a variação de salinidade, a primeira reação observada é a substituição da liberação de resíduos que a princípio tinha uma conformação mais delgada, por um material com estrutura mais grossa. Posteriormente é interrompida a liberação deste material. Na sequência o mexilhão continua com as conchas abertas, contudo eventualmente eles as fecham vigorosamente e com o passar do tempo e consequente aumento na variação de salinidade, a amplitude da abertura e o vigor do fechamento diminuem até que as mesmas fecham-se definitivamente.

A ostra *C. gigas* em condição controle/normal mantém as valvas abertas e eventualmente fecha-as abruptamente o que libera no meio os resíduos de sua alimentação. Durante os experimentos foi observado que inicialmente os animais passam a fechar e abrir as conchas com maior frequência, entretanto a

velocidade e a constância destes movimentos vão diminuindo progressivamente a medida que a condição piora. Também é observada a interrupção na liberação de resíduos no ambiente. A espécie também diminui gradualmente a distância entre as valvas até que as mesmas são fechadas definitivamente.

Após as respostas finais no RT os animais foram recolocados no aquário estoque para a verificação de sua recuperação. Os animais foram observados por dois dias. Para distinção dos mesmos foram feitas marcações individuais. Entre as três espécies houve morte de um indivíduo de *P. perna* um dia após o experimento e de um indivíduo de *C. gigas* após dois dias.

Discussão

O SAFA mostrou-se eficiente, visto que as alterações de salinidade puderam ser realizadas de modo gradual conforme o esperado. Estes resultados foram obtidos com o uso de uma metodologia simples e de baixo custo. De fato existem alternativas mais precisas para a simulação de variações ambientais, todavia, estas normalmente carecem de complexas ferramentas matemáticas para se calcular de modo preciso o regime de variação de fatores abióticos em um estuário específico, pois existem enormes variações entre os estuários e dentro do mesmo estuário (Gross *et al.*, 1999; Chua 2013). Mas como tais ambientes são extremamente variáveis, o que dificulta a tarefa de simplesmente defini-los (Elliott & McLusky, 2002), a utilização de uma metodologia generalista pode responder a diversas perguntas relevantes. Uma metodologia semelhante simulou a variação de salinidade para avaliar a resposta comportamental de larvas de crustáceos (Forward, 1989), porém este trabalho não relacionou as respostas à fisiologia dos animais. O padrão gradual de mudança dos fatores abióticos pode ser comparado com as variações naturais que ocorrem em regiões estuarinas e poças de maré (Willmer *et al.*, 2005; Amado *et al.*, 2011). Desta forma, foi possível observar as respostas comportamentais dos animais durante o transcorrer das alterações de salinidade, simulando o que ocorre em seu ambiente natural. Tanto os bivalves quanto o gastrópodo são encontrados em ambientes variáveis. O mexilhão *P. perna* pode ser encontrado em costões rochosos instáveis e com influência de fortes ondas, porém o animal é tão bem adaptado, que cresce mais rápido e tem maior longevidade nestes ambientes

extremamente variáveis (McQuaid & Lindsay, 2000). As ostras *C. gigas* também podem ser encontradas em regiões variáveis como estuários, e maior parte de sua dieta pode ser constituída de itens oriundos de rios, o que indica que nos momentos de maior diluição do meio o animal esta filtrando as partículas alimentares (Riera & Richard, 1996). Também habitante de ambientes variáveis, *S. brasiliensis*, para manter-se nos costões rochosos de sua distribuição natural, deve apresentar características que possibilitem o seu desenvolvimento (Claremont *et al.*, 2011). Em cultivos de mexilhões o caramujo *S. brasiliensis* é o predador mais comum e também está sujeito às alterações ambientais que os bivalves cultivados (Macedo *et al.*, 2012). Além disso, animais podem exibir resposta comportamental, buscando se isolar do meio ou deslocando-se para outro lugar (Michalec *et al.*, 2010). São exemplos destes comportamentos o fechamento de concha, opérculo, ou escudo e tergos, (Berger & Kharazova, 1997)

As respostas fisiológicas e comportamentais dos animais podem refletir suas “preferências” e limites de tolerância. A queda da superfície vertical de *S. brasiliensis* após longos períodos de exposição a salinidades extremas (>9h em 0 e > 7h em 70) indica que estas condições superaram a capacidade do animal de resistir a ambientes tão hostis. Visto que em condições normais, mesmo que estas exijam uma fixação mais forte, os caramujos permanecem firmemente aderidos aos substratos. Provavelmente o muco manteve suas propriedades adesivas, entretanto o fluxo de água e íons pelas células e tecidos dos animais deva ter levado seu organismo a um colapso, sendo os momentos antes da queda o limite de sua tolerância. Os gastrópodos rastejantes deslizam pelos diversos substratos sobre uma fina camada de

muco (Denny, 1980). Esta camada adesiva em condições normais é suficiente para manter os animais fixos mesmo sob a ação de fortes ondas nos mais diversos tipos de substratos. Alguns gastrópodos podem ocupar substratos de diferentes composições químicas e características topográficas, e essa relação pode influenciar a colonização de certo ambiente (Kershner & Lodge, 1990). As reações anteriores à queda em *S. brasiliensis* também podem trazer informações relevantes relacionadas com a fisiologia da espécie. A primeira reação percebida foi a parada no deslocamento no interior do RT. Provavelmente este seria o momento que os animais começam a “perceber” as alterações ambientais. Na sequência os caracóis começam a recolher os órgãos sensoriais (olhos), o sifão é recolhido mais lentamente e o pé vai diminuindo progressivamente sua área de contato com a superfície do RT até a queda. Esta sequência de eventos ocorre concomitantemente com a variação da salinidade tanto na concentração quanto na diluição do meio, indicando que as respostas apresentadas são progressivas e diretamente relacionadas com o agravamento da condição do meio.

As respostas a alterações ambientais são expressas de maneiras diferentes entre os moluscos. O principal aspecto relacionado à resistência, no caso de gastrópodos e bivalves, é o isolamento provido pelas conchas. Tão eficiente é o isolamento possibilitado pelas conchas dos bivalves, que para mensurar a concentração da hemolinfa diante de variações no meio, anteparos são colocados entre as valvas para evitar o fechamento das mesmas e permitir que a concentração da hemolinfa acompanhe as mudanças ambientais (Shumway, 1977; Ruiz & Souza, 2008). Nos testes aqui realizados o intuito era justamente averiguar em que salinidade os animais iriam fechar as conchas

naturalmente. Assim como aconteceu com *S. brasiliensis*, antes do fechamento definitivo os animais apresentaram uma sequência de comportamentos intermediários. A maior parte da literatura que aborda o comportamento dos bivalves busca respostas acerca da variação nas atividades de alimentação e escavação (Yeager *et al.*, 1994; Galimany *et al.*, 2013). Porém, a variação da resposta comportamental a alterações do meio já foi medida em *Corbicula fluminea*, para monitoramento ambiental, através da observação de suas reações diante de contaminações ambientais. Para isto foram utilizados sensores, fixos nas conchas do animal, que registraram o tempo de abertura e a distância entre as valvas (Allen *et al.*, 1996). Diferentemente, neste trabalho buscou-se determinar as respostas diante de variação de salinidade através da observação direta do momento em que os animais fechavam-se. A movimentação das valvas também foi avaliada em bivalves de água doce (família Unionidae) expostos ao ar, detalhando como estes mexilhões tinham que abrir suas conchas para permitir rápidas trocas gasosas com o ar atmosférico (Byrne & McMahon, 1994). Este tipo de avaliação não foi foco deste estudo, pois estes animais foram adquiridos em cultivos comerciais onde ficam permanentemente submersos. Posteriormente um estudo semelhante possa ser realizado comparando a resposta de animais cultivados a de moluscos de ambientes naturais.

A diferença entre *P. perna* e *C. gigas* no tempo de fechamento das valvas (Fig. 3.3) foi constatada no tratamento hiperosmótico. Este resultado pode ser relacionado com a distribuição original das espécies. O mexilhão *P. perna* tem sua distribuição mais relacionada à áreas costeiras mais expostas ao mar aberto, e eventualmente pode ficar fora da água e ser exposto a

concentrações na salinidade. Já as ostras da família Crassostrea, incluindo *C. gigas*, apresentam distribuição mais relacionada ao ambiente estuarino, o qual dificilmente é exposto a aumentos de salinidade além da concentração marinha normal em torno de 35, principalmente se os animais estiverem fixados em áreas mais internas.

Conclusões

A utilização do sistema avaliado mostrou a variação temporal nas respostas finais, de queda para os gastrópodos e de fechamento das conchas para os bivalves, quais seriam os tempos e as salinidades esperadas para estes eventos. Além disso, existe a possibilidade de observação da sequência de respostas comportamentais intermediárias, as quais podem ser interpretadas e aliadas a respostas fisiológicas na busca de explicações para as respostas dos animais a diferentes estresses ambientais, tanto naturais quanto antrópicos.

As reações intermediárias das espécies carecem de uma observação mais sistemática, a qual não foi foco deste trabalho, que poderá elucidar seu significado e contribuir com a compreensão das respostas comportamentais das espécies avaliadas.

A espécie *S. brasiliensis* mostrou-se extremamente tolerante a condições extremas de salinidade por longos períodos de exposição, superando as expectativas para as condições avaliadas. Estes resultados condizem com o status de eficiente predador em costões rochosos e em áreas de cultivo. Embora os resultados do capítulo 2 tenham morrido animais na salinidade 0, isto provavelmente ocorreu em função do choque abrupto, diferente da variação gradual que o SAFA propicia.

Diferenças constatadas entre os bivalves avaliados em choques hiperosmóticos podem ser relacionadas com a distribuição natural das espécies. Os mexilhões de costões rochosos podem ser expostos ao ar ou ficar

em possas de maré, as quais podem ser atingidas pela radiação solar e por evaporação alcançar altas salinidades. Para as ostras por sua vez, é improvável que venham a se enfrentar naturalmente condições hipersalinas, o que explica sua menor tolerância.

Referências

- Alberti, J., Casariego, A. M., Daleo, P., *et al.* (2010). Abiotic stress mediates top-down and bottom-up control in a Southwestern Atlantic salt marsh. *Oecologia*, 163(1), 181-191.
- Allen, H. J., Waller, W. T., Acevedo, M. F., *et al.* (1996). A minimally invasive technique to monitor valve-movement behavior in bivalves. *Environmental technology*, 17(5), 501-507.
- Barnosky, A. D. (2001). Distinguishing the effects of the Red Queen and Court Jester on miocene mammal evolution in the northern Rocky Mountains. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 21(1), 172-185.
- Berger, V. J. & Kharazova, A. D. (1997). Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*, 355, 115-126.
- Byrne, R. A., & McMahon, R. F. (1994). Behavioral and physiological responses to emersion in freshwater bivalves. *American Zoologist*, 34(2), 194-204.
- Cash, K. J., Culp, J. M., Dubé, M. G., *et al.*, (2003). Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for ecosystem health. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 6(2), 177-183.
- Chua, V. P. (2013). Modeling the variations of freshwater inflows and tidal mixing on estuarine circulation and salt flux. *Journal of Coastal Research*. DOI: 10.2112/JCOASTRES-D-12-00143.

- Claremont, M., Williams, S. T., Barraclough, T. G., & Reid, D. G. (2011). The geographic scale of speciation in a marine snail with high dispersal potential. *Journal of Biogeography*, 38(6), 1016-1032.
- Clements, W. H. (2004). Small-scale experiments support causal relationships between metal contamination and macroinvertebrate community responses. *Ecological Applications*, 14(3), 954-967.
- Colbert, E. H., Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (1946). Temperature tolerances in the American alligator and their bearing on the habits, evolution, and extinction of the dinosaurs. *Bulletin of the AMNH*; 86(7), 333-373.
- Culp, J. M., Lowell, R. B., & Cash, K. J. (2000). Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4), 1167-1173.
- Denny, M. (1980). The role of gastropod pedal mucus in locomotion. *Nature* 285, 160 - 161
- Drenner, R. W., & Mazumder, A. (1999). Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: comment. *Ecology*, 80(3), 1081-1085.
- Dudzik, M., Harte, J., Jassby, A., Lapan, E., Levy, D., & Rees, J. (1979). Some considerations in the design of aquatic microcosms for plankton studies. *International Journal of Environmental Studies*, 13(2), 125-130.
- Dutilleul, P. (1993). Spatial heterogeneity and the design of ecological field experiments. *Ecology*, 1646-1658.

- Elliott, M., & McLusky, D. S. (2002). The need for definitions in understanding estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(6), 815-827.
- Escalera-Vázquez, L. H., & Zambrano, L. (2010). The effect of seasonal variation in abiotic factors on fish community structure in temporary and permanent pools in a tropical wetland. *Freshwater Biology*, 55(12), 2557-2569.
- Festing, M. F. (1992). The scope for improving the design of laboratory animal experiments. *Laboratory animals*, 26(4), 256-268.
- Forward, R. B. (1989). Behavioral responses of crustacean larvae to rates of salinity change. *The Biological Bulletin*, 176(3), 229-238.
- Fraser, L. H. (1999). The use of microcosms as an experimental approach to understanding terrestrial ecosystem functioning. *Advances in Space Research*, 24(3), 297-302.
- Freire, C. A., Amado, E. M Souza, L. R., *et al.*, (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 149(4), 435-446.
- Galimany, E., Rose, J. M., Dixon, M. S., & Wikfors, G. H. (2013). Quantifying feeding behavior of ribbed mussels (*Geukensia demissa*) in two urban sites (Long Island Sound, USA) with different seston characteristics. *Estuaries and Coasts*, 1-9.

- Ganning, B. (1967). Laboratory experiments in the ecological work on rockpool animals with special notes on the ostracod *Heterocypris salinus*. *Helgoland Marine Research*, 15(1), 27-40.
- Gross, E. S., Koseff, J. R., & Monismith, S. G. (1999). Evaluation of advective schemes for estuarine salinity simulations. *Journal of Hydraulic Engineering*, 125(1), 32-46.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., *et al.* (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14288-14293.
- Heip, C. (1988). Biota and abiotic environment in the Westerschelde estuary. *Aquatic Ecology*, 22(1), 31-34.
- Hoffmann, A. A., & Hercus, M. J. (2000). Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience*, 50(3), 217-226.
- Hurlbert, S. H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological monographs*, 54(2), 187-211.
- Imbrie, J., Berger, A., Boyle, E. A., *et al.* (1993). The 100,000-year cycle. *Paleoceanography*, 8(6), 699-735.
- Jaspers, C., Møller, L. F., & Kiørboe, T. (2011). Salinity gradient of the Baltic Sea limits the reproduction and population expansion of the newly invaded comb jelly *Mnemiopsis leidyi*. *Plos One*, 6(8), e24065.

- Kershner, M. W., & Lodge, D. M. (1990). Effect of substrate architecture on aquatic gastropod-substrate associations. *Journal of the North American Benthological Society*, 319-326.
- Macedo, P. P. B., Masunari, S., & Corbetta, R. (2012). Decapod crustaceans associated with farming ropes of the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758)(Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) from Armacao do Itapocoroy Bay, Penha-SC. *Biota Neotropica*, 12(2), 185-195.
- McQuaid, C. D., & Lindsay, T. L. (2000). Effect of wave exposure on growth and mortality rates of the mussel *Perna perna*: bottom up regulation of intertidal populations. *Marine Ecology Progress Series*, 206, 147-154.
- Melzner, F., Stange, P., Trübenbach, K., *et al.*, (2011). Food supply and seawater pCO₂ impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PloS one*, 6(9), e24223.
- Medina Jr, P. B., & Rietzler, A. C. (2005). Limnological study of a Pantanal saline lake. *Brazilian Journal of Biology*, 65(4), 651-659.
- Michalec, F., Souissi, S., Dur, G., *et al.* 2010. Differences in behavioral responses of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) adults to salinity variations. *Journal of Plankton Research*, 32: 805-813.
- Moyle, P. B., & Light, T. (1996). Fish invasions in California: do abiotic factors determine success? *Ecology*, 1666-1670.
- Newman, M. C., & Clements, W. H. (2007). *Ecotoxicology: A comprehensive treatment*. CRC, Boca Raton, 882 pp

- Nicolas, D., Lobry, J., Lepage, M., *et al.* (2010). Fish under influence: a macroecological analysis of relations between fish species richness and environmental gradients among European tidal estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86(1), 137-147.
- Odum, E. P. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34 (9), 558-562.
- Oksanen, L. (2003). Logic of experiments in ecology: is pseudoreplication a pseudoissue?. *Oikos*, 94(1), 27-38.
- Overpeck, J., Hughen, K., Hardy, D., *et al.* (1997). Arctic environmental change of the last four centuries. *Science*, 278(5341), 1251-1256.
- Prodocimo, V., & Freire, C. A. (2004). Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 37(1), 1-5.
- Prodocimo, V., & Freire, C. A. (2006). The Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo- and hyper-regulation of plasma osmolality. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 142, 347-355.
- Rajalakshmi, S., Krishnamoorthy, G., & Deepa, P. V. (2010). Seasonal variations of abiotic factors in Sodalaipuri Estuary, Puducherry, India. *Nature, Environment and Pollution Technology*, 9(2), 223-228.
- Riera, P., & Richard, P. (1996). Isotopic determination of food sources of *Crassostrea gigas* along a trophic gradient in the estuarine bay of Marennes-Oléron. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42(3), 347-360.

- Rocha, P. C. (2010). Indicadores de alteração hidrológica no Alto Rio Paraná: intervenções humanas e implicações na dinâmica do ambiente. *Revista Sociedade & Natureza*, 22 (1): 191-211.
- Ruiz, J. L., & Souza, M. M. (2008). Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(3), 399-406.
- Santos, I. A., Castellano, G. C. & Freire, C. A. (2013). Direct relationship between osmotic and ionic conforming behavior and tissue water regulatory capacity in echinoids. *Comparative Biochemistry and Physiology A*: 164: 466-476.
- Sastry, A. N. (1963). Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *The Biological Bulletin*, 125(1), 146-153.
- Schoener, T. W. (1983). Field experiments on interspecific competition. *American Naturalist*, 240-285.
- Shumway, S. E. (1977). Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology*, 41(2), 153-177.
- Shumway, S. E., & Youngson, A. (1979). The effects of fluctuating salinity on the physiology of *Modiolus demissus* (Dillwyn). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40(2), 167-181.

- Sih, A., Crowley, P., McPeck, M., Petranka, J., & Strohmeier, K. (1985). Predation, competition, and prey communities: a review of field experiments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 269-311.
- Singh, N., Kumar, P., & Singh, D. K. (2012). Variant abiotic factors and the infection of *Fasciola gigantica* larval stages in vector snail *Indoplanorbis exustus*. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2(2), B110-B117.
- Tockner, K., Pennetzdorfer, D., Reiner, N., Schiemer, F., & Ward, J. V. (1999). Hydrological connectivity, and the exchange of organic matter and nutrients in a dynamic river–floodplain system (Danube, Austria). *Freshwater Biology*, 41(3), 521-535.
- Wingfield, J. C. (2013). Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Functional Ecology*. 27, 37-44.
- Yeager, M. M., Cherry, D. S., & Neves, R. J. (1994). Feeding and burrowing behaviors of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of the North American Benthological Society*, 217-222.

Conclusões Gerais

De forma geral os resultados do capítulo um e três se complementam, apresentando resultados que evidenciam as conclusões acerca das respostas fisiológicas dos bivalves diante dos desafios impostos. Mostrando que *P. perna* tolera maiores variações de salinidades e que *C. gigas* lida melhor com baixas temperaturas. Os tratamentos com salinidade 0 em geral não mostraram muitas diferenças no padrão de resposta das espécies. No capítulo dois é salientada a grande tolerância de *S. brasiliensis* a variações de salinidade.

No primeiro capítulo os resultados de osmolalidade e de cloreto, o íon com maior concentração na hemolinfa, indicam que na menor temperatura (10°C) *C. gigas* manteve maior estabilidade na concentração da hemolinfa do que *P. perna*, o que evidencia a melhor manutenção da homeostasia pela ostra nesta temperatura. Nas demais dosagens as duas espécies mantiveram o mesmo padrão de resposta, com semelhança entre as concentrações em salinidade 0 e 35 e com aumento da concentração na salinidade 45. As dosagens de potássio no tratamento com salinidade 0 em 20°C, que mesmo sendo a temperatura controle, também apoiam a conclusão em que *P. perna* tem maior adaptação a maiores salinidade, pois houve aumento da concentração do íon na hemolinfa comparado com as demais condições, resultado que aponta que houve lise celular, um indicativo da dificuldade de manutenção da homeostasia nesta condição.

Os resultados de TH apresentaram diferenças de padrão de resposta em função de um erro metodológico, pois foram realizadas avaliações com tecidos diferentes, gônadas que apresentam grande quantidade de lipídios em *P. perna*

e músculo adutor que tem maior volume de água em *C. gigas*. Entretanto estes dados corroboram com as informações do experimento de avaliação *in vitro* com choque de 30% em tecidos diferentes. Em ambos os experimentos foi evidente a diferença na resposta entre os tecidos expostos à mesma condição experimental. Nos experimentos *in vitro* com o tecido do manto ficou claro que *P. perna* manteve o volume dos tecidos mais próximos do controle do que *C. gigas*, resultados que foram mostrados na variação de 30% e reforçados na variação de 50% nas salinas experimentais hiper e hiposmóticas. Esta condição explica a maior amplitude de variação na concentração da hemolinfa observada na salinidade 45 observada no mexilhão, pois mesmo que sua hemolinfa concentre-se mais, os tecidos do animal conseguem lidar melhor com a condição hiperosmótica do que a ostra. Finalmente os resultados do capítulo três que comparam os tempos em que os animais fecham as conchas em choques hiperosmóticos corroboram com a informação de maior tolerância do mexilhão por soluções mais salinas. Visto que nesta condição *P. perna* fecha a concha em maiores salinidades do que *C. gigas*, indicando maior tolerância do mexilhão a condições de maior concentração do meio.

O capítulo dois destaca a grande amplitude de tolerância de *S. brasiliensis* as variações de salinidade impostas. As primeiras quedas de superfícies verticais só foram verificadas a partir de níveis de concentração próximos dos limites estabelecidos para os experimentos (salinidades 0 e 70) até tempos de exposição muito longos (>7h em salinidade 0 e > 9h em 70). O momento da queda pode ser o ápice de tolerância, mas em face da grande amplitude entre os tempos, são necessários mais testes para estabelecer um vínculo entre este comportamento e as respostas fisiológicas da espécie.