

ELLEN NELY RODRIGUES

**EFEITO DO ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO SOBRE A REGULAÇÃO IÔNICA E
AS PROTEÍNAS DA HEMOLINFA DO CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus*
(DECAPODA, PALAEMONIDAE).**

Monografia referente à conclusão do
Bacharelado em Ciências Biológicas
apresentado ao Departamento de
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná.
Orientadora Prof^a Dr^a Carolina A. Freire

CURITIBA
1999

“É verdade que existe um preço para tudo, mas este preço é relativo. Quando seguimos nossos sonhos, podemos dar a impressão aos outros de que somos miseráveis e infelizes. Mas o que os outros pensam não importa: o que importa é a alegria em nosso coração.”

Ao meu pai Euclides Joaquim
Rodrigues e à minha mãe Nelci
Terezinha Rodrigues, por tudo !!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, e em especial:

Ao professor Luiz Cláudio Fernandes pelo empréstimo da cuba de eletroforese, da fonte, do espectrofotômetro e do pHmetro, e também pelo seu prestativo auxílio ao esclarecer dúvidas encontradas no decorrer das atividades.

À minha professora e amiga Carolina Arruda Freire que me orientou, mas principalmente me incentivou inúmeras vezes, sempre dando aquela certeza de que tudo ia dar certo.

À Alessandra, Marisa, Claudinha, Osvaldo, Sandro e todos que trabalham no Departamento de Fisiologia que me apoiaram.

Ao meu pai, mãe, irmã Anne Cristine Rodrigues e madrinha Maria Arlete K. Marcondes que mesmo sem entender direito o porquê que eu tinha que ficar até à noite no laboratório me ajudaram muito, estando sempre disponíveis para ouvir, apoiar e comemorar.

Ao Kleber que aguentou meu mau-humor, choros, incertezas e ainda me apoiou e acreditou que “um dia o gel iria correr certinho”.

Às minhas amigas Fabíola, Gica, Marise, Monaliza, Fafá e Viviane que com pequenos gestos nos momentos certos, me fizeram acreditar.

Vocês foram fundamentais para que este trabalho finalizasse, à vocês só me resta dizer muitíssimo obrigada, todos fazem parte desta monografia.

ÍNDICE

SUMÁRIO.....	vi
RESUMO.....	vii
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	07
MATERIAL E MÉTODOS.....	08
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

RESUMO

O ambiente aquático impõe desafios à manutenção de um nível adequado de água e de solutos intra e extracelulares, principalmente quando se trata de ambientes de salinidade variável, como o ambiente estuarino. A função da osmorregulação envolve o controle do transporte de sais e o movimento de água entre o meio externo e o meio extracelular através dos epitélios de interface; em crustáceos: brânquias, glândula antenal e a parede do corpo durante certas fases do ciclo de muda; para compensar a perda e/ou ganho destes por difusão passiva. Tendo em vista os efeitos da salinidade sobre os crustáceos eurihalinos, o objetivo deste trabalho foi o de verificar a capacidade de regulação iônica da espécie *Macrobrachium acanthurus* quando submetida a um estresse salino e osmótico utilizando-se a concentração de cloreto, magnésio, proteínas totais e o padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa como variáveis experimentais. O camarão de água doce (0‰) *Macrobrachium acanthurus* foi submetido a um estresse salino e osmótico agudo (1 e 6 horas) e crônico (5 e 10 dias), nas salinidades de 12‰ e 28‰. Em seguida a hemolinfa foi retirada por punção cardíaca e foi analisada quanto à sua concentração de cloreto, magnésio e proteínas totais através de métodos colorimétricos (Kits Labtest). Além disso as amostras foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os resultados mostraram que a espécie manteve a concentração de magnésio da hemolinfa estável e bem abaixo da concentração de magnésio da água experimental, mostrando grande capacidade de regulação deste íon pela sua glândula antenal, como já havia sido demonstrado para outras espécies desta família de camarão. A concentração de cloreto apresentou maiores flutuações, dependentes do tempo de exposição, resultado também encontrado para outras espécies desta família. A concentração de proteínas totais teve relativa constância havendo tendência para sua redução em altas salinidades e longo-prazo de exposição. O padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa desta espécie teve uma variação, onde foi possível notar um peptídeo a mais quando o animal foi exposto a 28‰ num tempo de 6 horas e dois peptídeos diferentes a mais quando o animal foi exposto a 28‰ num período de 10 dias. O peso molecular da hemocianina em 0‰ foi de aproximadamente 77kDa e em 12‰ foi de aproximadamente 85kDa e em 28‰ foi de aproximadamente 77kDa. Os resultados obtidos indicaram que esta espécie é uma forte hiper-hipo-reguladora de magnésio através da glândula antenal e regula cloreto razoavelmente através principalmente das brânquias. Houve ainda indicação de que o padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa pode sofrer pequenas alterações dependendo do estresse salino e osmótico a que são submetidos os animais, podendo ser uma das estratégias de osmorregulação desta espécie.

INTRODUÇÃO

Mais do que 2/3 (71%) da superfície terrestre é recoberta por água, sendo a maior parte oceano. O total de água doce em lagos e rios ocupa menos do que 1% da área e 0,01% do volume da água do mar. Toda a água contém substâncias dissolvidas como sais, gases e compostos orgânicos, e estas substâncias constituem os fatores de maior importância fisiológica. A água do mar contém cerca de 3,5% (g/100mL) ou 35‰ de sal. Os principais elementos contidos na água são sódio e cloreto, acompanhados de magnésio, enxofre e cálcio. A concentração total de sal da água do mar varia de acordo com a sua localização geográfica (Schmidt-Nielsen, 1996).

A água doce apresenta um conteúdo de solutos altamente variável. A salinidade da água doce pode variar entre 0‰ e 0,5‰, e os valores relativos dos diferentes íons podem apresentar grande variação. Intermediária entre a água do mar e a água doce, a água salobra ocorre em regiões litorâneas, onde a água do mar se mistura com a água doce, formando o ambiente denominado estuário. Este ambiente corresponde a menos de 1% da superfície terrestre. Nesta área a salinidade flutua bastante, principalmente devida à ação das marés, variando dentro de uma faixa que vai de 0,5‰ a 30‰. A água salobra é extremamente importante pois representa uma barreira natural para a distribuição de animais e também um ambiente de transição entre habitats marinhos e dulcícolas (Schmidt-Nielsen, 1996).

O ambiente aquático impõe desafios à manutenção de um nível adequado de água e de solutos intra e extracelulares, principalmente quando se trata de ambientes de salinidade variável, como o ambiente estuarino. A função da osmorregulação envolve o transporte de sais e o movimento de água entre o meio externo e o meio extracelular através dos epitélios de interface. Em crustáceos as brânquias, glândula antenal e a parede do corpo durante certas fases do ciclo de muda, fazem a osmorregulação para compensar a perda e/ou ganho destes por difusão passiva (Augusto, 1998; Schmidt-Nielsen, 1996; Péqueux, 1995).

A salinidade é um dos fatores físicos que afeta a reprodução e o desenvolvimento do animal em habitats onde este fator está sujeito a variações (Péqueux, 1995). Chen *et al* (1997) propõem o estudo aprofundado da salinidade

sobre os crustáceos decápodos em testes fisiológicos, devido ao desajuste no balanço osmótico destes animais, provocados pelas variações na salinidade do meio uma vez que o reajuste da concentração osmótica requer consideráveis quantias de energia.

Segundo Péqueux (1995), os crustáceos possuem diversas estratégias adaptativas relacionadas às concentrações diferenciadas entre o fluido extracelular (fluido corporal) e o meio aquático. Estas estratégias adaptativas caracterizam o animal como sendo osmoconformador ou osmorregulador. Osmoconformadores são animais que não regulam eficientemente a concentração dos fluidos corporais, “conformando-se” com o meio externo. Suas concentrações iônica e osmótica acompanham a variação no meio externo e o animal não sustenta gradientes de concentração em relação ao meio. Em contraste, os osmorreguladores mantêm sua concentração interna relativamente constante e diferente do meio externo, mantendo a homeostase osmótica do líquido extracelular (Péqueux, 1995; Randall *et al.*, 1997). Os animais osmorreguladores podem se manter hiper- ou hipo-osmóticos à água, dependendo da concentração do meio onde se encontram. Mantêm-se hiper-osmóticos em baixas salinidades e mantêm-se hipo-osmóticos em altas salinidades. É importante salientar que o volume do organismo e a concentração dos solutos devem ser mantidos dentro de limites bastante estreitos pois o funcionamento ótimo de um animal requer uma composição relativamente constante e bem definida de seus fluidos corpóreos. Então, desvios substanciais são geralmente incompatíveis com a vida (Schmidt-Nielsen, 1996). Pode-se ainda acrescentar que crustáceos de água doce são sempre hiper-osmorreguladores em água doce e crustáceos marinhos são em geral osmoconformadores em água do mar.

O fluido extracelular, que no caso dos crustáceos é a hemolinfa, é constituído principalmente pelo sal NaCl, outros íons inorgânicos como magnésio, potássio e cálcio, aminoácidos livres, proteínas, entre outros compostos orgânicos (McNamara, 1987; Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 1995). A concentração destes íons na hemolinfa dos camarões é diferente da concentração da água onde vivem, e isto é especialmente verdadeiro para animais de água doce, os quais são necessariamente hiper-osmorreguladores. Tais diferenças podem ser mantidas apenas se a superfície do corpo, incluindo o delgado epitélio branquial, for relativamente impermeável ao íon em questão. Mas em alguma proporção haverá fluxo iônico pois nenhum animal

pode ser completamente impermeável, principalmente nas brânquias, devido às trocas gasosas (O_2/CO_2). Portanto, os animais precisam ter mecanismos para a eliminação de alguns íons e para a absorção de outros íons. A concentração na hemolinfa de um íon que é ativamente secretado é menor do que sua concentração na água, enquanto que para um íon absorvido a situação é oposta, e sua concentração na hemolinfa é maior do que na água. A eliminação regulada de solutos é a principal função dos órgãos excretores, e é uma das principais funções do epitélio branquial (Schmidt-Nielsen, 1996).

A concentração dos íons cloreto (Cl) na hemolinfa dos crustáceos tem uma grande importância na osmorregulação, pois este está presente em maior quantidade, junto com o íon sódio (Na) tanto no ambiente aquático quanto na própria hemolinfa. As brânquias estão diretamente envolvidas com a regulação de NaCl na hemolinfa. Conforme as condições de salinidade e tempo de exposição de um animal a um estresse salino (submeter o animal a uma salinidade diferente da salinidade em que ele se encontrava), como uma das estratégias mais importante de osmorregulação, as brânquias trabalham ativamente a fim de estabelecer um equilíbrio entre o fluido interno (hemolinfa) e o meio externo, contrapondo os novos fluxos passivos que se estabeleceram (Péqueux, 1995).

Apesar do Na e Cl serem os constituintes quantitativamente mais relevantes, outros íons que não contribuem tanto para a osmolalidade do líquido extra-celular devem também ser estudados por sua relevância fisiológica. É interessante estudar a concentração de magnésio pois este íon é um agente anestésico que deprime a transmissão neuromuscular (Schmidt-Nielsen, 1996) e esta propriedade do magnésio pode exercer profundos efeitos fisiológicos sobre as junções neuromusculares dos crustáceos (Morrit, 1989). Robertson (1953) sugeriu que a baixa concentração de magnésio na hemolinfa está correlacionado com uma maior atividade motora de decápodos marinhos. Morrit e Spicer (1993) fazem uma revisão sobre este assunto, exemplificando com os anfípodos *Talitridae*, os quais são altamente ativos (organismos saltadores) e também possuem uma diminuição na concentração de magnésio na sua hemolinfa, da mesma forma que caranguejos como *Carcinus maenas* e *Pachygrapsus marmoratus*. Mas esta relação entre a baixa concentração de magnésio e a atividade do animal não está restrita à crustáceos; há

por exemplo, o esturjão russo *Acipenser queldenstaedti* que é menos eficiente na excreção de magnésio e possui altas quantidades de magnésio na sua hemolinfa, e é um animal de movimentos extremamente lentos (Morrit e Spicer, 1993). Do mesmo modo, crustáceos de movimentos lentos como *Maia squinado* e *Lithodes maia* apresentam altas concentrações de magnésio na hemolinfa (Morrit e Spicer, 1993).

Nos crustáceos o órgão de excreção do íon magnésio é a glândula antenal, localizada no cefalotórax, cuja abertura para o exterior é um poro excretor próximo à base das antenas. Em crustáceos marinhos, a glândula antenal, além de eliminar magnésio, elimina também sulfato e retém potássio e cálcio. A concentração urinária de magnésio varia muito, mas tende a aumentar substancialmente quando o animal é transferido para água do mar mais concentrada (Schmidt-Nielsen, 1996). Aparentemente o magnésio é ativamente transportado para a urina, enquanto ela se encontra na bexiga. Este transporte na bexiga pode explicar as grandes variações na concentração urinária de magnésio e as dificuldades na demonstração de uma relação estreita em relação às concentrações do meio externo (Gross e Capen, 1966).

Como mencionado anteriormente, a hemolinfa é constituída não somente de íons inorgânicos, como também de moléculas e íons orgânicos. A hemocianina é a proteína mais abundante, representando 95% do total de proteínas na hemolinfa, sendo o pigmento respiratório dos crustáceos. Tipicamente a hemocianina é um hexâmero de peso molecular de 450 kDa (Mangum, 1996; Sellos *et al.*, 1997; Terwilliger, 1998), sendo que suas subunidades possuem peso molecular variando entre 67 a 90kDa (Stoeva *et al.*, 1998). Cada subunidade representa um simples polipeptídeo que apresenta mais de 600 resíduos de aminoácidos e contém apenas um sítio de ligação para o oxigênio (Stoeva *et al.*, 1998).

A técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser uma ferramenta útil para evidenciar a participação das proteínas da hemolinfa no processo da osmorregulação. Hipoteticamente o padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa poderia ser alterado pela sua hidrólise a fim de gerar aminoácidos livres para atuarem na regulação isosmótica intracelular. Eletroforese é um processo que envolve o movimento de macromoléculas com carga em um campo elétrico. As moléculas migram de acordo com a sua forma, tamanho e carga. Os géis de poliacrilamida são meios de suporte escolhidos para eletroforese de proteínas porque

são quimicamente inertes e prontamente formados pela polimerização da acrilamida, e também porque os tamanhos dos poros podem ser controlados pela escolha de concentrações variáveis de acrilamida e de metileno-bisacrilamida (um reagente para interligação) no momento da polimerização (Dryer *et al.*, 1989).

Com o estresse hiper-osmótico, ou seja, o animal osmorregulador colocado em meio mais concentrado do que o meio em que estava, há evidências de que a hemocianina sofre hidrólise gerando um aumento na concentração de aminoácidos livres na hemolinfa. Este aumento na concentração de aminoácidos livres na hemolinfa torna-se um fator importante no controle do volume celular em meio de salinidade variável. Os aminoácidos livres gerados pela hidrólise da hemocianina podem entrar na célula e assim elevar a osmolalidade intracelular, evitando que a água seja retirada das células por osmose, devido ao aumento na concentração de sal na hemolinfa (Péqueux *et al.*, 1979). À medida em que a salinidade da água aumenta ou diminui, os aminoácidos livres das células aumentam ou diminuem de concentração, para que as células permaneçam isotônicas em relação ao ambiente onde estão (hemolinfa), ajudando assim, na regulação isosmótica intracelular (células não mantêm gradiente osmótico em relação ao líquido extracelular) e evitando que as células ganhem ou percam água (Gilles, 1977; Boone e Schoffeniels, 1979; Freire *et al.*, 1995 e Schmidt-Nielsen, 1996).

A espécie escolhida para este trabalho foi o camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus*, pertencente à família Palaemonidae. Esta família de crustáceos é interessante pelo fato de reunir vários gêneros que habitam desde os estuários com forte influência marinha até o ambiente dulcícola ou limnético. O gênero *Macrobrachium* é o mais bem representado em ambientes dulcícolas, sendo algumas espécies como *Macrobrachium olfersii* e *Macrobrachium acanthurus* dependentes da água salgada para a reprodução e metamorfose. Em contrapartida, espécies como *Macrobrachium potiuna* e *Macrobrachium iheringi* são hololimnéticas e não dependem de água do mar para completar o seu desenvolvimento (Moreira *et al.*, 1983), apresentando reduzido número de fases larvais, assim como ovos maiores e menos numerosos, características típicas de animais dulcícolas, em comparação com as primeiras espécies citadas (Freire *et al.*, 1995). Outro gênero desta família de camarões que invadiram o ambiente dulcícola e que também é encontrado no estado

do Paraná é o gênero *Palaemon*. Este gênero se restringe mais a regiões de maior influência salina (Kretschmar, 1984; Bond-Buckup & Buckup, 1989 e Müller *et al.*, 1999). Estas diferenças atraem a atenção para a investigação das estratégias adaptativas adotadas por espécies desta família na invasão do meio dulcícola a partir do ambiente marinho, sendo possível relacionar os graus variados de expressão dos mecanismos de hiper- e hipo-osmorregulação com a distribuição das espécies ao longo dos rios e estuários.

A abordagem deste trabalho irá contribuir especificamente para a avaliação do papel das proteínas da hemolinfa, em especial a hemocianina, na hiporregulação do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* submetido a elevação de salinidade.

Adicionalmente o padrão eletroforético de *Macrobrachium acanthurus* poderá ser comparado com o de outras espécies já estudadas desta família e em especial quanto ao peso molecular das subunidades de hemocianina em *Macrobrachium potiuna* e *Palaemon pandaliformis*.

OBJETIVOS

- Investigar a capacidade de osmorregulação de *Macrobrachium acanthurus* quando submetido à elevação de salinidade, através da concentração de cloreto e magnésio na hemolinfa.
- Avaliar a concentração de proteínas totais e o padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* em situação controle (água doce).
- Verificar o efeito da exposição a salinidade elevada sobre a concentração das proteínas totais e o padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Manutenção dos Animais

Indivíduos da espécie *Macrobrachium acanthurus* foram coletados por pescadores residentes em Pontal do Paraná, estado do Paraná. Foram utilizadas armadilhas confeccionadas por garrafas plásticas acopladas a um peso e amarradas a uma corda, utilizando pedaços de carne de peixe fresca como isca. Após coletados os camarões foram para o laboratório de Fisiologia Comparativa no Departamento de Fisiologia onde ficaram em aquários com aeradores e temperatura constante (20 a 25°C), folhagens retiradas do local de coleta e telhas e tijolos para servirem de abrigo e esconderijo. A alimentação foi feita com pedaços de carne de peixe fornecidos em dias alternados.

Experimentos de Estresse Salino/ Osmótico

Os animais coletados foram mantidos com água doce (0‰), como em seu ambiente natural (animais controle). Alguns indivíduos foram submetidos a estresse salino e osmótico, com elevação da salinidade. A hemolinfa foi retirada por punção cardíaca com seringas de insulina, e colocada em frascos do tipo Eppendorf (1,5 mL) devidamente identificados com a data do experimento, salinidade a que o animal foi exposto e número da amostra. Este procedimento foi efetuado tanto para os animais controle quanto para os submetidos a estresse osmótico por exposição de curto-prazo (1 e 6 horas) e longo-prazo (5 e 10 dias) a águas experimentais de 12‰ e 28‰, representando dois níveis variados de estresse hiper-osmótico para estes animais. As águas experimentais nas salinidades de 12‰ e 28‰ foram preparadas em diluições proporcionais de água do mar e água doce. A amostra de hemolinfa foi diluída com água destilada na proporção de 1:5 (10 µL da amostra + 40µL de água destilada). Esta diluição foi necessária para manter a linearidade dos testes colorimétricos utilizados para medir as concentrações de proteínas totais, íons de cloreto e magnésio. Após a diluição a amostra foi congelada (-20°C) até a preparação

para a determinação da concentração de íons cloreto, íons magnésio, concentração total de proteínas e o procedimento de eletroforese.

Dosagem de Cloreto, Magnésio e Proteínas Totais na Hemolinfa

A dosagem do cloreto foi realizada através do Kit Labtest® lote 49 que é composto por a) uma solução denominada Reagente de Cor contendo tiocianato de mercúrio 2mmol/L, nitrato férrico 17mmol/L e ácido nítrico 30mmol/L; b) uma solução denominada "Ativador" contendo nitrato de mercúrio 1,1mmol/L e ácido nítrico 0,9mmol/L; c) uma solução padrão 100mEq/L. A absorvância foi medida no espectrofotômetro ULTROSPEC 2.000 Pharmacia® com comprimento de onda de 470nm e então foi calculada a concentração de cloreto em mM.

A dosagem do magnésio foi realizada através do Kit Labtest® lote 50 que é composto por a) uma solução tampão contendo Tris hidroxiamino metano 400mmol/L, carbonato de potássio 153mmol/L e azida sódica 0,01g/dL pH 11,5; b) Magon sulfonado 0,1g/L mais surfactantes e preservativos; c) solução padrão 2,0mg/dl (0,823mM). A absorvância foi medida no espectrofotômetro ULTROSPEC 2.000 Pharmacia® com comprimento de onda de 505nm e então calculada a concentração de magnésio em mM.

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do Kit Labtest® lote 48 que é composto por a) Biureto-Estoque contendo hidróxido de sódio 1,86mmol/L, tartarato de sódio e potássio 430mmol/L, sulfato de cobre 120mmol/L e iodeto de potássio 300mmol/L; b) solução padrão 4,0g/dl. A absorvância foi medida no espectrofotômetro com comprimento de onda de 545nm e então calculada a concentração em mg/mL.

As médias das concentrações de cloreto, magnésio e proteínas totais foram comparadas utilizando-se o teste-t de Student, não pareado ($P < 0,05$) do Programa Sigma-Plot® for Windows versão 2.0, Jandel Corporation.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise por eletroforese vertical de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, com sulfato de sódio-dodecil (SDS-PAGE), uma alíquota de

hemolinfa foi diluída em tampão de amostra (Sample Buffer Laemmli) Sigma® contendo: a) 4% SDS; b) 20% glicerol; c) 10% β -mercaptoetanol; d) 0,004% azul de bromofenol; e) 0,125M Tris, pH 6,8. A quantidade de proteína adicionada em cada poço foi de 100 μ g de proteína total. As amostras foram fervidas por 3 a 4 minutos e então centrifugadas por 1 minuto e colocadas nos poços do gel de poliacrilamida. As amostras foram submetidas a um gel de empilhamento de 4% de acrilamida preparado com tampão composto por: a) 121,14g Tris; b) 4g SDS; c) água destilada suficiente para 1 litro; pH 6,8 (ajustado com solução 1M de Tris ou Glicina). Em seguida ao gel de empilhamento as amostras migram para o gel de separação de 7,5% de acrilamida, preparado com o tampão composto por: a) 181,71g Tris; b) 4g SDS; c) água destilada suficiente para 1 litro; pH 8,8 (ajustado com solução 1M de Tris ou Glicina). A corrida se processou com a utilização de tampão de corrida contendo: a) 144g de glicina; b) 10g de SDS (dodecil sulfato de sódio); c) 30,3g de Tris; d) água destilada suficiente para 1 litro; pH 8,3. Em um dos poços foi colocada uma solução (tratada como as amostras) do marcador de peso molecular (Sigma® Wide Range MW Marker), contendo proteínas com peso molecular de 205, 116, 97, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20, 14,2 e 6,5kDa. A corrida se processou por 4 horas com corrente constante de 30 mAmp, gerada pela fonte da Pharmacia® Biotech EPS 300 . Após este período, o gel era retirado da cuba e transferido para um recipiente com água destilada onde ficava por 30 segundos, passando depois para uma solução de fixação Sigma® (composta por a) ácido tricloroacético e b) ácido 5-sulfosalicílico), onde ficava por 30 minutos. Após a fixação o gel era lavado em água destilada por 4 vezes e então transferido para a solução corante Brilliant Blue G-perchloric Acid Sigma® (composta por: a) Brilliant Blue G e b) ácido Perclórico) durante 50 minutos. Novamente o gel era mergulhado em água destilada por 5 minutos e em seguida ficou em uma solução de descorar para retirar o excesso de corante, contendo metanol 30% e ácido acético 7,5%, por aproximadamente 20 minutos, ou até que o "background" estivesse bem claro e as bandas bem definidas. Após este processo o gel era embrulhado em placa de vidro com papel celofane para secar lentamente, e fotografado para melhor análise e preservação dos resultados.

RESULTADOS

Após a exposição de *Macrobrachium acanthurus* a curto-prazo (1 e 6 horas) e longo-prazo (5 e 10 dias) às salinidades de 12‰ e 28‰ de acordo com a metodologia anteriormente citada, foram obtidos os resultados descritos em seguida. Para as concentrações de cloreto, magnésio e proteínas totais foram construídas tabelas comparativas (Tabelas 1 a 9) que mostram os resultados obtidos e as concentrações do íon em questão nas águas a que os animais foram expostos. A partir das médias calculadas e fornecidas nas tabelas foram construídos gráficos de curvas de regulação iônica (Figuras 1 a 3).

Concentração de Cloreto

Como podemos observar nas Tabelas 1 e 2 e Figura 1, após 1 e 6 horas de exposição a concentração de cloreto na salinidade de 12‰ teve um aparente aumento, porém este aumento não foi significativo ($P = 0,008$) para 1 hora e ($P = 0,007$) para 6 horas, quando comparados ao controle (água doce). Na salinidade de 28‰ não ocorreu aumento significativo em relação ao controle, tanto para 1 hora quanto para 6 horas. Quando comparamos as concentrações de cloreto na hemolinfa com as concentrações de cloreto da água experimental observamos que em 0‰ e 12‰ a concentração na hemolinfa é maior do que na água experimental e apenas em 28‰ a concentração na hemolinfa é menor do que na água experimental, para os dois tempos de exposição de curto-prazo.

Na Tabela 3 e Figura 1, após 5 dias de exposição a concentração de cloreto na salinidade de 12‰ não teve aumento significativo em relação à concentração de cloreto do controle (água doce). Contudo na salinidade de 28‰ houve aumento significativo ($P < 0,0001$). Quando comparamos as concentrações de cloreto na hemolinfa com as concentrações de cloreto da água experimental observamos em 12‰ e 28‰ a concentração na hemolinfa foi menor do que na água experimental, após 5 dias de exposição às águas experimentais.

Na Tabela 4 e Figura 1, após 10 dias de exposição a concentração de cloreto nas salinidades de 12‰ e 28‰ teve um aumento significativo ($P = 0,001$ e $P = 0,0002$, respectivamente) quando comparada ao controle (água doce). Quando

comparamos as concentrações de cloreto na hemolinfa com as concentrações de cloreto da água experimental observamos que em 12‰ a concentração na hemolinfa foi maior do que na água experimental e apenas em 28‰ a concentração na hemolinfa foi menor do que na água experimental.

A concentração de cloreto na água doce (0‰) foi assumida como sendo 0 mM e as concentrações nas salinidades de 12‰ e 28‰ foram obtidas a partir dos valores tabulados para água do mar padrão em Prosser (1973).

Concentração de Magnésio

Variando-se a salinidade da a água doce até as águas experimentais de 12‰ e 28‰, observa-se que as concentrações de magnésio na hemolinfa do *Macrobrachium acanthurus* mantiveram-se bastante estáveis no período de exposição agudo (curto-prazo), tanto após 1 hora de exposição (Tab. 5) quanto após 6 horas de exposição (Tab. 6) e também no período de exposição crônico, tanto após 5 dias de exposição (Tab. 7) quanto após 10 dias de exposição (Tab. 8), Figura 2. Não houve nenhuma alteração significativa em relação ao controle em água 0‰.

Para todos os tempos de exposição pode-se notar (Tabs. 5, 6, 7 e 8) que a concentração de magnésio da hemolinfa da espécie de água doce *Macrobrachium acanthurus* é mantida quase constante (entre 3-8 mM), e bem abaixo da concentração de magnésio do meio (água) com exceção do controle (água doce).

A concentração de magnésio água doce (0‰) foi assumida como sendo 0 mM e as concentrações nas salinidades de 12‰ e 28‰ foram obtidas a partir dos valores tabulados para água do mar padrão em Prosser (1973).

Concentração de Proteínas Totais

Como podemos observar na Tabela 9 e Figura 3, na salinidade de 12‰ a concentração de proteínas totais variou entre 67 e 90 mg/mL e na salinidade de 28‰ variou entre 54 e 94mg/mL, sendo o valor mínimo ($53,78 \pm 3,53$, n=5) observado após 5 dias de exposição a 28‰; este valor mínimo foi significativamente inferior ao controle ($P = 0,001$).

O valor mínimo na salinidade de 12‰ foi observado após 10 dias ($67,21 \pm 2,22 \text{mg/mL}$, $n=3$) e sendo também significativamente inferior ao controle em água doce ($P = 0,015$).

Padrão Eletroforético das Proteínas da Hemolinfa

Como podemos observar (Fig.4) os peptídeos encontrados na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* possuem peso molecular variando de aproximadamente 180 a 33kDa, de acordo com a calibração obtida pelo padrão utilizado, através da curva de calibração que relaciona através de uma regressão linear o logaritmo do peso molecular das proteínas do marcador padrão com as distâncias de migração no gel em milímetros.

Podemos notar na Figura 4, que o peptídeo mais abundante na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* (hemocianina) tem peso molecular de aproximadamente 77kDa em 0‰, sendo que na salinidade de 12‰ o peso molecular foi em média 85kDa e na salinidade de 28‰ a média do peso molecular foi de novamente de 77kDa.

Foi observada uma alteração no padrão eletroforético quando esta espécie foi submetida ao estresse osmótico de 28‰ no tempo de exposição de 6 horas, onde pode-se notar uma banda a mais do que nos demais, com peso molecular de aproximadamente 102kDa. Também no tempo de exposição de 10 dias nesta mesma salinidade, podem-se notar duas bandas de proteínas a mais do que a demais situações, com peso molecular de aproximadamente 105kDa e 91kDa (Fig.4).

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) CONTROLE (ÁGUA DOCE, 0‰) E APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE CLORETO* (mM)	
	[Cl ⁻] ÁGUA	[Cl ⁻] _n Ma [£]
0 ‰	0	[106,66 ± 3,83] ₃
12‰	187,99	[238,95±25,95] ₅
28‰	438,60	[84,19 ± 21,44] ₃

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) CONTROLE (ÁGUA DOCE, 0‰) E APÓS 6 HORAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE CLORETO* (mM)	
	[Cl ⁻] ÁGUA	[Cl ⁻] _n Ma [£]
0 ‰	0	[106,66 ± 3,83] ₃
12‰	187,99	[282,69±33,04] ₅
28‰	438,60	[146,13±19,74] ₃

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) CONTROLE (ÁGUA DOCE, 0‰) E APÓS 5 DIAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE CLORETO* (mM)	
	[Cl ⁻] ÁGUA	[Cl ⁻] n Ma [£]
0‰	0	[106,66±3,83] ₃
12‰	187,99	[130,15±28,95] ₅
28‰	438,60	[288,09±12,83] ₅ #

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*;

#: Significativamente diferente do valor do controle de 0‰ (P<0,05).

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) CONTROLE (ÁGUA DOCE, 0‰) E APÓS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE CLORETO* (mM)	
	[Cl ⁻] ÁGUA	[Cl ⁻] n Ma [£]
0‰	0	[106,66±3,83] ₃
12‰	187,99	[367,50±33,59] ₃ #
28‰	438,60	[307,22±19,83] ₅ #

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Mp: *Macrobrachium acanthurus*;

#: Significativamente diferente do valor do controle de 0‰ (P<0,05).

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) APÓS 1 HORA DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO* (mM)	
	[Mg ++] ÁGUA	[Mg ++] _n Ma [£]
0 ‰	0	[6,98±0,67] ₃
12‰	18,36	[5,08±0,71] ₅
28‰	42,84	[6,32±0,58] ₃

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) APÓS 6 HORAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO* (mM)	
	[Mg ++] ÁGUA	[Mg ++] _n Ma [£]
0 ‰	0	[6,98±0,67] ₃
12‰	18,36	[5,54±0,51] ₅
28‰	42,84	[6,28±0,60] ₃

*: [Média ± Erro padrão da média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) APÓS 5 DIAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO* (mM)	
	[Mg ⁺⁺] ÁGUA	[Mg ⁺⁺] _n Ma [£]
0 ‰	0	[6,98±0,67] ₃
12‰	18,36	[6,76±0,45] ₅
28‰	42,84	[7,90±0,54] ₅

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Ma: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA ÁGUA E NA HEMOLINFA (mM) APÓS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

SALINIDADE	CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO* (mM)	
	[Mg ⁺⁺] ÁGUA	[Mg ⁺⁺] _n Ma [£]
0 ‰	0	[6,98±0,67] ₃
12‰	18,36	[3,71±0,48] ₄
28‰	42,84	[7,58±0,38] ₅

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

£: Mp: *Macrobrachium acanthurus*.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NA HEMOLINFA (mg/mL) A DIFERENTES TEMPOS E SALINIDADES PARA A ESPÉCIE *Macrobrachium acanthurus*.

TEMPO DE EXPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS*	
	(mg/mL)	
	12‰	28‰
1 hora	[75,83±15,05] ₅	[93,78±10,65] ₃
6 horas	[86,30±6,55] ₄	[82,30±17,26] ₃
5 dias	[90,33±9,09] ₅	[53,78±3,53] ₅ #
10 dias	[67,21±2,22] ₃ #	[85,36±10,36] ₅

*: [Média ± Erro Padrão da Média]_n, onde n é o número de amostras;

#: Significativamente diferente do valor do controle de 0‰ (P<0,05);

Obs: A concentração de proteínas totais no grupo controle 0‰ foi de 88,67±4,83 mg/mL, n=3.

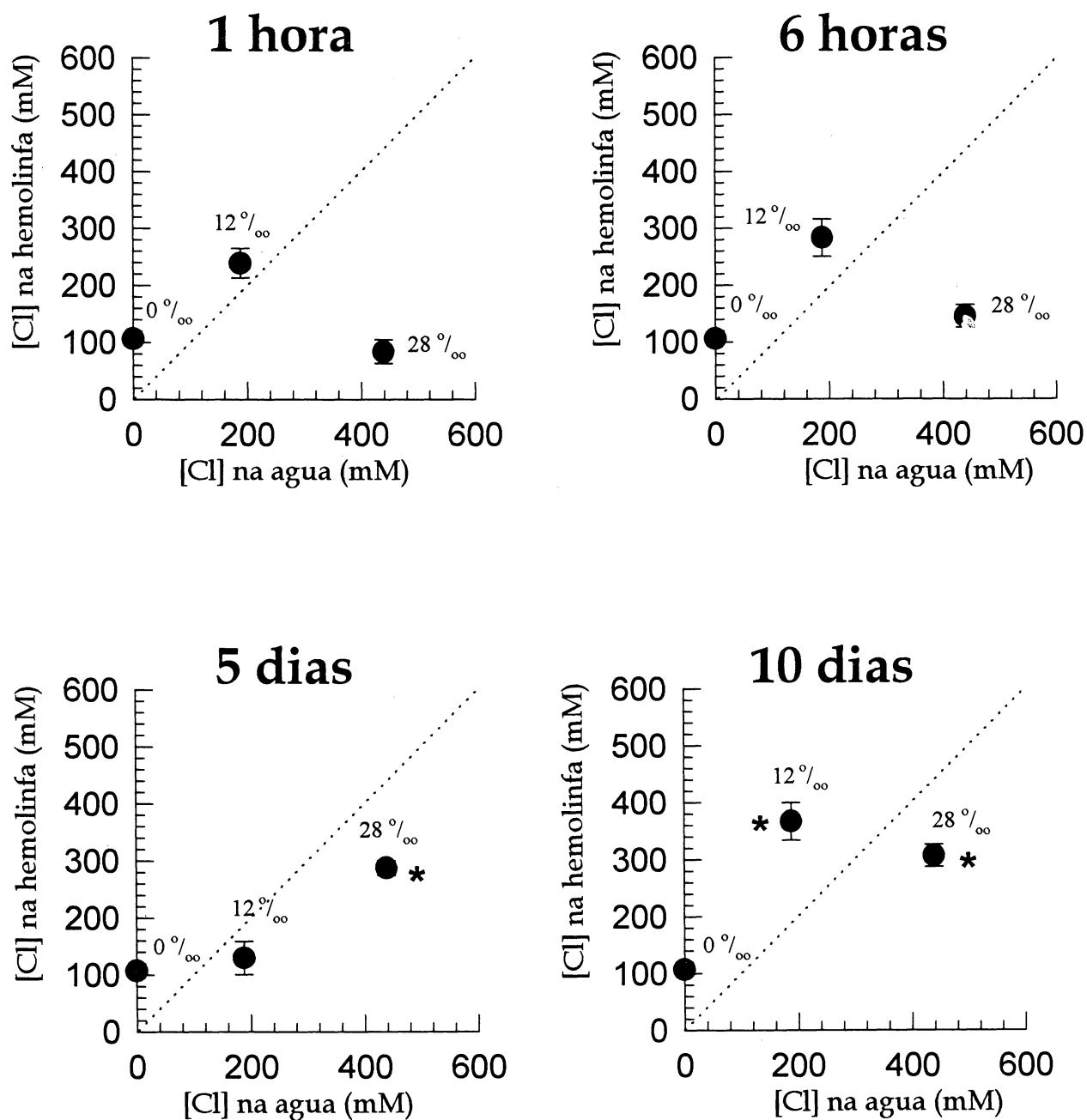


FIGURA 1: Concentração de cloreto na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* em função da concentração de cloreto na água, após 1 e 6 horas e 5 e 10 dias de exposição às diferentes salinidades indicadas. Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. O número de amostras (n) está indicado nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Quando não visíveis, as barras de erro são menores que os símbolos. O asterisco indica diferença significativa (teste-t de Student, não pareado $P < 0,05$), utilizando-se a [Cl] na hemolinfa em água 0‰ como controle.

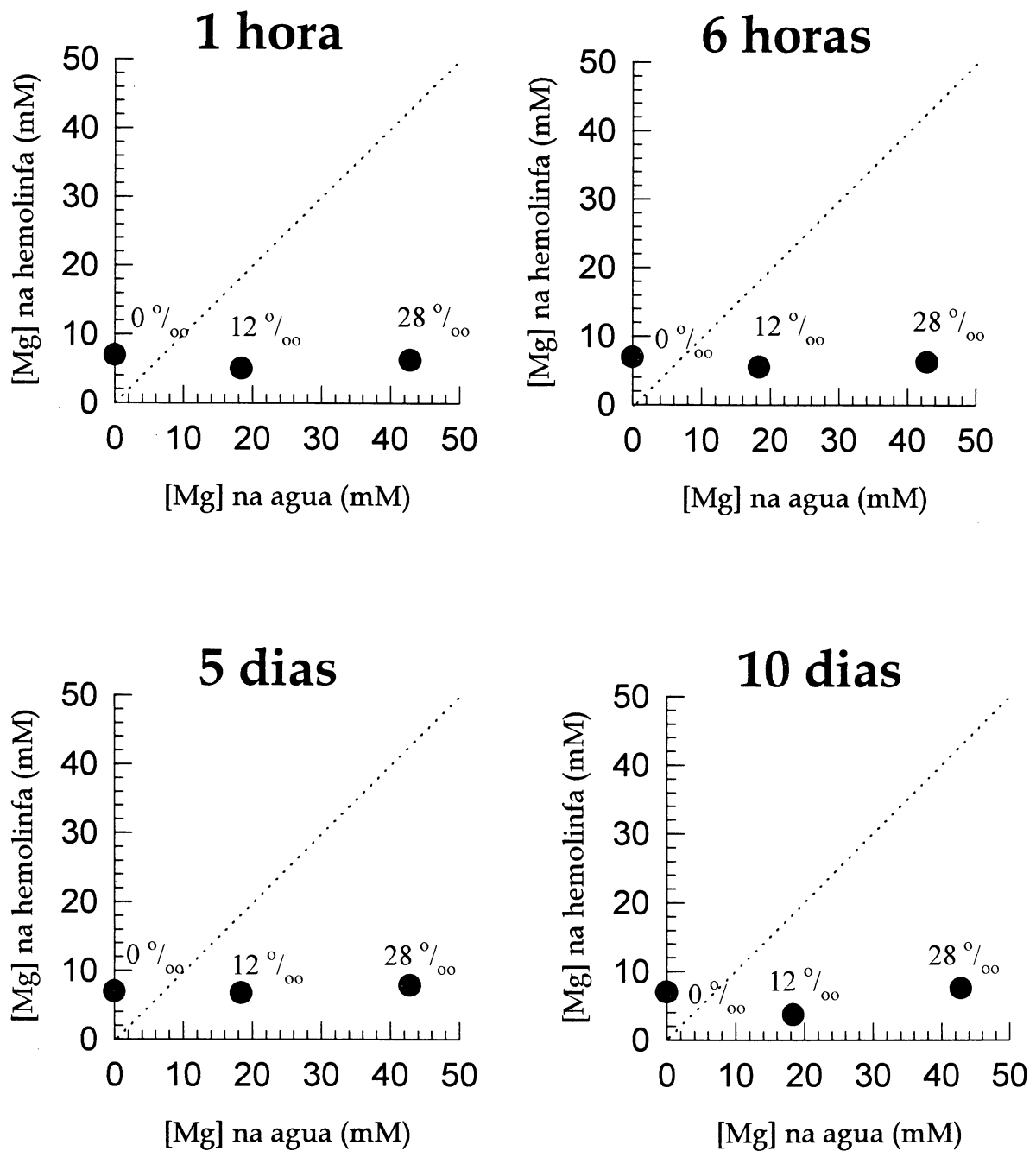


FIGURA 2: Concentração de magnésio na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* em função da concentração de magnésio na água, após 1 e 6 horas e 5 e 10 dias de exposição às diferentes salinidades indicadas. Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. O número de amostras (n) está indicado nas Tabelas 5, 6, 7 e 8. Quando não visíveis, as barras de erro são menores que os símbolos.

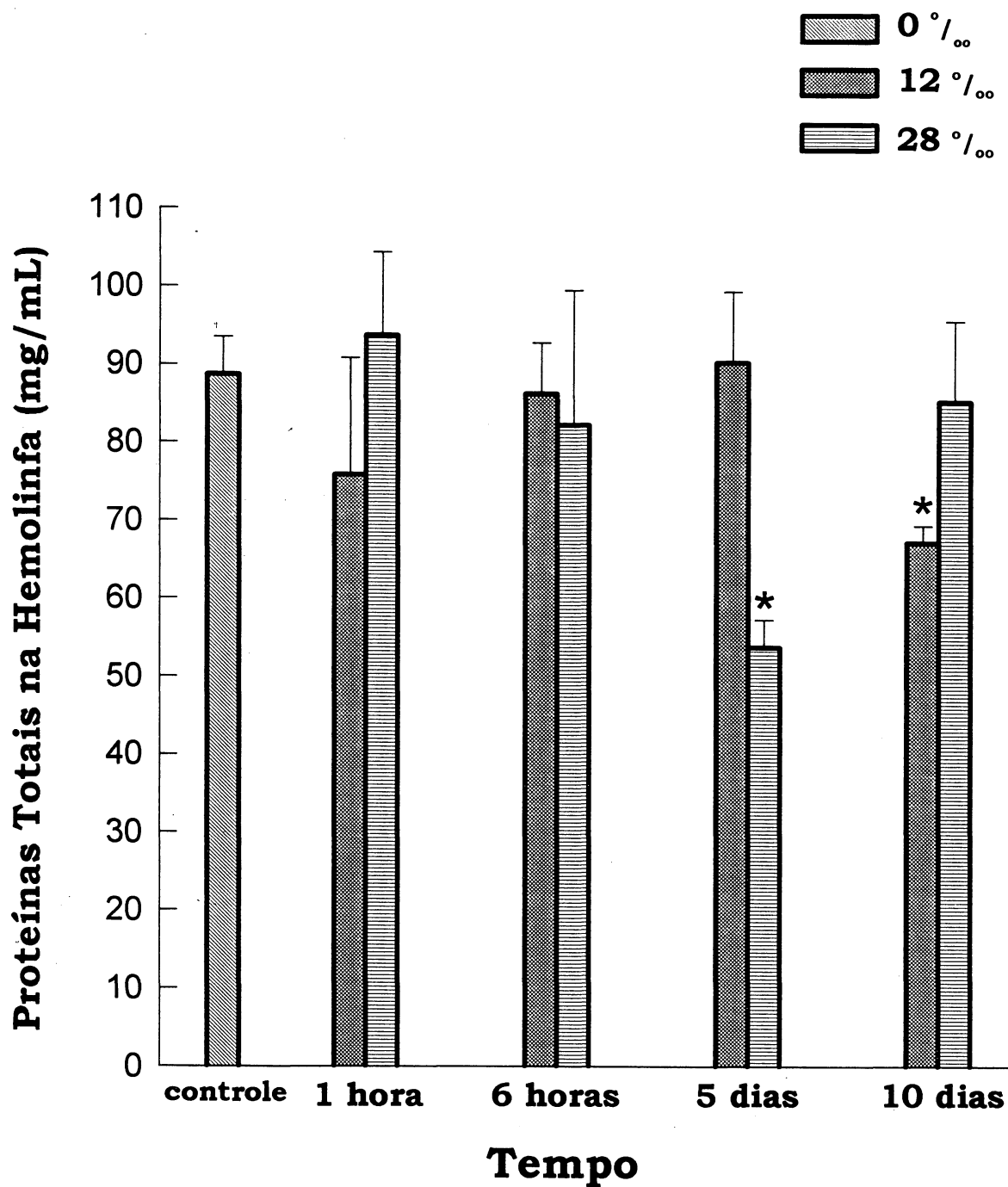


FIGURA 3: Concentração de proteínas totais na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* em função do tempo de exposição às diferentes salinidades indicadas. Valores apresentados como média + erro padrão da média. O número de amostras (n) está indicado na Tabela 9. O asterisco indica diferença significativa (teste-t de Student, não pareado $P < 0,05$), utilizando-se a concentração de proteínas totais na hemolinfa em água 0‰ como controle.

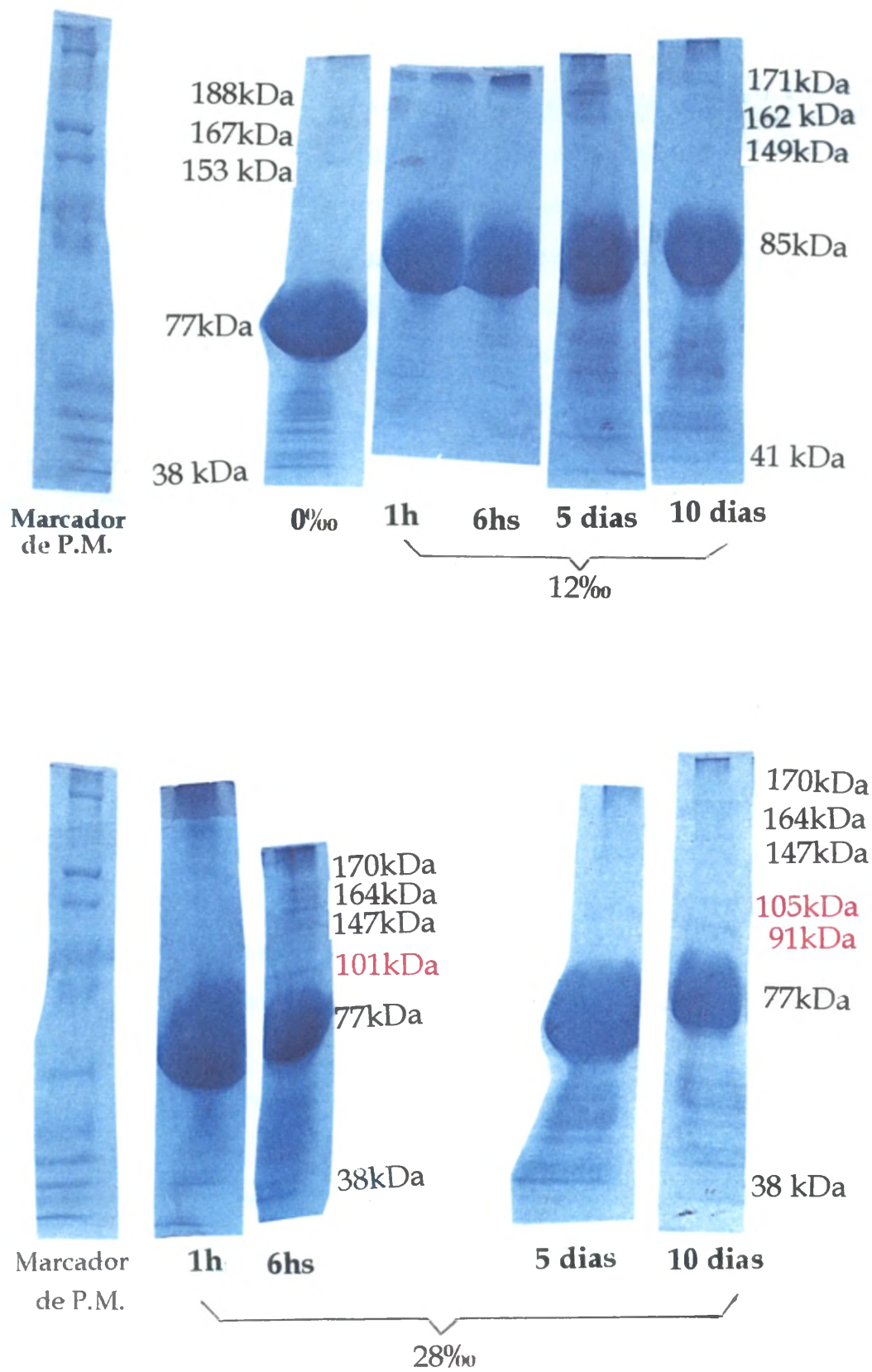


FIGURA 4: Imagens do gel de poliacrilamida após o processo da eletroforese, nas diversas condições analisadas.

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que *Macrobrachium acanthurus* é um forte regulador da concentração de íons magnésio na hemolinfa e também de cloreto, porém em grau bem menor. Em salinidades de 0‰ e 12‰ esta espécie hiper-regulou seus níveis de cloreto em relação ao meio externo, seus valores ficaram acima da linha iso-iônica nas curvas de regulação, com exceção do tempo de exposição de 5 dias em que em 12‰ o animal já estava hipo-regulando (Fig.1), o que permaneceu fazendo a 28‰, para todos os tempos de exposição. Este padrão foi encontrado também para *Macrobrachium potiuna* e *Palaemon pandaliformis*, duas espécies da mesma família de *Macrobrachium acanthurus* já investigadas por este laboratório (Freire, Cavassin & Rodrigues, dados não publicados). As espécies desta família mostram sempre uma regulação bem mais precisa do íon magnésio do que do íon cloreto. De forma similar, Chen *et al.*, (1994) estudaram as diferentes respostas na regulação da concentração osmótica e na concentração de cloreto na hemolinfa de *Penaeus chinensis* e concluíram que tanto a osmolalidade quanto a concentração dos íons cloreto na hemolinfa destes animais crescem com o acréscimo do valor da salinidade do meio. Para *Macrobrachium acanthurus* em 1 e 6 horas e 10 dias os valores de cloreto na salinidade de 12‰ foram surpreendentemente maiores do que em 28‰ e somente em 5 dias é que a concentração dos íons cloreto na salinidade de 28‰ foi maior que na salinidade de 12‰ (Tabs. 1, 2, 3 e 4 e Fig.1), mostrando talvez que a uma salinidade mais elevada mecanismos de osmorregulação adicionais sejam recrutados.

A concentração de magnésio (Mg) se manteve bastante estável na hemolinfa. A espécie é forte reguladora do íon Mg, como verificado variando-se a salinidade desde a água doce até a salinidade de 28‰. *Macrobrachium acanthurus* manteve sua concentração de Mg na hemolinfa acima da concentração de Mg em água doce (0‰) e abaixo da concentração de Mg na água a partir da salinidade de 12‰, mostrando ser excelente hiper-hipo-regulador deste íon. Fortes hiper-hipo-reguladores são espécies que mantêm sua concentração iônica quase constante em meios de salinidades que variam da água doce até a água do mar (ver revisão em Péqueux, 1995). Esse resultado é interessante uma vez que esta espécie não está

normalmente em contato com a água do mar. Os resultados obtidos a longo prazo (crônico) confirmam os resultados obtidos a curto prazo (agudo). Comparando a concentração de Mg da água experimental e a concentração de Mg na hemolinfa pode-se notar que a concentração no animal variou muito pouco enquanto que a concentração da água experimental aumentou consideravelmente. Nota-se, ainda, que a concentração de Mg na hemolinfa ficou sempre abaixo da concentração da água experimental (com exceção dos expostos em água doce), indicando que o íon Mg é ativamente excretado pela glândula antenal (Morrit, 1989; Morrit & Spicer, 1993 e Péqueux, 1995).

Essa enorme capacidade de hipo-regular o Mg foi observada também para outros palemonídeos estudados por este laboratório como já mencionado anteriormente, e também para outros crustáceos. Segundo dados apresentados por Morrit (1989), anfípodos terrestres e litorâneos (Talitridae) também demonstram extraordinária estabilidade nos valores de concentração de Mg da hemolinfa, diante de variação na salinidade do meio. Esta estabilidade e capacidade de hipo-regulação não ocorre para outros íons como Na, Ca e K (Morrit, 1989). Esta diferença deve estar relacionada com o fato do Mg ser ativamente excretado pela glândula antenal (Morrit e Spicer, 1993). O íon Mg tem uma importante função como cofator dentro de muitas enzimas, especialmente aquelas envolvidas na transferência de grupos fosfato (ATP, fosfatases e quinases) (Morrit e Spicer, 1993), por isso a necessidade de se estabilizar ao máximo a concentração deste íon na hemolinfa, sendo de qualquer forma espantosa a capacidade demonstrada por estes camarões que habitam tanto a água doce longe do estuário (*Macrobrachium potiuna*), água doce próxima ao estuário (*Macrobrachium acanthurus*) quanto o próprio estuário (*Palaemon pandaliformis*).

Com relação à dosagem de proteínas totais na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus*, observou-se notável estabilidade dos valores, em torno de 90 mg/mL, porém foi notada distinta redução nos seus níveis quando os animais foram expostos a salinidade elevada a longo-prazo (Fig. 3). Os valores encontrados para *Macrobrachium acanthurus* são semelhantes ao que Gilles (1977) encontrou para as espécies de caranguejos *Eriocheir sinensis*, *Carcinus maenas* e a lagosta *Astacus fluviatilis* onde as suas concentrações de proteínas totais encontradas, quando os animais foram expostos às salinidades de 18‰ (água do mar diluída) e

em água doce, (meios mais diluídos) foram maiores (quase que o dobro) do que quando os animais foram expostos à água do mar (meio mais concentrado). Péqueux *et al.* (1979) também encontraram os mesmos resultados para as mesmas espécies de caranguejos *Eriocheir sinensis* e *Carcinus maenas* e também para a espécie de siri *Callinectes sapidus*.

Estes resultados podem significar que há hidrólise de proteínas da hemolinfa para a geração de aminoácidos livres que entram nas células dos tecidos do camarão para ajudá-las na sua regulação de volume, já que houve elevação da concentração de NaCl da hemolinfa quando o animal se encontra em meio mais concentrado de sais (Gilles, 1977, Péqueux *et al.*, 1979 e Zatta, 1987).

Em relação ao padrão eletroforético da hemolinfa pode-se dizer que o peptídeo representado como uma grande mancha na Figura 4 possui peso molecular de aproximadamente 77kDa, sendo um monômero da hemocianina. Segundo Sellos (1997) a hemocianina é um hexâmero de peso molecular igual a 450kDa, com seis monômeros iguais de aproximadamente 75kDa. No gel, a hemocianina ficou representada como uma grande mancha, devido ao fato de que a hemocianina consiste de 95% do total de proteínas na hemolinfa (Mangum, 1996). Para a visualização das outras bandas de proteínas presentes em menor quantidade foi necessária a administração de 100 µg de proteína total a cada poço do gel, o que terminou gerando a grande mancha de hemocianina no gel.

Em estudos realizados neste laboratório (Rodrigues & Freire, dados não publicados) foi possível observar diferenças entre as subunidades da hemocianina dos palemonídeos. Na espécie *Palaemon pandaliformis* a proteína mais abundante, a hemocianina, se divide distintamente em dois peptídeos de pesos moleculares diferentes: 81 e 62kDa, diferente de *Macrobrachium potiuna* em que da mesma forma que em *Macrobrachium acanthurus*, a hemocianina está representada por apenas uma subunidade de peso molecular de aproximadamente 80kDa.

Segundo Urich (1994), a hemocianina dos crustáceos possui em geral três tipos de subunidades, que são α , β e γ . Contudo, *Palaemon elegans* apresenta apenas os tipos α e γ , que poderiam corresponder às duas grandes bandas vistas em *Palaemon pandaliformis*, já que as duas espécies são do mesmo gênero. Estudos

futuros com anticorpos contra cada tipo de subunidade seriam necessários para confirmar estas hipóteses.

Gilles (1977) também observou o surgimento de bandas de proteínas novas em determinadas condições de salinidades como ocorreu aqui com *Macrobrachium acanthurus*, que teve diferença no padrão eletroforético de acordo com o tempo e a salinidade de aclimação. Em *Macrobrachium acanthurus* ocorreu o aparecimento de mais uma proteína de peso molecular de aproximadamente 102kDa quando o animal foi exposto a 6 horas na salinidade de 28‰ e duas proteínas de peso molecular de 105kDa e 91kDa quando o animal foi exposto a 10 dias na salinidade de 28‰. Obviamente este peptídeo de 102kDa poderia ser o mesmo de 105kDa observado após 10 dias. Novamente, cabe ressaltar que apenas estudos com anticorpos poderiam confirmar a natureza destes peptídeos. Não foram encontrados mais estudos relacionando mudanças no padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa de crustáceos quando submetidos a diferentes salinidades, o que limitou as possibilidades de comparação e interpretação dos resultados obtidos no presente estudo, mas por outro lado demonstra a relevância deste estudo e a necessidade de sua continuação.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que *Macrobrachium acanthurus* regula muito bem os íons de magnésio na sua hemolinfa e em menor grau os íons de cloreto. Quanto ao envolvimento das proteínas na sua osmorregulação, houve tendência para redução nos níveis de proteínas totais na hemolinfa dos animais expostos à salinidade elevada a longo-prazo, o que pode indicar a geração de aminoácidos livres para influxo nos tecidos e atuação na regulação de volume celular, o que é compatível com a literatura. Houve também indicação de alteração no padrão eletroforético das proteínas da hemolinfa de acordo com a exposição do camarão a meio de salinidade elevada, o que pode significar uma alteração também qualitativa, além de quantitativa, nas proteínas da hemolinfa como parte dos mecanismos de osmorregulação deste camarão de água doce eurihalino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMSTRONG, D. A., K. STRANGE, J., CROWE, J., KNIGHT, A., and SIMMOS, M., 1981. High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds. *Biological Bulletin of Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 160: 349-365.
2. AUGUSTO, A. S. 1998. *O papel dos aminoácidos livres em diferentes tecidos do camarão de água doce Macrobrachium olfersii (crustacea, decapoda) durante o decurso temporal da aclimação à salinidade elevada*. Monografia de conclusão de curso de graduação em Biologia. Departamento de Biologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, SP.
3. BOND-BUCKUP, G. and BUCKUP, L., 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* 49(4): 883-896.
4. BOONE, W. R. and SCHOFFENIELS, E., 1979. Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 63D: 207-214.
5. CHEN, J-C., CHEN, C-T., CHENG, S-Y., 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Marine Ecology Progress Series* 110:85-94.
6. CHEN, J-C., CHIA P-G., 1997. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forska °l) subjected to different salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 117:239-244.

7. DRYER, R. L. and LATA, G. F., 1989. *Experimental Biochemistry*. Oxford University Press. Cap.6.
8. FREIRE, C. A., McNAMARA, J. C., ROSA, L. and GREENE, J., 1995. Neuroendocrine Control of Osmotic Regulation in the Freshwater Shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): Free Amino Acid Concentrations in the Hemolymph. *General and Comparative Endocrinology* 100: 83-91.
9. FUNGE-SMITH, S. J., TAYLOR A. C., WHITLEY, J. and BROWN, J. H., 1995. Osmotic and ionic regulation in the giant Malaysian fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strontium and bromine. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 110:357-365.
10. GILLES, R., 1977. Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 56:109-114.
11. GROSS, W. J., LASIEWSKI, R. C., DENNIS, M., and RUDY, P. Jr., 1966. Salt and water balance in selected crabs of Madagascar. *Comparative Biochemistry and Physiology* 17: 641-660.
12. KRETSCHMAR, S. Z., 1984. *Camarões de água doce do litoral do Paraná*. Tese de Mestrado. Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.
13. LIMA, A. G., McNAMARA, J. C. and TERRA, W. R., 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na,K-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann,1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 215:81-91.

14. MANGUM, C. P., 1996. Subunit composition of polymorphic hemocyanins in the decapod crustaceans: differences between sibling species. *Physiological Zoology* 69:568-585.
15. McNAMARA, J. C., 1987. The time course of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107:245-251.
16. MOREIRA, G. S., McNAMARA J. C., SHUMWAY, S. E. and MOREIRA, P. S., 1983 Osmoregulation and respiratory metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 74 A:57-62.
17. MORRIT, D., 1989. Ionic regulation in littoral and terrestrial amphipods (Crustacea: Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 198. Vol 132:53-67.
18. MORRIT, D. and SPICER, J.I., 1993. Mini Review: A Brief re-examination of the function and regulation of extracellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropod. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106 A: 19-23.
19. MÜLLER, Y. M. R., NAZARI, E. M., AMMAR, D., FERREIRA, E. C., BELTRAME, I.T. and PACHECO, C., 1999. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratones, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(3): 629-636.
20. PÉQUEUX, A., VALLOTA, A. C. and GILLES, R., 1979. Blood proteins as related to osmorelation in crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology* 64 A: 433-435.

21. PÉQUEUX, A., 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1):1-60.
22. PROSSER, C. L. *Comparative Animal Physiology*. 3rd ed. W. B. Saunders Ca. Philadelphia, 1973.
23. RANDALL, I., BURGGREN, W. and FRENCH, K., 1997. Ionic and Osmotic Balance. *Eckert. Animal Physiology-Mechanisms and Adaptations*. 4^o Ed. Freeman & Company. Ed., New York. Cap. 14 pp. 571-587.
24. READ, G. H., 1984. Intraspecific variation in the osmoregulatory capacity of larval, postlarval, juvenile and adult *Macrobrachium petersii* (Hilgendorf). *Comparative Biochemistry and Physiology* 78A:501-506.
25. ROBERTSON, J.D., 1953. Further studies on ionic regulation in marine invertebrates. *Journal of Experimental Biology* 30: 277-296.
26. SCHMIDT-NIELSEN, K., 1996. *Fisiologia Animal. Adaptação e Meio Ambiente*. Santos livraria Editora, São Paulo, SP.
27. SELLOS, D., LEMOINE, S. and WORMHOUDT, A. V., 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Letters* 407: 153-158.
28. STOEVA, S., DOLASHKA, P., HRISTOVA, R., GENOV, N. and VOELTER, W., 1998. Subunit composition and N-terminal analysis of arthropod hemocyanins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 122:69-75.
29. TERWILLIGER, N. B., 1998. Functional adaptations of oxygen-transporting proteins. *Journal of Experimental Biology* 201: 1085-1098.
30. URICH, K., 1994. *Comparative Animal Biochemistry*. Springer-Verlag, Berlin.

31. ZATTA, P., 1987. The relationship between plasma proteins and intracellular free amino acids during osmotic regulation in *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Zoology* 242: 131-136.