



Universidade Federal do Paraná

ENELISE MARCELLE AMADO

Adaptação de anêmonas do
mar a variação de salinidade –
evidências de mecanismos
regulatórios

CURITIBA
2006

ENELISE MARCELLE AMADO

**Adaptação de anêmonas do mar
a variação de salinidade –
evidências de mecanismos
regulatórios**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular – área de
concentração Fisiologia, da Universidade Federal
do Paraná para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Marta Marques de Souza

Curitiba
2006

Tanto tempo, tanto esforço, tanto dinheiro, muitas vezes para se conseguir resultados pequenos quando comparados com as horas investidas. Mas todas as frustrações e todos os esforços monótonos, repetitivos, tornam-se insignificantes diante da alegria pura de descobrir algo novo – e esse prazer pode ser saboreado quase todos os dias quando também se ama as pequenas coisas. Dizer: Nós descobrimos isso; nós compreendemos isso; nós conseguimos extrair sentido e ordem da confusão da natureza. Pode existir recompensa maior?

S. J. Gould

AGRADECIMENTOS

Tenho plena convicção de que este trabalho não teria condições de ter sido realizado, da maneira como ele foi realizado, se tantas pessoas não tivessem dado uma forcinha (de qualquer natureza!). Encontro aqui uma forma de homenagear essas pessoas, deixando registrados meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

A minha orientadora Dra. Marta Marques de Souza por todos esses 6 anos que estamos juntas, pela paciência e dedicação de sempre, pelo carinho e pela amizade, pelo modo “relax” de conduzir todo o processo, por sempre ter acreditado e confiado em mim e pela enorme contribuição na minha formação científica.

Aos meus pais Ademar Amado e Natalina de Mattos Amado por tudo! Pelo amor, pela dedicação, por aturar com tolerância e paciência (quase sempre!) as maluquices da filha, pelo empurrãozinho inicial, pelo incentivo, por todo o apoio financeiro, por sempre terem acreditado, e principalmente por continuarem acreditando.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina e ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), pelo livre uso de suas dependências.

Ao colega de profissão Ms. Denilton Vidolin por todas as dicas, por todo o auxílio prestado e por todas as coletas realizadas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A Dra. Carolina Arruda Freire por todo o apoio, por ter disponibilizado seu laboratório e por compor minha banca examinadora.

Ao Dr. Adalto Bianchini por ter aceitado tão gentilmente compor minha banca examinadora.

Ao Dr. Robert T. Boyle pelo apoio técnico durante a impressão e pela correção do abstract.

Aos amigos do mestrado Loli, Clarice, Daniel e Marcos pela companhia agradável, pelas discussões enriquecedoras e pela certeza de que fiz amigos de verdade.

Ao pessoal do LEFA (UEL): Dra Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Juliana Simonato, Lindalva Maduenho, Marina Mori Pires de Camargo, Vivian Langiano, Juliana Ruiz, Gabriel Troilo, Bruno Blotta Batista e Thiago, pela companhia e por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável.

A minha amiga e cunhada Renata, pelo companheirismo em todos os momentos (inclusive coleta de anêmonas), pelas incontáveis caronas e por todo o apoio prestado.

A minha também amiga e cunhada Carol, pelo carinho e preocupação de sempre.

Ao amigo Hugo “Dzaum”, pelas inúmeras caronas e pelo modo carinhoso com que sempre se dirigiu a mim.

Aos meus irmãos Rodrigo, Rafael e Guilherme, pelos momentos em família, pelas intermináveis horas em que eu monopolizei o computador e por aturarem o meu modo estressado de ser.

Ao Val pelas intermináveis conversas pelo msn (quase uma terapia!) pelos bons momentos que passei em Curitiba, por me tornar (mesmo sem saber) cada dia uma pessoa melhor e por ter feito de uma simples coleta de anêmonas (“bundanosomas” e “activias”) um momento tão especial e divertido.

Ao casal super fofo João Soto e Ana Tezza, por terem me recebido com carinho e por terem gastado um dia inteiro de verão na “caça as anêmonas”.

Aos amigos Carlinha, Ivan, Nina e Tomie que mesmo distantes, sempre foram muito importantes. E aqui entra de novo a Ju que apesar de estar perto (no lab) faz parte desse grupo de grandes amigos que fiz na faculdade.

Ao agora amigo José Guilherme, por toda a ajuda prestada durante o tempo em que estivemos juntos, pelo incentivo e pela vibração diante das minhas conquistas.

Ao Fidel, Inês, João e Bia, por terem me acolhido na intimidade de seu lar durante o tempo que estive em Curitiba, pelo uso do carro e da casa de praia durante as coletas, e por todo o tempo que convivi com essa família.

A todos os amigos (são muitos!) que entenderam com paciência minha ausência durante o período em que eu estava escrevendo, e também pela preocupação e torcida que demonstraram.

Enfim... a todas pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram pra realização desse trabalho...

MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

Actinia bermudensis e *Bunodosoma caissarum* são duas espécies de anêmonas do mar que vivem associadas ao substrato rochoso na zona entre marés. Por serem funcionalmente sésseis e, portanto, incapazes de escapar de situações desfavoráveis que acontecem nessa região, elas devem realizar ajustes intracelulares de modo a compensar as variações osmóticas do meio. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos com o equilíbrio osmótico e iônico desses animais durante a adaptação a variação de salinidade. Para tanto, exemplares das duas espécies foram expostos por 6 horas a um choque hiposmótico (25‰), a situação controle (30‰) e a um choque hiperosmótico (37‰). Após a exposição, foi dosado a osmolalidade, os íons Na^+ , K^+ e Cl^- e as NPS (substâncias positivas à ninidrina) no fluido do celêntero. Também foram dosados os mesmos íons e o teor de NPS no músculo, além do teor hídrico tecidual. Com base nos resultados das variações da osmolalidade e dos osmólitos analisados, foram definidas as soluções experimentais para a análise do volume em células isoladas. Assim foram preparadas uma solução controle (975 mOsm), uma solução hiposmótica (785 mOsm) e uma solução hiperosmótica (1225 mOsm), também foram preparadas, essas mesmas soluções sem Ca^{2+} , para avaliar a participação desse íon como sinalizador do processo regulatório. As células foram dissociadas por método enzimático e então expostas às diferentes condições experimentais, a análise do volume celular foi realizada em microscópio invertido num intervalo de tempo de 20 min. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (*Moticam 480*) e submetidas à análise de imagens (*Motic Images 2000 -1.3*). A variação do diâmetro celular foi medida e então convertida para volume celular. Também foram testados alguns bloqueadores das principais vias de transporte envolvidas na regulação de volume celular. Associados ao choque hiposmótico foram testados a ouabaína, o DIDS, furosemide (3mM) e HgCl_2 , para o choque hiperosmótico, foram testados ouabaína, furosemide (100 μM), amiloride e DIDS. Os resultados do ensaio *in vivo* demonstram que *Actinia bermudensis* osmoconforma em ambas as salinidades, enquanto *Bunodosoma caissarum* osmorregula em **25‰** e osmoconforma em **37‰**. A análise dos osmólitos extracelulares e teciduais indica que *Actinia bermudensis* é um típico osmoconformador e que utiliza osmólitos orgânicos associados aos inorgânicos para regulação de volume celular quando em choque hiposmótico. Enquanto *Bunodosoma caissarum* osmorregula em **25‰**, pelo aumento de osmólitos orgânicos, e mantém seu volume celular por liberação de osmólitos inorgânicos e orgânicos, e em **37‰** parece apresentar mecanismos para acúmulo iônico celular. Já os resultados dos ensaios *in vitro* evidenciam uma regulação completa de volume celular de *Bunodosoma caissarum* e uma regulação parcial de volume de *Actinia bermudensis* durante a exposição das células ao choque hiposmótico. Não foi evidenciada regulação de volume celular durante o choque hiperosmótico em nenhuma das duas espécies. *Bunodosoma caissarum* aparentemente regula volume celular diante de hiposmotividade pelo efluxo de íons através do contranportador K^+-Cl^- e possivelmente pelo efluxo de osmólitos orgânicos que utilizam vias aniônicas de transporte. A participação de Ca^+ como sinalizador do processo regulatório, só pôde ser evidenciada em células de *Bunodosoma caissarum* quando exposta ao choque hiposmótico.

Palavras chave: *Actinia bermudensis*, *Bunodosoma caissarum*, hiposmótico, hiperosmótico, volume celular.

ABSTRACT

Actinia bermudensis and *Bunodosoma caissarum* are two anemone species that live on rocky substrate in intertidal zones, being functionally sessile, they are not able to escape from difficult situations typical of these areas. These species need intracellular adjustments to compensate for environmental osmotic variations. The purpose of this study was to investigate the mechanisms involved in the osmotic and ionic equilibrium of these species during adaptation to salinity. For this purpose, animals of the two species were exposed for 6 h to a hyposmotic shock (25‰), control salinity (30‰) and hyperosmotic shock (37‰), after which was measured the osmolality, the ions Na^+ , K^+ e Cl^- and the NPS (ninhydrin positive substances) on the coelenteron fluid. Also, was measured the same ions, the NPS and the water content of the muscle. Based on the results of osmolality variation and the analyzed osmolytes, it was defined the experimental solutions to single cell volume analysis. Thus, was prepared an isosmotic saline (975 mOsm), hyposmotic (785 mOsm) and hyperosmotic (1225 mOsm) saline, also was prepared the same salines free of Ca^{2+} , to evaluate this ion's role in signaling of the regulatory process. The cells were dissociated by enzymatic methods and exposed to different experimental conditions, for 20 min. The cellular volume analysis was performed on an inverted microscope, using a digital camera to capture the images. The diameter of the cells were taken and converted to volume. Also, the presence of blockers of the main transport pathways involved in cellular volume regulation was evaluated. Associated with hyposmotic shock: ouabain, DIDS, furosemide (3mM) and HgCl_2 , to hyperosmotic were tested: ouabain, furosemide (100 μM), amiloride na DIDS. The *in vivo* results show that *Actinia bermudensis* osmoconforms in both salinities, while *Bunodosoma caissarum* osmorregulates in **25‰** e osmoconforms in **37‰**. The tissue and extracellular osmolytes analysis indicate that *Actinia bermudensis* is a typical osmoconformer, using organic and inorganic osmolytes for cellular volume regulation when under hyposmotic shock. While *Bunodosoma caissarum* osmorregulates in **25‰**, by increasing organic osmolytes, maintaining its cell volume by the release of organic and inorganic omolytes, and in **37‰** seems to present mechanisms of ion accumulation. The *in vitro* assays revel a complete cell volume regulation in *Bunodosoma caissarum* and a partial regulation in *Actinia bermudensis* during the cell exposure to hyposmotic shck. During hyperosmotic schok, cellular volume regulation was not observed in either species. *Bunodosoma caissarum* aparently regulates cell volume under hyposmoticity by ionic efluxes through K^+ - Cl^- cotrnasporter and possible by organic osmolytes throug anion pathways. The analysis of the role of Ca^+ in the regulatory processes indicates that only the activation of osmolytes release from *Bunodosoma caissarum* cells under hyposmotic shock is mediated by extracellular Ca^{2+} .

LISTA DE FIGURAS

1	Regulação de volume celular - RVD e RVI	14
2	Transportadores envolvidos na regulação do volume celular	17
3	Exemplares de <i>Actínia bermudensis</i> e <i>Bunodosoma caissarum</i>	23
4	Fotografia do local de coleta	24
5	Fotografia do Aquário	25
6	Esquema ilustrativo da estrutura interna de uma anêmona do mar	26
7	Campo de análise do volume celular	30
8	Gráfico da osmolalidade	33
9	Gráficos dos osmólitos no fluido do celêntero	35
10	Gráficos dos osmólitos no músculo	37
11	Síntese da mobilização de osmólitos	39
12	Volume celular – choque hiposmótico	40
13	Volume Celular – choque hiperosmótico	41
14	Choque hiposmótico sem Ca^{2+} - <i>Actinia bermudensis</i>	42
15	Choque hiposmótico sem Ca^{2+} - <i>Bunodosoma caissarum</i>	42
16	Choque hiperosmótico sem Ca^{2+} - <i>Actinia bermudensis</i>	43
17	Choque hiposmótico sem Ca^{2+} - <i>Bunodosoma caissarum</i>	44
18	Choque hiposmótico + bloqueadores – <i>Actinia bermudensis</i>	45
19	Choque hiposmótico + bloqueadores – <i>Bunodosoma caissarum</i>	45
20	Campo de análise do volume – choque hiposmótico + HgCl_2	46
21	Choque hiperosmótico + bloqueadores – <i>Actinia bermudensis</i>	47
22	Choque hiperosmótico + bloqueadores – <i>Bunodosoma caissarum</i>	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Osmoconformadores x Osmorreguladores	12
1.2 Regulação do volume celular – RVD e RVI	13
1.3 Osmólitos orgânicos e osmólitos inorgânicos	15
1.4 Vias de regulação do volume celular	16
1.5 Sinalização celular para o processo regulatório	17
1.6 Equilíbrio osmótico e iônico em cnidários	18
1.7 Justificativa e Apresentação do presente trabalho	20
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Os Animais	23
3.2 Coleta e Manutenção dos Animais	24
3.2.1 Local de coleta	24
3.2.2 Manutenção dos animais	24
3.3 Caracterização das Respostas dos Animais aos Choques Osmóticos	25
3.3.1 Dosagem dos íons e medida da osmolalidade no fluido do celêntero	26
3.3.2 Teor hídrico	26
3.3.3 Dosagem de íons no músculo	27
3.3.4 Teor de substâncias positivas a ninidrina (NPS)	27
3.4 Análise do volume celular <i>in vitro</i>	28
3.4.1 Definição das soluções experimentais	28
3.5 Dissociação das células	29
3.6 Análise do volume celular	30

3.7 Análise das vias de regulação do volume celular	31
3.7.1 Participação da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$	31
3.7.2 Participação do trocador $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$	31
3.7.3 Participação do cotransporte $\text{Na}^+ - 2\text{Cl}^- - \text{K}^+$	31
3.7.4 Participação do trocador Na^+ / H^+	32
3.7.5 Participação do cotransportador $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$	32
3.7.6 Participação de aquaporinas	32
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Dosagem de íons e medida da osmolalidade no fluido do celêntero	33
4.2 Concentração de substâncias positivas a ninidrina no fluido (NPS)	34
4.3 Teor hídrico tecidual	36
4.4 Dosagem de íons no músculo	36
4.5 Teor de substâncias positivas a ninidrina no músculo (NPS)	37
4.6 Análise do volume celular	39
4.7 Análise da participação do Ca^{2+} na regulação do volume celular	41
4.8 Análise das vias de regulação do volume celular	44
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é basicamente dividido em duas grandes zonas, a Zona Oceânica e a Zona Nerítica. Segundo Brusca e Brusca (2003), a Zona Nerítica compreende parte da região do litoral e é a zona, ecologicamente, mais populosa em seres bentônicos devido, em grande parte, à penetração de luz solar, o que favorece o desenvolvimento de flora e fauna da cadeia alimentar. A linha da praia demarca a região do litoral, onde mar, ar e continente se encontram e interagem. Essa região é muito afetada pelo sobe e desce das marés e pode ser subdividida em zonas relativas às marés. A zona supralitoral é raramente coberta pela água, mesmo na maré mais alta. A zona eulitoral, ou zona intertidal, fica entre os níveis da maré alta e da maré baixa, e a zona sublitoral nunca fica descoberta, mesmo em maré baixa. Essas duas últimas zonas compreendem a Zona Nerítica.

Organismos que habitam a zona intertidal estão sujeitos à dinâmica e freqüente demanda de condições impostas por esse ambiente, onde a variação cíclica é um problema constante, com complexas variações temporais e espaciais. O problema de se viver na região costeira se origina devido à progressiva mudança dos padrões de maré e à ação das ondas. Mais obviamente existem os efeitos de estar na interface do habitat, o que afeta o balanço térmico e osmótico, a troca de gases, e as estratégias de alimentação para ambos, predadores ou herbívoros.

Diante desses problemas, a simples estratégia de evitá-los é extremamente importante. Quando a mudança é cíclica, e as condições possuem a garantia de melhorar e reverter dentro de um período estabelecido, uma boa lógica adaptativa é evitar o curto período de condições adversas simplesmente cessando a atividade, se escondendo, fechando a concha, ou se enterrando mais fundo. Além dessas estratégias comportamentais é possível evitar um estresse osmótico, ou mesmo a dessecação dos tecidos carregando um estoque de água, na câmara das brânquias, como em muitos crustáceos, ou na cavidade do manto dos moluscos. Uma outra possibilidade é ter um sistema intrínseco de revestimento. Pode ser muco, de valor limitado, mas presente em certos animais como as anêmonas; ou mais especificamente pode envolver tubos ou compartimentos, secretados pelo animal, e usualmente capazes de serem selados temporariamente através de um opérculo ou esfíncter. No entanto, para muitos outros organismos desprotegidos, de corpo frágil e que não conseguem evitar a condição, algum grau de tolerância e regulação é essencial, envolvendo fisiologia e bioquímica a nível celular ou do organismo como um todo (WILLMER et al., 2000).

A maioria dos invertebrados marinhos está em equilíbrio osmótico com o meio externo. Eles possuem a superfície do corpo permeável aos sais e à água de modo que a concentração dos fluidos corpóreos aumenta ou diminui de acordo com as mudanças na concentração da água do mar. Os invertebrados que vivem em mar aberto raramente ficam expostos a flutuações osmóticas. Já as condições encontradas ao longo da costa são bem menos constantes do que as do mar aberto (HICKMAN et al., 2003).

1.1 Osmoconformadores x Osmorreguladores

Com as variações diárias das marés e relativas ao ciclo lunar, existem períodos de condições hiperosmóticas, quando a maré está baixa, devido à evaporação da água das poças que se formam nas rochas e da água nas fendas, e também períodos de condições hiposmóticas devido às chuvas, que diluem a água do mar dessas poças (WILLMER et al., 2000).

Quando um animal se depara com uma alteração na concentração osmótica do meio, ele pode responder de duas maneiras: alterar a concentração osmótica de seus fluidos corpóreos tornando-se isosmótico (não necessariamente na mesma concentração osmótica, mas podendo ser ligeiramente acima ou abaixo) em relação ao meio, ou regular sua concentração osmótica permanecendo osmoticamente diferente face às alterações da concentração do meio. Tais animais são ditos osmoconformadores e osmorreguladores, respectivamente. Os osmoconformadores apresentam, aparentemente, alto grau de tolerância osmótica celular, enquanto que os osmorreguladores mantêm homeostase osmótica extracelular estrita face às grandes diferenças ambientais na concentração de eletrólitos (RANDALL et al., 2000). Os tecidos internos de animais osmorreguladores dependem basicamente da regulação osmótica do líquido extracelular para manter o volume celular; já células de animais osmoconformadores variam seu volume em função da diluição ou concentração do meio interno. Essa variação do meio interno, conseqüentemente, exige que esses animais apresentem mecanismos de regulação de volume celular, caso contrário seu sucesso no ambiente seria comprometido.

A grande maioria dos invertebrados marinhos não apresenta órgãos ou estruturas especializadas responsáveis pela manutenção da constância do meio interno. Esses animais possuem fluidos corpóreos com a mesma pressão osmótica que a água do mar, ou seja, são isosmóticos em relação ao meio e, portanto, osmoconformadores. Nesses invertebrados a composição osmótica e iônica do meio interno acompanha as variações do

meio externo, podendo diante de variações da salinidade do meio externo, apresentar certo grau de regulação iônica e volume celular. Ou seja, isso não significa que seus fluidos corpóreos apresentem a mesma composição de solutos que a água do mar (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

A capacidade de regulação de volume nas células de animais osmoconformadores submetidos a choque osmótico pode estar limitada a uma faixa estreita de concentração osmótica (estenoalino) ou a uma ampla faixa, como no caso dos eurialinos (PIERCE, 1982).

1.2 Regulação do volume celular – RVD e RVI

Animais osmoconformadores rapidamente incham em resposta ao influxo osmótico de água produzido por um estresse hiposmótico, mas depois de um tempo na salinidade reduzida, recuperam, ao menos em parte, seu volume original. Esse influxo osmótico de água no compartimento extracelular resulta numa diluição do meio extracelular. Essa diluição representa um choque osmótico para as células, que devem, portanto, apresentar capacidade de regulação de volume (PIERCE, 1982). Deste modo, o volume celular é regulado de maneira que a célula retorne ao seu volume normal após um distúrbio, e permaneça relativamente estável, para poder desempenhar suas diferentes funções. Quando a célula, depois de inchar, utiliza mecanismos para diminuir seu volume, este processo é chamado de redução regulatória de volume (**RVD**). Por outro lado, mecanismos utilizados para restabelecer o volume perdido - devido a um choque hiperosmótico - recebem o nome de aumento regulatório de volume (**RVI**) (HOFFMANN & DUNHAM, 1995).

Tanto a **RVD** como a **RVI** podem ser o resultado da ativação de um ou mais sistemas de transporte de solutos orgânicos e/ou inorgânicos. Durante a **RVD**, as células recuperam seu volume devido à saída de solutos juntamente com a água. Quando o volume celular retorna a valores próximos aos iniciais, as células estão praticamente isosmóticas em relação ao novo meio e, se transferidas ao meio isosmótico, isto é, ao meio de antes do choque, comportam-se como em meio hiperosmótico e sofrem redução de volume (**Fig. 1-A**). Já durante a **RVI**, o volume é recuperado graças à entrada de solutos, que carregam água para dentro da célula. Se essas células, após recuperarem o volume perdido, forem perfundidas com solução isosmótica, comportar-se-ão como se estivessem em solução hiposmótica apresentando aumento de volume (**Fig. 1-B**) (HALLOWS & KNAUF, 1994).

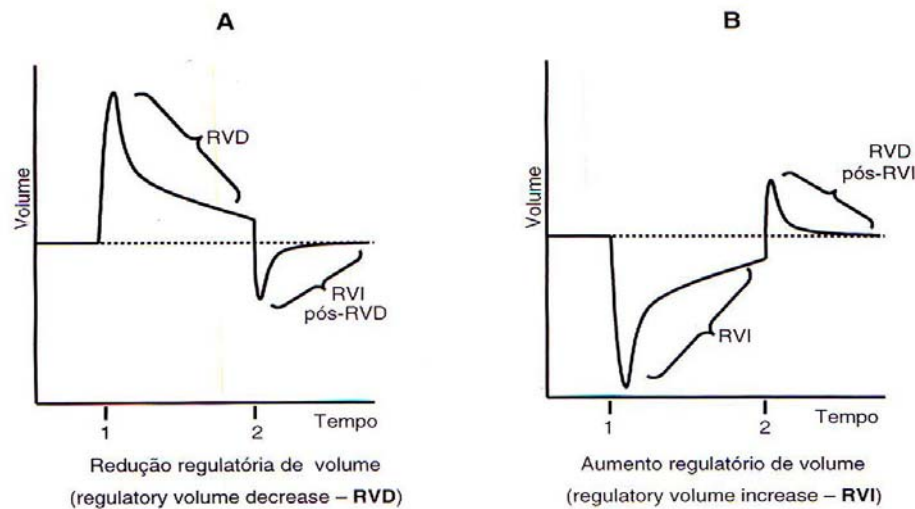


Figura 1 – Comportamento de células ou tecidos quando submetidos a choques anisomóticos agudos. A – choque hiposmótico; B – choque hiperosmótico (tempo 1) e quando novamente submetidos à condição isosmótica anterior ao choque (tempo 2) .

O processo de regulação do volume celular é parte essencial de uma variedade de funções importantes para o bom funcionamento da célula. Principalmente em células animais, que por não possuírem parede celular rígida e pela membrana plasmática ser suficientemente permeável a água, estão sujeitas à entrada e saída de água de acordo com as variações de solutos tanto intra como extracelulares. Isto significa que para a manutenção do volume celular, a osmolalidade efetiva intracelular deve ser sempre igual à osmolalidade efetiva extracelular (RUSSELL, 2000).

Diante de um choque hiposmótico, para conter o inchaço celular e prevenir uma eventual lise osmótica, as células liberam solutos osmóticos juntamente com água e recuperam o volume celular, mas, usualmente, não alcançando o nível original. Aliás, poucas células são capazes de recuperar seu exato volume original (PIERCE, 1982). De fato, estudos utilizando tecidos isolados de invertebrados diante de choque hiposmótico têm demonstrado recuperação do volume celular. Segundo Souza e Scemes (2000), a exposição de tecido cardíaco de *Aplysia brasiliana* (um molusco marinho osmoconformador) a um choque hiposmótico (26% de redução) revela um aumento do volume do tecido de cerca de 20%, retornando aos valores próximos do original depois de 60 min. Eritrócitos do molusco *Noentia poderosa* rapidamente incham diante de choque hiposmótico (60% de redução) e

dentro de 10 minutos de exposição começam a recuperar o volume. Após 2 horas de exposição ao meio hiposmótico, os eritrócitos exibem uma recuperação parcial do volume (SMITH & PIERCE, 1987). No entanto, células isoladas do molusco *Lymnae stagnalis* não exibiram RVD após inchar diante de um choque hiposmótico de 30% (MORRIS et al., 1988).

Contrariamente à recuperação do inchaço celular – mesmo que parcialmente – diante de um choque hiposmótico, estudos com tecidos isolados, tanto de invertebrados como vertebrados, têm demonstrado que, na maioria dos casos, o murchamento induzido por aplicação de condições hiperosmóticas não é seguido por um ajuste de volume. Regulação de volume não foi encontrada em axônios isolados do crustáceo decápoda *Carcinus maenas* após choque hiperosmótico (KÉVERS et al., 1979). Também não há evidência de aumento regulatório de volume em nenhuma célula cardíaca de mamíferos durante choque hiperosmótico. Em contraste, cardiomiócitos de invertebrados marinhos podem regular volume em resposta a aumentos da concentração osmótica do ambiente (DEATON, 1997). Nem todas as células possuem a capacidade de retornar ao seu volume original após um choque hiperosmótico, possivelmente pelo fato dos mecanismos implicados serem lentos demais para induzir uma mudança de volume significativa, pelo menos durante os tempos experimentais utilizados (KÉVERS et al., 1979).

1.3 Osmólitos orgânicos e osmólitos inorgânicos

Recentemente, é cada vez mais aceito que não somente osmólitos inorgânicos como Na^+ , K^+ e Cl^- são empregados pra restabelecer o equilíbrio osmótico da célula, mas que também osmólitos orgânicos têm um papel significativo na homeostase do volume celular. Embora ainda se discuta sobre a mobilização do diferentes osmólitos durante a regulação de volume, segundo Hoffmann e Dunham (1995), a resposta imediata ao aumento ou diminuição do volume da célula (de segundos a minutos) é essencialmente perda ou tomada de eletrólitos pela célula (**RVD** e **RVI** a curto prazo, respectivamente). Em uma escala maior de tempo (de horas a dias), a regulação de volume depende principalmente da perda ou do acúmulo de osmólitos orgânicos dentro da célula (**RVD** e **RVI** a longo prazo, respectivamente).

A maior parte da literatura existente indica que osmólitos inorgânicos, usualmente uma combinação de K^+ ou Na^+ (menos freqüente) com Cl^- , predominam nos mecanismos de recuperação de volume celular de animais aquáticos (principalmente dulcícolas) que não encontram rotineiramente altas concentrações osmóticas (talvez no

máximo 300-400 mOsm/kg H₂O) no meio externo. Além disso, a maior parte da literatura também indica que osmólitos orgânicos, usualmente aminoácidos livres ou componentes de amônia quaternária, são a maioria dos osmólitos em células de organismos que normalmente encontram uma maior amplitude, ou uma variação mais elevada na pressão osmótica do meio externo. Animais marinhos e de estuários são exemplos comuns desse último tipo (PIERCE & POLITIS, 1990).

O acúmulo intracelular de osmólitos orgânicos envolve principalmente dois processos. O primeiro representa a tomada através da membrana celular por sistemas de transporte específicos, o segundo representa a geração intracelular dos osmólitos através de reações metabólicas (WEHNER et al., 2003), como a quebra de proteínas em aminoácidos por exemplo. Assim, alterações no volume celular podem afetar a taxa e direção do metabolismo (LANG & WALDEGGER, 1997).

1.4 Vias de regulação do volume celular

A regulação do volume celular ocorre graças à perda ou ganho de solutos osmoticamente ativos (osmólitos). Assim, o ajuste do volume tanto em condições hiposmóticas como hiperosmóticas depende da ativação de canais, ATPases e outros transportadores, tendo em vista que, osmólitos orgânicos ou inorgânicos, tais como íons Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻, são impermeantes, ou seja, não se difundem através da bicamada lipídica (RANDALL et al., 2000).

De um modo geral, células submetidas a um estresse osmótico mobilizam solutos orgânicos e/ou inorgânicos. A tomada de moléculas orgânicas na RVI pode ser dependente ou não do influxo de Na⁺. Já durante a RVD algumas células liberam KCl ou NaCl através da ativação de canais de K⁺ e Cl⁻ (ou Na⁺ e Cl⁻), cotransporte K⁺-Cl⁻ ou ainda ativação paralela dos trocadores K⁺/H⁺ e Cl⁻/HCO₃⁻ (HOFFMANN & DUNHAM, 1995; LANG et al., 1998; WEHNER et al., 2003) (Fig. 2).

Durante um choque hiposmótico a mobilização de osmólitos orgânicos pode ocorrer através de um efluxo acoplado ao Na⁺, assim como também independente ao Na⁺, mas utilizando uma via de transporte de ânions (LANG et al., 1998; WEHNER et al., 2003).

volume celular foi encontrada em muitos sistemas celulares. Em particular, a regulação do inchaço celular (RVD) parece estar frequentemente acompanhada pela sinalização de cálcio (LANG et al., 1998; WEHNER et al., 2003). No caso de um estresse hiperosmótico, outros processos de transdução de sinal parecem ser responsáveis pela recuperação do volume celular, os relatos de que a RVI é dependente de cálcio são muito raros (ERICKSON et al., 2001).

Está bem estabelecido portanto, que o cálcio afeta a recuperação de volume celular depois de um estresse hiposmótico. A inibição da RVD quando uma célula incha na ausência de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) representa uma observação básica em muitos estudos que se propõem a demonstrar a dependência de Ca^{2+} para a RVD. Em outros exemplos, o processo de recuperação de volume não é sensível ao ($[\text{Ca}^{2+}]_e$, mas mudanças no $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alteram a recuperação de volume após um choque hiposmótico, alterando o padrão de efluxo de osmólitos.

De acordo com Pierce e Politis (1990) independente da recuperação de volume diante de um estresse hiposmótico ser sensível ao $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ou somente ao $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o cátion divalente causa seu efeito alterando o transporte de ao menos um dos dois tipos gerais de osmólitos (orgânicos e inorgânicos).

1.6 Equilíbrio osmótico e iônico em cnidários

Cnidários marinhos são geralmente considerados osmoconformadores com a concentração osmótica do seu fluido do celêntero similar à concentração osmótica do ambiente que os rodeia. Pierce e Minasian (1974), Bursey e Harmer (1979) e Benson-Rodenbough e Ellington (1981) encontraram que, dentro de 6 horas de aclimatação a uma nova salinidade o fluido do celêntero de anêmonas do mar alcançou o equilíbrio com o novo ambiente. Como resultado, as células desses animais devem regular volume para prevenir mudanças significativas de tamanho. Entre os cnidários, regulação de volume celular tem sido demonstrada estar acompanhada da regulação de “pool” intracelular de aminoácidos. Sendo a análise feita com base na hidratação do tecido e variação da concentração de aminoácidos totais.

Pierce e Minasian (1974) encontraram que a anêmona *Diadumene leucolena* osmoconforma diante de meio diluído (salinidade variando de 6 a 33‰) e que a regulação de volume desse animal é acompanhada da regulação de um “pool” intracelular de aminoácidos. Já Bursey e Hamer (1979) submeteram a anêmona *Condylactis gigantea* a choques hipo e

hiperosmóticos e encontraram que esse animal osmoconforma em salinidades variando de 20 a 45‰.

Também, segundo Benson-Rodenbough e Ellington (1981), diante de um estresse hiposmótico (salinidade 15‰) houve aumento na hidratação tecidual da anêmona do mar *Bunodosoma cavernata*, a maior parte desse excesso de água tecidual foi eliminada no quarto dia de aclimatação a essa salinidade. Animais expostos a um estresse hiperosmótico (salinidade 45‰) continuaram a perder água até o quarto dia e nas próximas 24 horas haviam recuperado a hidratação tecidual. O mecanismo que fundamenta essa regulação de volume celular foi demonstrado através de observações da mudança do conteúdo de NPS (substâncias ninidrina-positivas) desse tecido. Ou seja, o nível de NPS em *Bunodosoma cavernata* varia conforme aclimatação a diferentes salinidades.

Howard e colaboradores (1986) estudaram como a flutuação de salinidade dentro de ciclos sazonais afeta o “pool” de aminoácidos de *Bunodosoma cavernata* diante de condições naturais. A variação sazonal de salinidade encontrada foi de 17 a 36‰, tendo um valor médio de 30‰, e o teor hídrico tecidual das anêmonas variou de 87% (à salinidade 17‰) a 76% (à salinidade 36‰), com valor médio de hidratação do tecido ao redor de 81%. Considerando-se que os animais teriam um comportamento passivo diante dos fluxos osmóticos, seria esperada variação da hidratação maior do que as observadas nas duas condições de salinidade. No entanto, os autores conseguiram evidenciar variação do “pool” de aminoácidos que estariam envolvidos com os ajustes osmóticos, impedindo assim variações bruscas da hidratação tecidual.

Segundo Deaton & Hoffmann (1988) durante a aclimatação da anêmona do mar *Metridium senile* à água do mar diluída, houve aumento na hidratação tecidual. Entretanto, esse aumento não foi menor do que a mudança de salinidade do ambiente, indicando que essas anêmonas regulam volume parcialmente. O mecanismo responsável por essa regulação de volume é a diminuição significativa de um pool inicial de aminoácidos, principalmente de taurina. Já durante a aclimatação da anêmona do mar *Anthopleura xanthogrammica* a um meio hiperosmótico (150‰) ocasionou um aumento de 27% no “pool” intracelular de aminoácidos (MALE & STOREY, 1983).

O papel de osmólitos orgânicos na adaptação de cnidários marinhos à mudança de salinidade tem sido muito bem documentado (como apresentado acima). No entanto estudos analisando a participação de osmólitos inorgânicos são raros, como o de La Spada e colaboradores (1999) que estudaram a redução regulatória de volume (RVD) em nematocistos isolados de *Aiptasia diaphana*, e encontraram, durante choque hiposmótico de

35%, um esperado aumento de volume dos nematocistos seguido de RVD. Em um estudo posterior também com *Aiptasia diaphana* Marino e La Spada (2004) analisaram a RVI em nematocistos isolados e encontraram a capacidade de regular volume celular após um choque hiperosmótico pela tomada de Na^+ , com envolvimento do trocador $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$.

Cabe ressaltar que os estudos sobre a participação dos osmólitos orgânicos foram realizados em anêmonas submetidas à variação de salinidade, enquanto os dois relatos de participação de osmólitos inorgânicos, durante um choque hiposmótico, foram avaliados em células isoladas. Não havendo, até então, nenhuma análise da dinâmica da mobilização de osmólitos inorgânicos e/ou orgânicos durante o ajuste osmo-iônico, como será proposto no presente trabalho.

1.7 Justificativa e apresentação do presente trabalho

As anêmonas do mar *Bunodosoma caissarum* e *Actinia bermudensis* são animais exclusivamente marinhos pertencentes ao filo Cnidaria, classe Anthozoa e que apresentam organização ao nível tecidual. São conhecidas por sua ampla distribuição pelo litoral brasileiro, onde o valor médio de salinidade é de aproximadamente de 34‰. Estas espécies são encontradas entre salinidades de 20 a 38‰ (D.Vidolin, comunicação pessoal), sendo reportadas como apresentando tolerâncias variáveis às oscilações de salinidade observadas em diferentes ciclos de marés. Essas anêmonas vivem associadas ao substrato rochoso na zona entre marés ou zona intertidal e por serem funcionalmente sésseis e, portanto, incapazes de escapar com eficiência de situações desfavoráveis que acontecem nessa região, elas devem realizar ajustes intracelulares de modo a compensar as variações osmóticas do meio.

A literatura sobre aspectos fisiológicos em *Bunodosoma caissarum* é extremamente pobre. O primeiro trabalho foi desenvolvido por Mendes (1976) e tratava da caracterização química na junção neuromuscular. Os demais trabalhos até o presente dizem respeito à toxina liberada pelo animal, desde aspectos químicos até mecanismos de ação (MALPEZZI et al., 1993; ALE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004), sem nenhuma consideração sobre a adaptação osmo-iônica do animal. Quanto a *Actinia bermudensis*, a carência de informação é ainda maior, não há registros de estudos fisiológicos com o animal.

Considerando-se os aspectos discutidos acima, torna-se de fundamental relevância o estudo dos mecanismos envolvidos com o equilíbrio osmótico e iônico desses animais, que vivem bem adaptados à condição estressante de oscilações de salinidades típicas

da região intertidal. Preenchendo assim, uma lacuna no conhecimento da Fisiologia Comparada, principalmente no que diz respeito à abordagem celular, de invertebrados eurialinos sob condição natural de estresse osmo-iônico.

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar comparativamente a capacidade de regulação osmo-iônica de *Bunodosoma caissarum* e *Actinia bermudensis* diante de estresse salino.

Objetivos específicos

- Determinar o comportamento osmo-iônico das duas espécies, se elas são osmoconformadoras ou não;
- Descrever os mecanismos regulatórios envolvidos com a resposta osmo-iônica de ambas as espécies durante adaptação a variação de salinidade;
- Caracterizar a variação de volume de células isoladas de ambas as espécies quando expostas a estresse hipo e hiperosmótico;
- Investigar a participação do Ca^{2+} como sinalizador do processo regulatório;
- Determinar as vias de transporte envolvidas na regulação do volume celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OS ANIMAIS

Reino Animalia

Filo Cnidaria

Classe Anthozoa

Ordem Actiniaria

Família Actiniidae

Gênero *Bunodosoma*

Espécie *Bunodosoma caissarum* (Corrêa, 1964)



Foto: Álvaro Esteves Migotto

Gênero *Actinia*

Espécie *Actinia bermudensis* (McMurrich, 1889)



Foto: Álvaro Esteves Migotto

Figura 3: Fotografias das duas espécies de anêmonas do mar em seu ambiente natural (diâmetro em torno de 3 cm em *Actinia bermudensis* e 6 cm em *Bunodosoma caissarum*).

3.2 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

3.2.1 Local de Coleta

As duas espécies foram coletadas no costão rochoso da Segunda Pedra, praia de Itapema do Norte (48°30'W e 26°07'S) localizada no município de Itapoá (SC). A coleta foi realizada manualmente durante os períodos de maré baixa. Os animais coletados foram transportados em um recipiente de plástico com aerador a pilha, na própria água do ambiente de onde eles foram retirados, até o laboratório de Bioensaios, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina.



Figura 4: Fotografia do local de coleta – Pedra do meio, Itapema do Norte, Itapoá SC.

3.2.2 Manutenção dos animais

No Laboratório os animais foram mantidos em aquários de vidro com água do mar 30‰ (900 mOsm, a mesma salinidade encontrada no local de coleta), aerador, filtro biológico de fundo e filtro de carvão ativado, com o pH variando de 7,17 a 7,74. A temperatura ambiente foi mantida em aproximadamente 25°C, e o fotoperíodo era de 12/12 h claro-escuro. Os animais eram alimentados com pequenos pedaços de camarão ou peixe, uma vez por semana. Os parâmetros físico-químicos da água eram monitorados semanalmente.



Figura 5: Fotografia do aquário onde os animais eram mantidos

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS DOS ANIMAIS AOS CHOQUES OSMÓTICOS

Representantes das duas espécies foram submetidos a um choque hipo e um hiperosmótico de 25‰ e 37‰ (750 e 1130 mOsm/KgH₂O respectivamente) arbitrariamente definidos, por um período de 6 horas, na tentativa de simular o período de duração das marés. Após essa exposição, o fluido do celêntero foi retirado com auxílio de uma seringa (Fig. 6) e então armazenado para posterior dosagem de íons, osmolalidade e substâncias positivas a ninidrina (NPS, aminoácidos totais). Também foi retirada uma fatia do músculo do disco pedal do animal para a dosagem dos mesmos íons, das NPS e para análise do teor hídrico.

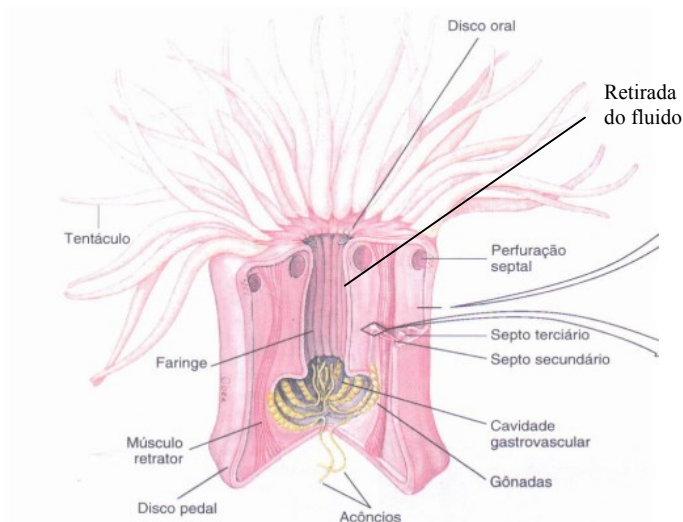


Figura 6: Esquema ilustrativo da estrutura interna de uma anêmona do mar, mostrando o local de retirada do fluido do celêntero (HICKMAN et al., 2003).

3.3.1 Dosagem de íons e medida da osmolalidade no fluido do celêntero

Uma alíquota do fluido foi devidamente diluída para a dosagem dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- . Os íons Na^+ e K^+ foram dosados por fotometria de chama (Analyser 900), enquanto Cl^- foi dosado por método colorimétrico que consiste na reação dos íons cloretos da amostra com tiocianato de mercúrio, formando cloreto mercúrio e íons tiocianato. Os íons tiocianato quando combinados com os íons férricos formam tiocianato férrico, de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloretos (*Kit Labtest®*). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Schimadzu 1203 UV). A medida da osmolalidade foi feita em osmômetro crioscópico (Gonotec Osmomat 30).

3.3.2 Teor hídrico

O teor hídrico tecidual foi calculado como uma forma de avaliar a variação de volume. Após exposição dos animais às condições experimentais, um pedaço do músculo pedal foi retirado, pesado em balança analítica com 0,1 mg de precisão (Celtac, FA2104N) para a obtenção do peso úmido (P_u). Em seguida, o tecido foi desidratado em estufa a 60 °C durante 24 horas e então pesado novamente para a obtenção do peso seco (P_s). O teor de hidratação do tecido (Th) pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$Th (\%) = \frac{(P_u - P_s)}{P_u} \times 100$$

3.3.3 Dosagem de íons no músculo

Após a retirada da fatia do músculo dos animais, este foi levado em um *ependorf* a estufa 60° por 24 horas. Após esse período foi adicionado ao *ependorf* HNO₃ 0,75N por 24 horas para a extração dos íons. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior dosagem dos íons, pelos mesmos métodos descritos acima. Ao *ependorf* foi então adicionado NaOH 1N para solubilização das proteínas, que foram dosadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951). A concentração de íons foi expressa pela concentração de proteínas do músculo.

3.3.4 Teor de substâncias positivas a ninidrina (NPS)

Para a análise da NPS foi utilizado o método colorimétrico em espectrofotômetro adaptado por Amado (2002) como descrito a seguir.

Fatias do tecido (em torno de 25 mg) do disco pedal dos animais expostos às condições experimentais foram retirados e pesados para obtenção do peso úmido. O tecido foi então transferido para um tubo de plástico contendo 0,5 ml de água destilada e macerado com uma “pitada” de areia fina e auxílio de um bastão de vidro. Em seguida foi adicionado ao tubo, 1,25 ml de etanol 95 % e após a formação de um precipitado, as amostras foram centrifugadas (por 5 min a 5000 g, em centrífuga Janetzki T24) e o sobrenadante foi utilizado como amostra.

Para a reação das NPS, os tubos foram preparados em duplicata contendo 0,5 ml da amostra, 0,250 ml de tampão citrato (CLARK, 1968) e 0,6 ml de reagente de ninidrina, o qual foi preparado utilizando 5 ml de uma solução estoque saturada de ninidrina (10g de ninidrina em etileno glicol) mais 2 ml de ácido ascórbico 1 % e completado para 60 ml de etileno glicol. Os padrões foram preparados nas concentrações de 1,25 a 25 µg/ml de glicina em água destilada. Após o preparo os tubos foram levados a um banho-maria a 100 °C por 20 min, resfriados e a eles foi adicionado 1,5 ml de etanol 60 %. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, o comprimento de onda utilizado foi de 570 nm.

Uma outra adaptação foi utilizada para a dosagem de NPS no fluido do celêntero. Não havia necessidade de se preparar um macerado, por isso essa etapa foi excluída. Então, para a reação de NPS, 0,5 ml de amostra do macerado foi substituído por 400 µl de álcool 95% + 100 µl de fluido do celêntero, e todo o restante do processo foi realizado como descrito acima.

3.4 ANÁLISE DO VOLUME CELULAR *IN VITRO*

3.4.1 Definição das soluções experimentais

Com base nos resultados das variações iônicas e da osmolalidade analisadas no fluido do celêntero dos animais expostos às diferentes condições experimentais, foram definidas as soluções para a análise do volume em células isoladas. A composição da salina controle resultou na concentração osmótica de 975 mOsm.

Solução Salina Controle (isosmótica) - concentração medida: 975 mOsm – pH: 7,13

	g/l	mM
NaCl	29,25	500
KCl	0,748	10
MgSO ₄	6	50
NaHCO ₃	0,25	3
CaCl ₂	1,1	10
HEPES <i>acid</i>	0,595	2,5
HEPES <i>Na⁺ salt</i>	0,623	2,5

Solução Salina Hiposmótica – concentração medida: 785 mOsm – pH: 7,23

	g/l	mM
NaCl	23,4	400
KCl	0,598	8
MgSO ₄	4,8	40
NaHCO ₃	0,2	2,4
CaCl ₂	0,88	8
HEPES <i>acid</i>	0,476	2
HEPES <i>Na⁺ salt</i>	0,498	2

Solução Salina Hiperosmótica – concentração osmótica medida: 1225 mOsm – pH: 7,2

	g/l	mM
NaCl	35,1	600
KCl	0,897	12
MgSO ₄	7,2	60

NaHCO ₃	0,3	3,6
CaCl ₂	1,32	12
HEPES <i>acid</i>	0,714	3
HEPES <i>Na⁺ salt</i>	0,747	3

Soluções Salinas sem Ca²⁺

Foram preparadas as soluções salinas (conforme descrição acima) controle, hiposmótica e hiperosmótica sem a adição de CaCl₂ e com a adição de EDTA (1,86 g/l; 5mM).

3.5 DISSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS

A dissociação foi realizada segundo método enzimático adaptado de Souza e colaboradores (2002). Pequenos pedaços de tecido do disco pedal do animal foram colocados em um tubo de plástico contendo 5 ml de solução salina controle sem Ca²⁺. Após 20 min, no mesmo tubo foram adicionados 500 µl de solução de tripsina (10 mg/ml, preparada em solução salina controle sem Ca²⁺). O tubo foi então levado a um banho a 37 °C por 1 hora auxiliado por dissociação mecânica em movimentos repetitivos com pipeta *pasteur*. Após esse período, o conteúdo do tubo foi transferido para uma solução de 0,1% de BSA (Albumina de soro bovino, preparada com solução salina controle) para interromper a ação enzimática. Após 20 minutos o tubo foi centrifugado, o sobrenadante descartado e as células foram resuspensas em solução salina controle. Essas células em suspensão foram então transferidas para uma lamínula (GlassTécnica de 22mm de diâmetro) adaptada a uma lâmina de acrílico, onde ficaram repousando até aderirem à lamínula (+ ou - 1 hora). Para cada condição experimental foram realizadas no mínimo 3 dissociações; utilizando um animal de cada espécie por dissociação.

3.6 ANÁLISE DO VOLUME CELULAR

Antes de começar a análise do volume, as lâminas eram lavadas com solução salina controle para que restassem somente as células que aderiram a lamínula. As células das duas espécies eram muito semelhantes tanto em forma (esféricas) como em tamanho, com a média do diâmetro de $13 \pm 0,3 \mu\text{m}$ em *Actinia bermudensis*, e de $12,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$ em *Bunodosoma caissarum* (Fig. 7).



Figura 7: Campo de análise do volume celular. À esquerda, células de *Actinia bermudensis*, à direita de *Bunodosoma caissarum*

A análise do volume celular foi realizada em microscópio invertido (*Motic AE31*) diante dos choques hiposmótico, hiperosmótico, hiposmótico sem Ca^{2+} , e hiperosmótico sem Ca^{2+} num intervalo de tempo de 20 min. A lâmina de acrílico contendo as células em solução salina controle era fotografada (tempo 0), a solução salina controle era substituída pela solução salina experimental e então, as mesmas células eram fotografadas novamente 2, 5, 10, 15 e 20 minutos após a exposição à condição experimental. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (*Moticam 480*) e submetidas à análise de imagens (*Motic Images 2000 -1.3*). O diâmetro celular foi medido e então utilizado na seguinte fórmula para calcular o volume celular:

$$V = 4/3\pi r^3$$

3.7 ANÁLISE DE POSSÍVEIS VIAS DE REGULAÇÃO DO VOLUME CELULAR

Foi avaliado o volume celular na presença de alguns bloqueadores das principais vias de transporte iônico envolvidas na regulação do volume diante de choque anisomótico.

3.7.1 Participação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

A participação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ tanto na RVD como na RVI foi examinada empregando-se ouabaína, um glicosídeo cardíaco, inibidor seletivo para esta bomba. As células foram previamente preparadas como descrito acima, como já mencionado anteriormente, foi realizada uma medida inicial controle e então essas células foram submetidas às soluções hiperosmótica e hiposmótica, acrescida de $100\mu\text{M}$ de ouabaína.

3.7.2 Participação do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

A participação do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ no acúmulo de Cl^- durante o choque hiperosmótico foi examinada empregando-se como inibidor desse contra-transporte, $200\mu\text{M}$ de 2,2-ácido dissulfídrico 4,4-diisotiocianatostilbeno (DIDS) na solução hiperosmótica em que as células foram expostas.

O mesmo transportador foi avaliado durante o choque hiposmótico como possível via de efluxo de osmólito orgânico (KIRK et al., 1992; PASANTES-MORALES et al., 1999).

3.7.3 Participação do cotransporte $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$

A participação do cotransporte $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$ na RVI foi examinada empregando-se o inibidor furosemida. As células foram submetidas à solução salina hiperosmótica acrescida $100\mu\text{M}$ desse bloqueador.

3.7.4 Participação do trocador Na^+/H^+

Para descrever a participação do trocador Na^+/H^+ na RVI, as células preparadas para o experimento foram submetidas à solução hiperosmótica acrescida de 100 μM de amilorida, inibidor desse trocador.

3.7.5 Participação do cotransportador K^+-Cl^-

A participação do cotransporte K^+-Cl^- foi examinada empregando-se o bloqueador furosemida, agora na concentração de 3 mM, juntamente com a solução salina hiposmótica.

3.7.6 Participação de aquaporinas

A literatura descreve que canais de água (aquaporinas, AQP1, AQP2, AQP3 e AQP5) são sensíveis a mercúrio ($\geq 300 \mu\text{M}$ HgCl_2 ; MARINELLI et al., 1997; MEINILD et al., 1998; BELYANTSEVA et al., 2000; WATANABE et al. 2005). Assim, o fluxo de água através de aquaporinas foi avaliado pela adição do HgCl_2 (300 μM) na solução hiposmótica. A participação desse transporte foi avaliada apenas para a espécie *Bunodosoma caissarum*.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os resultados foram calculados média e erro padrão da média ($X \pm \text{SE}$) e então submetidos à análise estatística. Os testes utilizados foram ANOVA (análise de variância de um fator) seguido de SNK (*Student-Newman-Keuls*) para a análise dos parâmetros *in vivo* e teste *t*-Student para a comparação entre as espécies. Nos ensaios *in vitro* a análise de volume durante o choque anisomótico foi avaliada segundo ANOVA de um fator com medidas repetidas, seguida de SNK; o aumento e a diminuição máxima de volume na presença de bloqueadores de transporte de membrana foi avaliado por ANOVA (análise de variância de um fator) seguida de SNK. A dependência de cálcio na regulação de volume celular foi analisada por teste *t*-Student. Nível de significância utilizado $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Dosagem de íons e medida da osmolalidade no fluido do celêntero

A medida da osmolalidade do fluido do celêntero de *Actinia bermudensis* acompanhou a variação da salinidade da água em 25‰ e em 37‰ foi ligeiramente maior que o meio (de 911 ± 33 mOsm/kgH₂O em 30‰ para $746,6 \pm 9,3$ mOsm/kgH₂O em 25‰; e para $1186,7 \pm 34,9$ mOsm/kgH₂O em 37‰, $p < 0,05$, $n = 3 - 4$), ou seja, a osmolalidade do fluido aumentou na presença de um choque hiperosmótico, sendo que na presença de um choque hiposmótico diminuiu na mesma magnitude da alteração da salinidade da água. Já a de *Bunodosoma caissarum* apresentou diferença significativa em relação ao controle, apenas em 37‰ (de $919,6 \pm 20,6$ mOsm/kgH₂O para $1116,7 \pm 8,2$ mOsm/kgH₂O, $p < 0,05$, $n = 4-5$), ou seja, o animal manteve a osmolalidade do fluido apesar da exposição a um choque hiposmótico, e alterou a osmolalidade na mesma proporção da alteração da salinidade da água quando em choque hiperosmótico (Fig. 8).

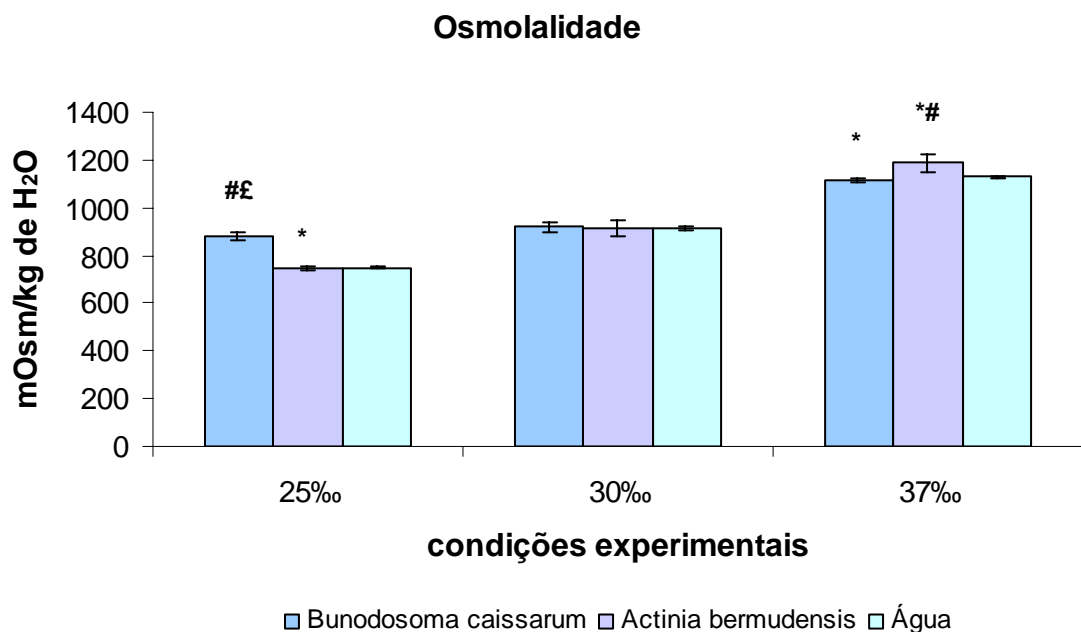


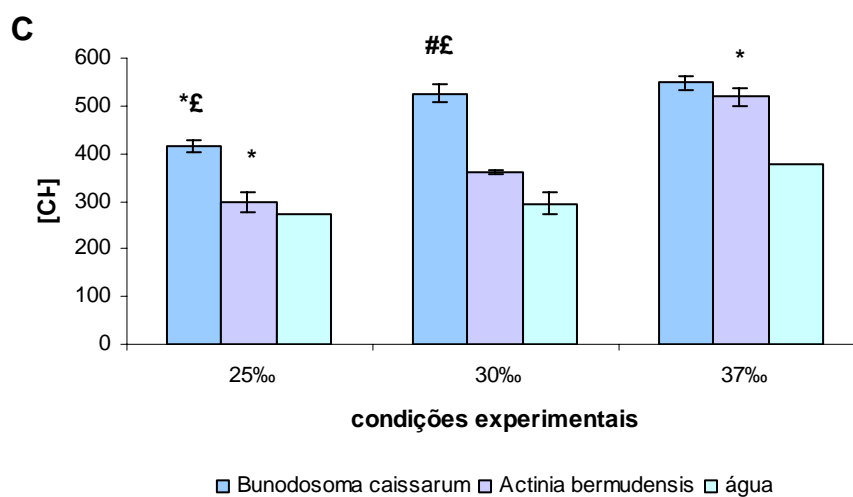
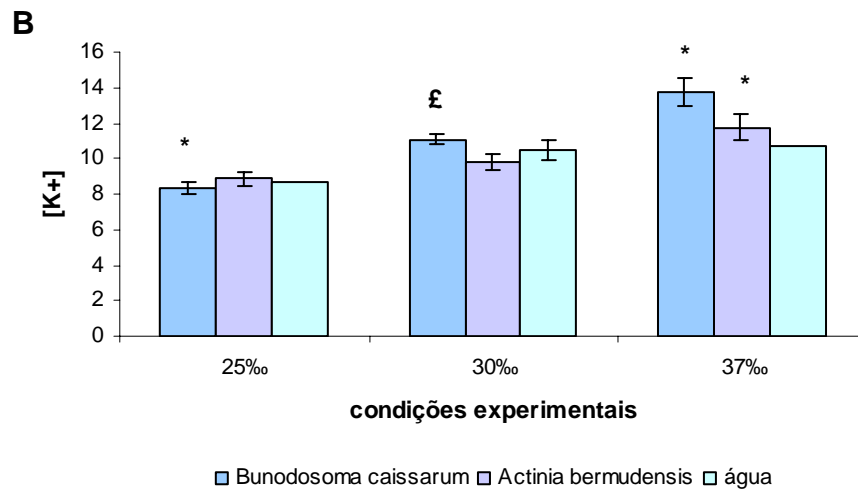
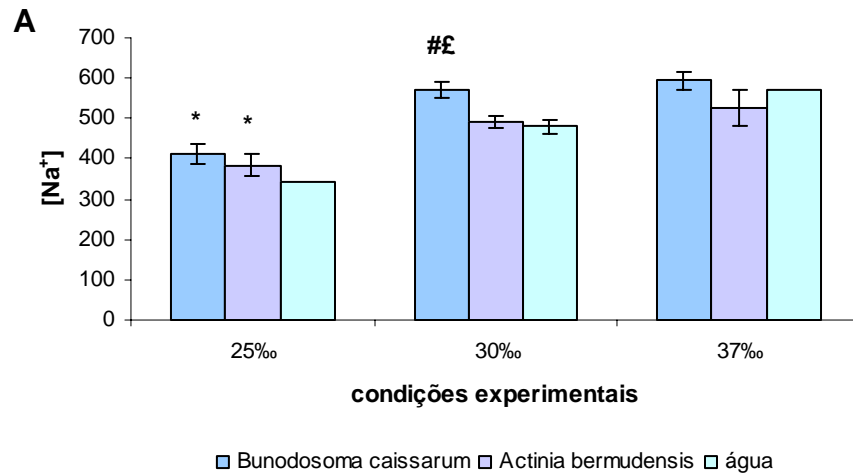
Figura 8: Variação da osmolalidade (mOsm/kg H₂O) do fluido do celêntero das duas espécies quando expostas às diferentes condições experimentais. As barras em azul claro ilustram a osmolalidade da água em que os animais foram expostos (* indica diferença significativa em relação ao seu próprio controle 30‰, $p < 0,05$, $n = 3 - 6$; # indica diferença significativa em relação à água a que o animal foi exposto, $p < 0,05$, $n = 3 - 6$; e £ indica diferença significativa quando as duas espécies são comparadas na mesma condição experimental, $p < 0,05$, $n = 3 - 5$).

Em relação à análise da concentração iônica do fluido, *Actinia bermudensis* apresentou diminuição dos íons Na^+ e Cl^- em 25%. A variação de Na^+ foi de 22% (de $491,15 \pm 16,2$ para $382,7 \pm 27$ mmoles/L $p < 0,05$, $n = 4-6$), já o íon Cl^- diminuiu 17,2% (de $360,37 \pm 2,73$ para $298,51 \pm 19,72$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 4-5$). Em 37% houve variação significativa apenas dos íons K^+ e Cl^- . Houve um aumento de 19,6% (de $9,81 \pm 0,42$ para $11,75 \pm 0,71$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 5-6$) para o íon K^+ e de 43% para o íon Cl^- (de $360,37 \pm 2,73$ para $518,2 \pm 19,6$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 4-5$) (Figs. 9A, 9B e 9C).

Bunodosoma caissarum apresentou diminuição significativa de todos os íons durante a exposição ao choque hiposmótico. A variação de Na^+ foi de 28% (de $571,71 \pm 18,99$ para $411,68 \pm 26,1$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 6 - 7$), a de K^+ foi de 24,8% (de $11,1 \pm 0,26$ para $8,35 \pm 0,34$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 5 - 7$) e o íon Cl^- diminuiu 21% (de $526,1 \pm 19$ para $415,6 \pm 13,9$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 5$). Na condição 37% apenas o íon K^+ apresentou diferença significativa em relação à situação controle. Houve um aumento de 24,3% na concentração do íon (de $11,08 \pm 0,26$ mmoles/L para $13,77 \pm 0,8$ mmoles/L, $p < 0,05$, $n = 4-7$) (Figs. 9A, 9B e 9C).

4.2 Concentração de substâncias positivas a ninidrina no fluido (NPS)

A análise da concentração de NPS no fluido do celêntero de *Actinia bermudensis* na condição hiposmótica demonstrou um aumento significativo de 177,4% em relação à condição controle 30% (de $7,75 \pm 0,89$ para $21,53 \pm 3,14$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$, $n = 3 - 4$). Não houve alteração significativa na condição 37% (Fig. 9D). Em relação ao fluido de *Bunodosoma caissarum*, foi encontrado um aumento significativo, em ambas as condições experimentais quando comparado à condição controle. Em 25% o aumento foi de 49% (de $4,95 \pm 0,35$ para $7,26 \pm 0,63$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$, $n = 3$), enquanto em 37% o aumento foi de 38,8% (de $4,95 \pm 0,35$ para $6,78 \pm 0,56$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$, $n = 3$) (Fig. 9D).



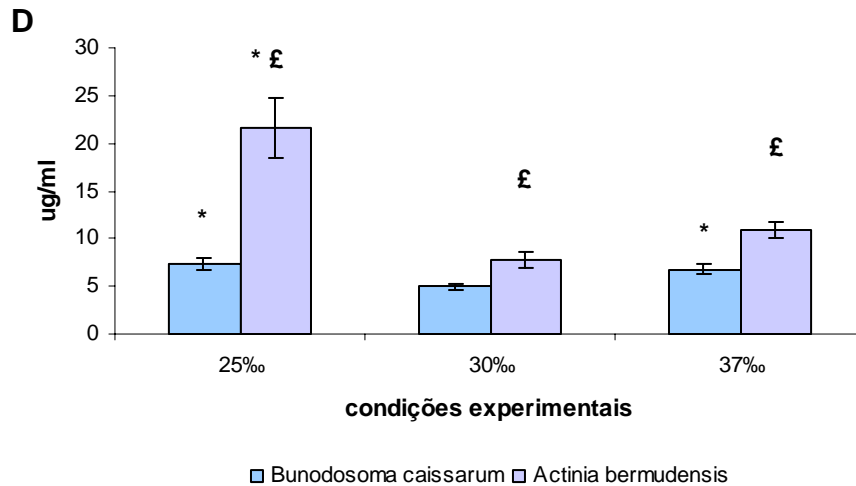


Figura 9: Valores médios dos íons Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C) e das NPS (D) no fluido do celêntero de ambas as espécies (* indica variação significativa em relação ao seu próprio controle 30‰; # indica diferença significativa em relação à água 30‰, e £ indica diferença significativa quando as duas espécies são comparadas entre si na mesma condição experimental, $p < 0,05$, $n = 3 - 7$). As barras em azul claro ilustram a concentração dos íons na água a que os animais foram expostos.

4.3 Teor hídrico tecidual

A análise do teor hídrico demonstrou uma variação significativa de ambas as espécies durante exposição ao choque hiposmótico. Em *Actinia bermudensis* a hidratação tecidual encontrada em animais expostos à condição controle era de $81 \pm 0,76\%$ ($n = 4$), a exposição à condição 25‰ ocasionou um aumento no teor hídrico, passando então para $89 \pm 2,8\%$ ($n = 7$), e em 37‰ houve redução da hidratação, o valor encontrado foi de $73,5 \pm 1,3\%$ ($n = 4$). Em *Bunodosoma caissarum* a hidratação que era de $78,6\% \pm 1,1\%$ ($n = 5$) na condição 30‰, passou a $85,6 \pm 0,77\%$ ($n = 7$) durante o choque hiposmótico. Não houve variação do teor hídrico tecidual durante a exposição ao choque hiperosmótico.

4.4 Dosagem de íons no músculo

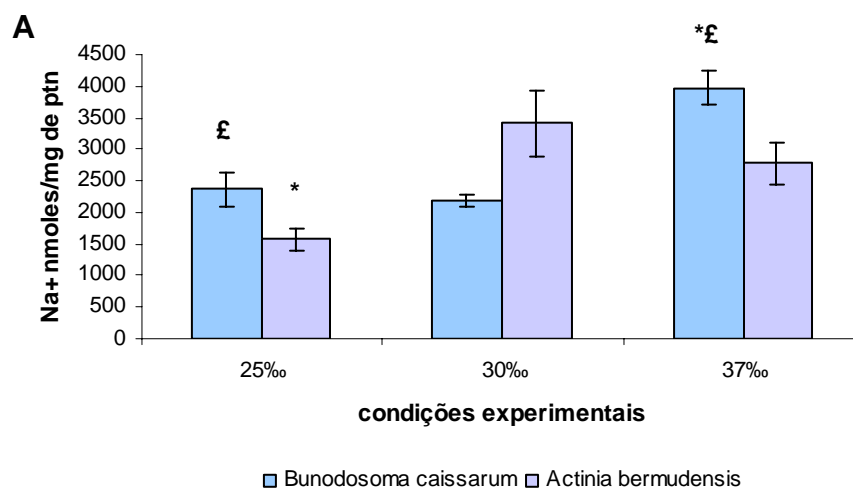
A análise do conteúdo iônico muscular de *Actinia bermudensis* demonstrou uma redução significativa de 54% na concentração do íon Na^+ em 25‰ (de $3418,2 \pm 526,9$ para $1569,7 \pm 163,7$ nmoles/mg ptn, $p < 0,05$, $n = 4$). Houve também uma diminuição da concentração do íon Cl^- de 31,2% (de $6576,5 \pm 353,85$ para $4526,5 \pm 300,35$ nmoles/mg ptn $p < 0,05$, $n = 4-3$). Na condição 37‰ foi observada também uma redução de 29,6% na

concentração do íon Cl^- (de $6576,5 \pm 353,8$ para $4631,7 \pm 115$ nmoles/mg ptn, $p < 0,05$, $n = 4 - 3$) (Figs. 10A, 10B e 10C).

Em *Bunodosoma caissarum*, durante o choque hipomótico de 25‰ houve variação significativa somente na concentração do íon Cl^- . Essa variação foi uma diminuição de 51,1% (de $5088 \pm 701,2$ para $2489,9 \pm 529,7$ nmoles/mg ptn, $p < 0,05$, $n = 4 - 3$). Já em 37‰ houve um aumento significativo na concentração dos íons Na^+ e Cl^- . O aumento do íon Na^+ foi de 81,4% (de $2191,8 \pm 97,5$ para $3976 \pm 274,4$ nmoles/mg ptn, $p < 0,05$, $n = 4 - 3$) e do íon Cl^- foi de 48,5% (de $5088 \pm 701,2$ para $7560 \pm 727,8$ nmoles/mg ptn, $p < 0,05$, $n = 4 - 3$) (Figs. 10A, 10B e 10C).

4.5 Teor de substâncias positivas a ninidrina no músculo (NPS)

A medida do teor de NPS no músculo de *Actinia bermudensis* demonstrou uma alteração significativa desses osmólitos somente durante a exposição ao choque hiposmótico. Houve uma redução de 43,7% (de $4,23 \pm 0,13$ para $2,38 \pm 0,13$ $\mu\text{g/ml/mg}$ de tecido fresco, $p < 0,05$, $n = 3-4$) (Fig. 10D). *Bunodosoma caissarum* apresentou variação significativa em ambas as condições testadas, em 25‰ houve uma diminuição de 12,8% (de $0,86 \pm 0,02$ para $0,75 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml/mg}$ de tecido fresco, $p < 0,05$, $n = 3-4$), em 37‰ também houve diminuição do teor de NPS (de $0,86 \pm 0,02$ para $0,67 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml/mg}$ de tecido fresco, $p < 0,05$, $n = 4$) (Fig.10D).



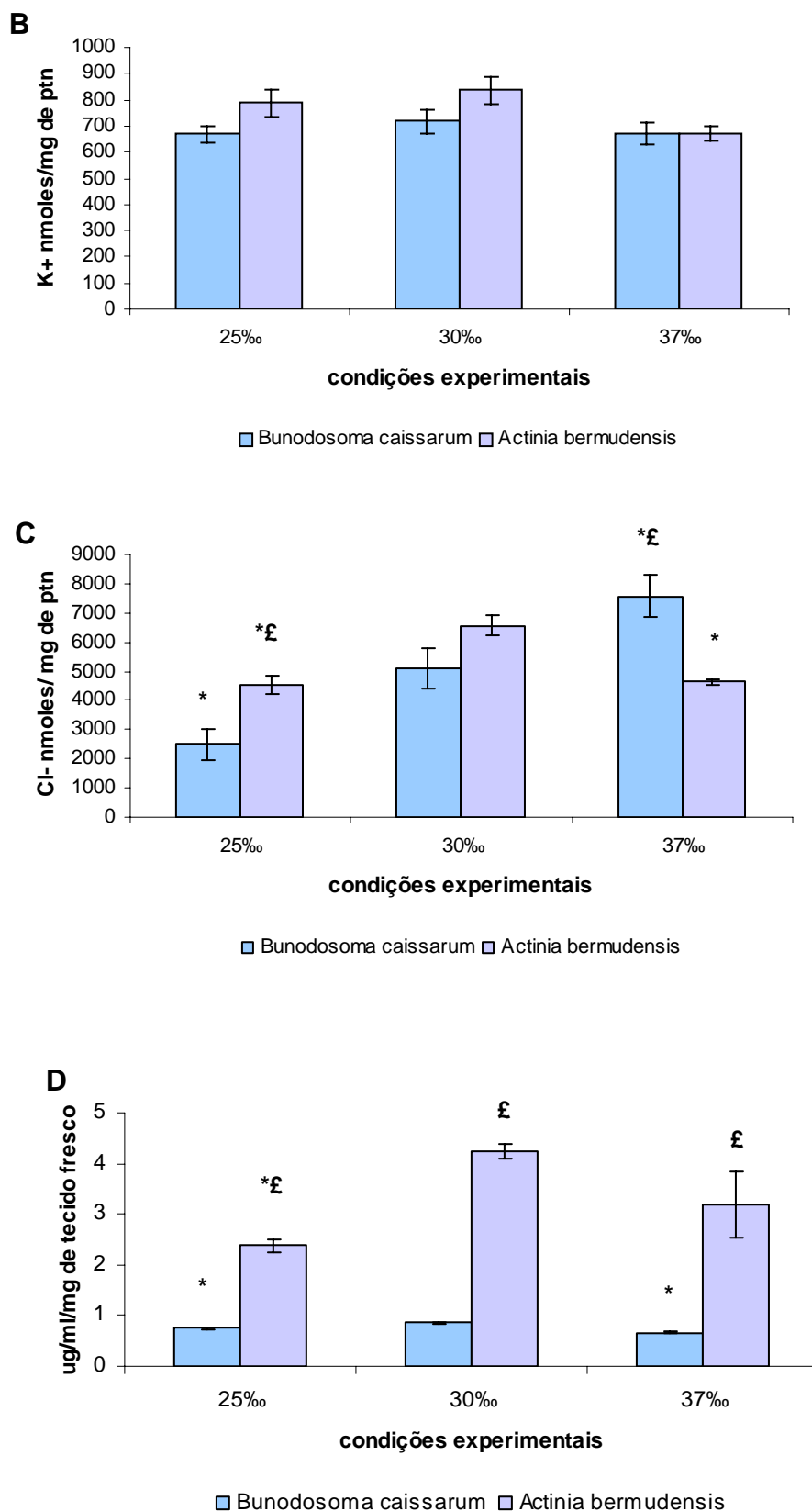
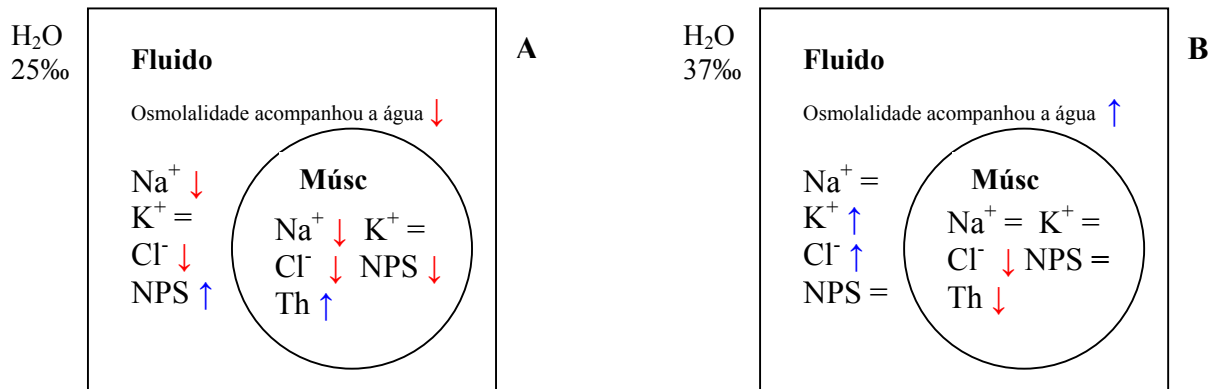


Figura 10: Valores médios da concentração dos íons Na^+ (A), K^+ (B) e Cl^- (C) e de NPS (D) no músculo (nmol/mg ptn) de *Bunodosoma caissarum* e *Actinia bermudensis* nas diferentes condições experimentais (*indica variação significativa em relação a seu próprio controle 30‰, $p < 0,05$, $n = 3 - 6$; e £ indica diferença significativa quando as duas espécies são comparadas entre si na mesma condição experimental, $p < 0,05$, $n = 3 - 7$).

As figuras a seguir representam uma síntese da variação dos osmólitos extracelulares e teciduais de cada espécie em cada condição experimental

Actinia bermudensis



Bunodosoma caissarum

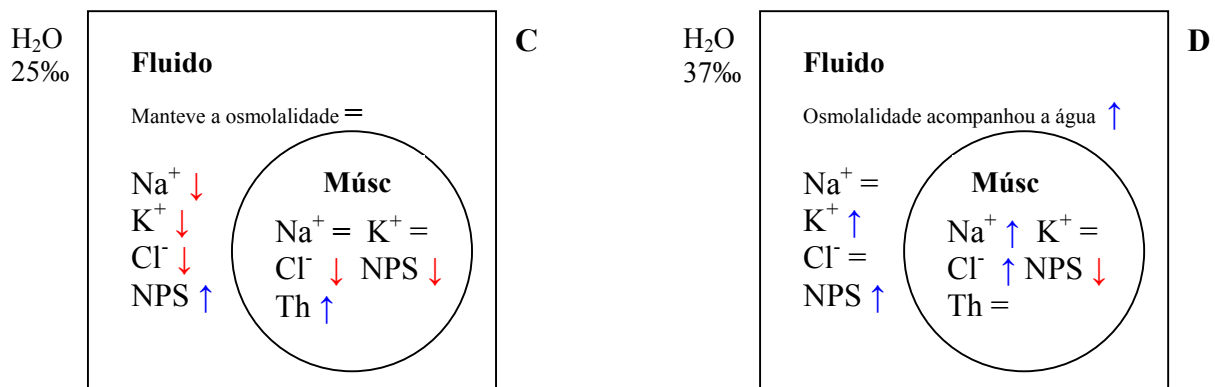


Figura 11: Resumo das alterações dos osmólitos (fluido e músculo) e do teor hídrico de *Actinia bermudensis* (A e B) e *Bunodosoma caissarum* (C e D) diante das condições experimentais, em relação aos controles mantidos em 30‰.

4.6 Análise do volume celular

A análise do volume das células dos animais quando expostas a um choque hiposmótico demonstraram um padrão distinto, entre si, de regulação de volume celular. Células de *Actinia bermudensis* apresentaram um inchaço significativo de $49,2 \pm 8,6\%$ já nos dois primeiros minutos de exposição. Nos minutos seguintes as células apresentaram uma regulação parcial do volume celular, sendo que ao final do tempo experimental (20 min) elas

ainda apresentavam um inchaço significativo de $24,5 \pm 5,8\%$, que no entanto, é diferente significativamente do inchaço encontrado no tempo 2 min. Já as células de *Bunodosoma caissarum* apresentaram regulação completa, mantendo seu volume celular inalterado durante todo o período experimental (Fig. 12).

Em se tratando do choque hiperosmótico, as células das duas espécies se comportaram da mesma maneira. As células de ambas as espécies apresentaram redução significativa do volume já nos primeiros 2 minutos de exposição. *Actinia bermudensis* teve diminuição máxima de volume celular $22,8 \pm 2,9\%$ em 20 minutos, já *Bunodosoma caissarum* apresentou diminuição de $18,3 \pm 4,5\%$ também em 20 minutos (Fig. 13).

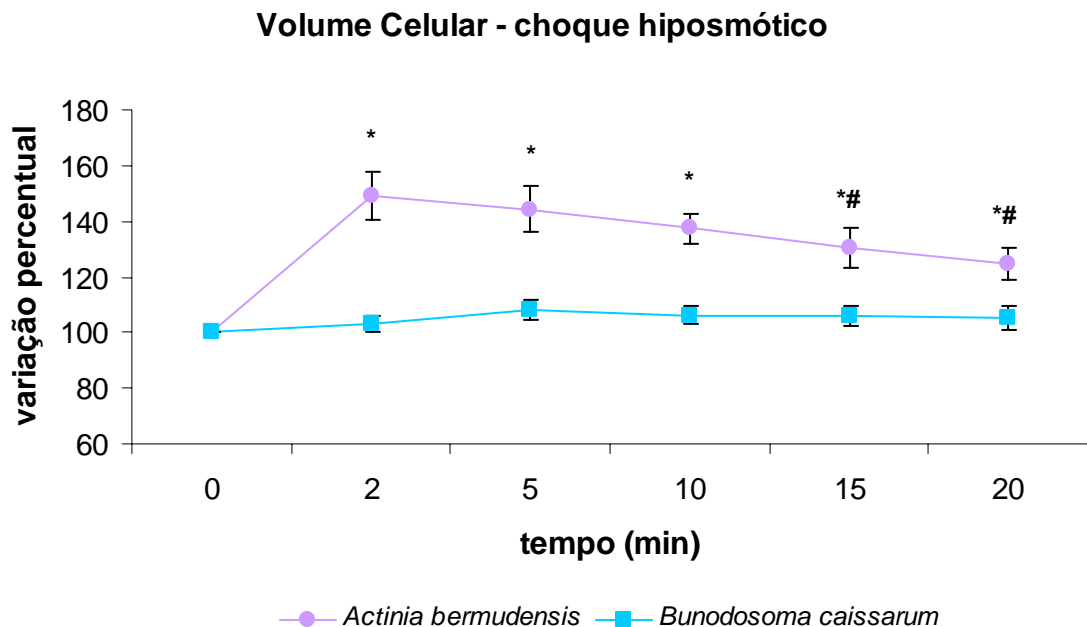


Figura 12: Decurso temporal da variação do volume celular de *Actinia bermudensis* (* indica diferença significativa em relação ao tempo zero, $p < 0,05$, $n = 11 - 12$ e # indica diferença significativa em relação ao tempo 2 min, $p < 0,05$) e *Bunodosoma caissarum* ($n = 10 - 12$) diante da exposição das células a um choque hiposmótico (785 mOsm).

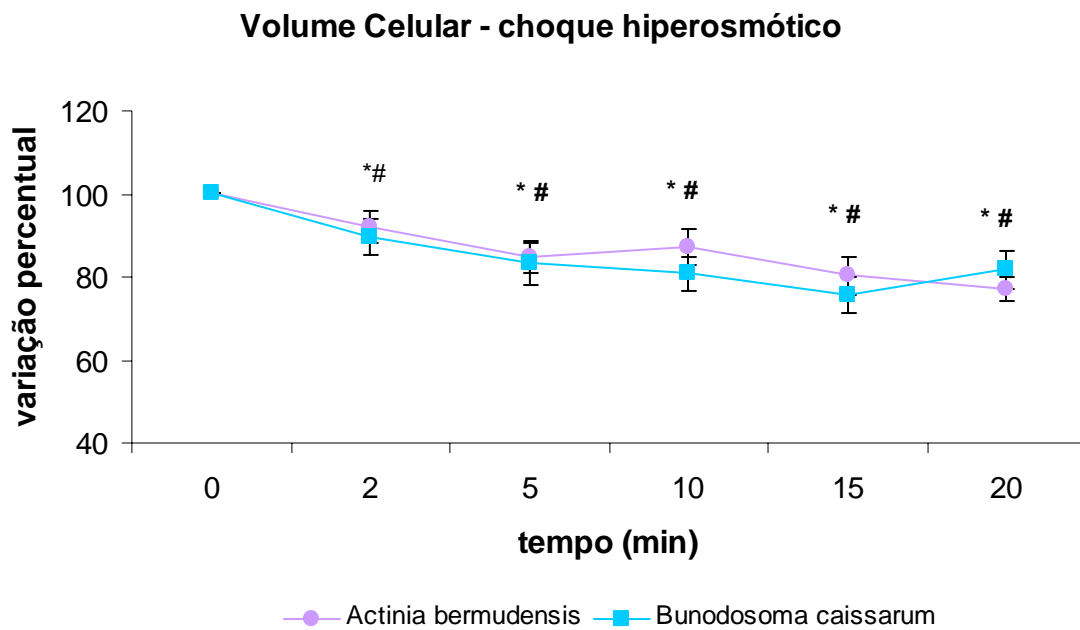


Figura 13: Decurso temporal da variação do volume celular de *Actinia bermudensis* (* indica diferença significativa em relação ao seu próprio tempo zero, $p < 0,05$, $n = 14$) e *Bunodosoma caissarum* (# indica diferença significativa em relação ao seu próprio tempo zero, $p < 0,05$, $n = 10$) diante de exposição das células a um choque hiperosmótico (1225 mOsm).

4.7 Análise da participação do Ca^{2+} na regulação do volume celular

Quando as células de *Actinia bermudensis* foram expostas à solução salina hiposmótica sem Ca^{2+} não foi observada diferença significativa em relação aos resultados encontrados quando células desse animal foram expostas à solução hiposmótica, ou seja, em ambas as condições as células incharam na mesma magnitude (Fig. 14). Enquanto as células de *Bunodosoma caissarum* exibiram completa RVD durante o choque hiposmótico, na ausência de Ca^{2+} apresentaram um inchaço de $47,8 \pm 11\%$ já nos dois primeiros minutos de exposição. As células continuaram aumentando de volume até o fim do tempo experimental (20 min) chegando a um aumento de $62,5 \pm 13,7\%$ (Fig. 15).

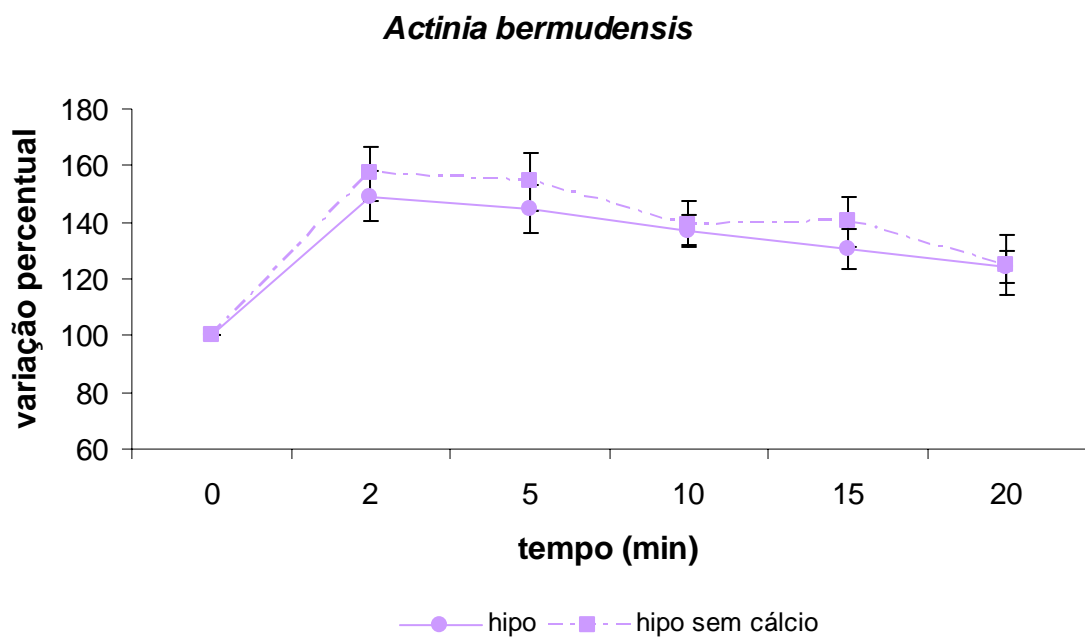


Figura 14: Decurso temporal da variação do volume celular de *Actinia bermudensis* durante um choque hiposmótico sem Ca^{2+} (n = 7 - 11).

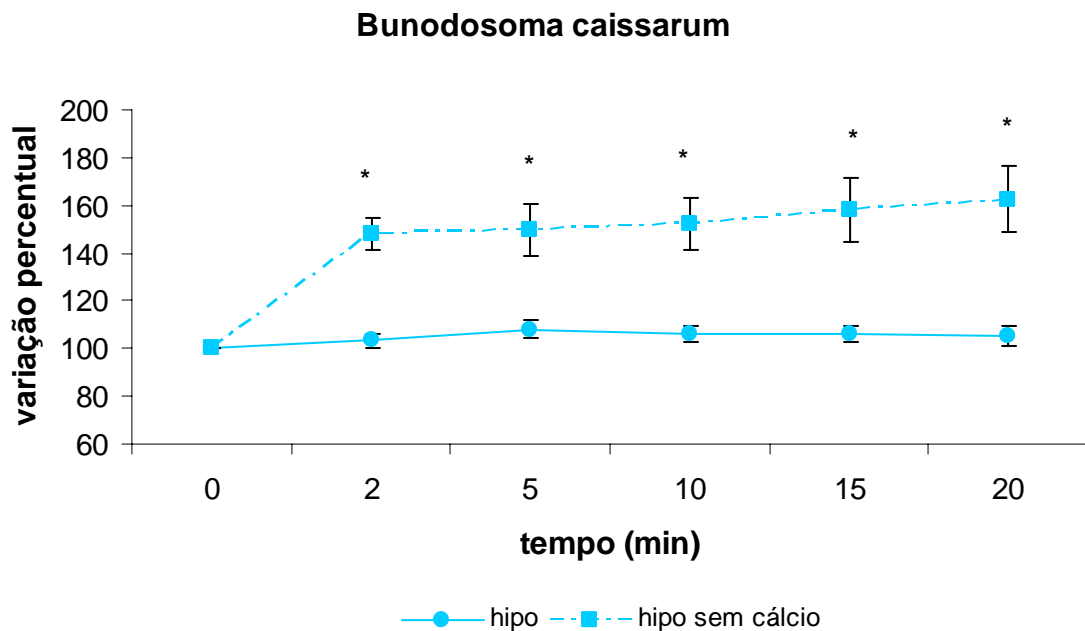


Figura 15: Decurso temporal da variação do volume celular de *Bunodosoma caissarum* durante um choque hiposmótico sem Ca^{2+} (* indica diferença significativa de cada ponto em relação ao seu ponto correspondente, $p < 0,05$, n = 7 - 12)

A exposição das células tanto de *Actinia bermudensis* como de *Bunodosoma caissarum* durante o choque hiperosmótico sem Ca^{2+} não apresentaram variação significativa. As células murcharam na mesma magnitude quando comparadas ao choque hiperosmótico com cálcio (Fig. 16 e 17)

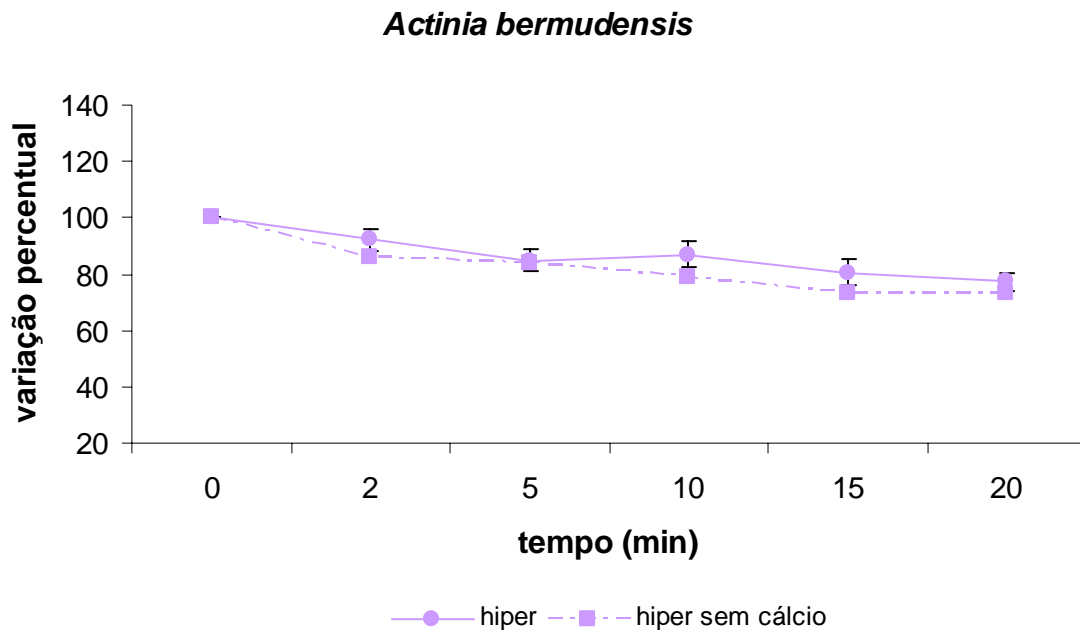


Figura 16: Decurso temporal da variação do volume celular de *Actinia bermudensis* durante um choque hiperosmótico sem Ca^{2+} (* indica diferença significativa de cada ponto em relação ao seu ponto correspondente, $p < 0,05$, $n = 13 - 16$).

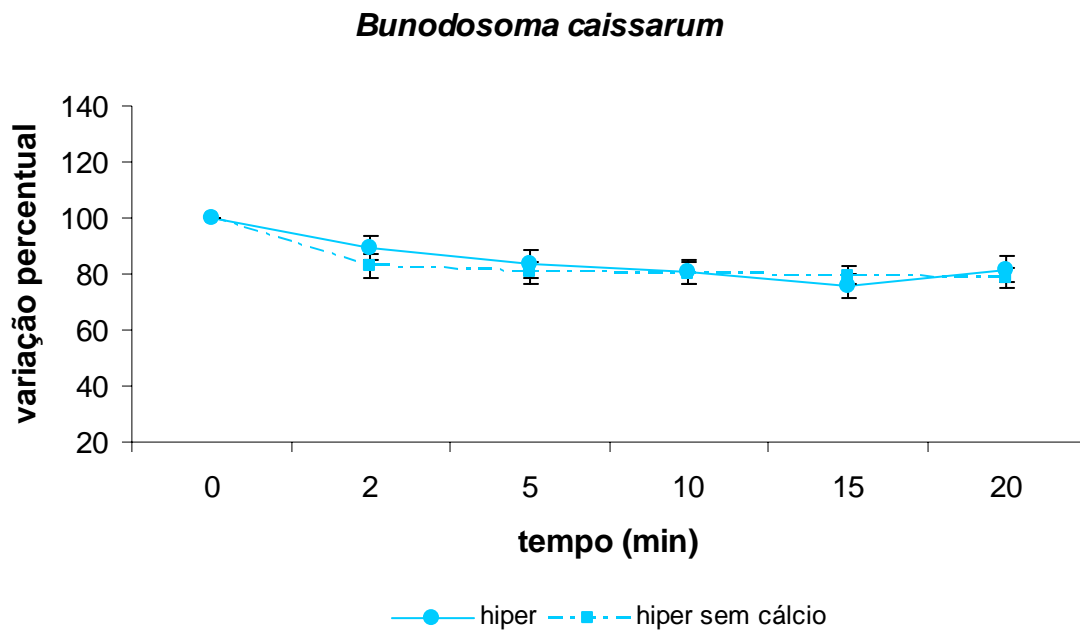


Figura 17: Decurso temporal da variação do volume celular de *Bunodosoma caissarum* durante um choque hiperosmótico sem Ca^{2+} ($n = 14$).

4.8 Análise das vias de regulação do volume celular

De todos os bloqueadores testados na condição hiposmótica, não foi encontrada nenhuma alteração significativa no volume celular de *Actinia bermudensis*, ou seja, as células na presença dos bloqueadores incharam na mesma proporção do inchaço encontrado no choque hiposmótico sem os bloqueadores (Fig. 18). Já as células de *Bunodosoma caissarum* responderam aos bloqueadores furosemida, ouabaína e DIDS. Durante o choque hiposmótico, as células desse animal não apresentaram variação de volume celular, mas quando expostas ao mesmo choque hiposmótico na presença de furosemida, houve um aumento de volume de $35,4 \pm 10,4\%$, na presença de ouabaína esse aumento foi de $22,8 \pm 6\%$. Já o aumento de volume encontrado na presença de DIDS foi de $33,4 \pm 8\%$ (Fig. 19).

Os resultados dos testes com o cloreto de mercúrio, bloqueador de canais de água (aquaporina), não puderam ser representados de forma gráfica porque não foi possível realizar a medida do volume celular, as células estouraram já nos dois primeiros minutos de exposição (Fig. 20).

As figuras a seguir representam um resumo dos resultados da exposição das células à solução hiposmótica com adição de bloqueadores. Foram utilizados para os gráficos, os valores que representam o aumento máximo de volume alcançado pelas células.

***Actinia bermudensis* - aumento máximo de volume**

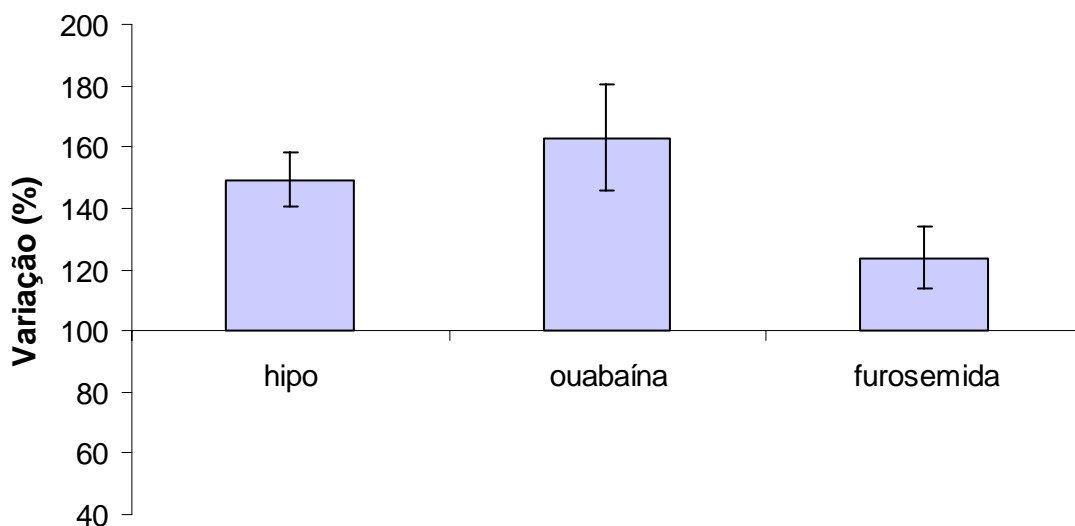


Figura 18: Aumento máximo de volume alcançado pelas células de *Actinia bermudensis* quando expostas ao choque hiposmótico com adição de diferentes bloqueadores das vias de transporte (n = 6 - 12).

***Bunodosoma caissarum* - aumento máximo de volume**

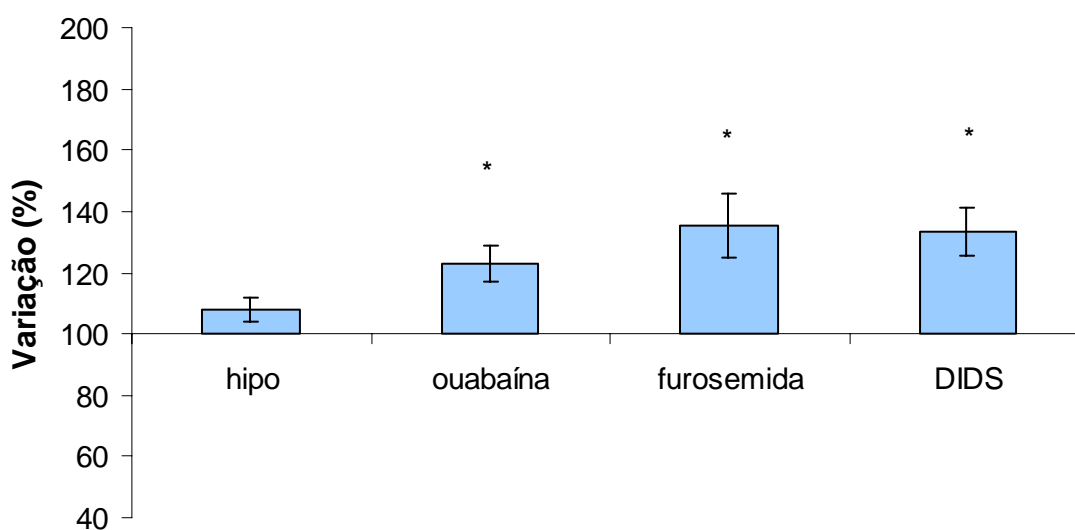


Figura 19: Aumento máximo de volume alcançado pelas células de *Bunodosoma caissarum* quando expostas ao choque hiposmótico com adição de diferentes bloqueadores das vias de transporte (* indica diferença significativa em relação ao choque hipo sem a presença dos bloqueadores, $p < 0,05$, n = 8 - 12).

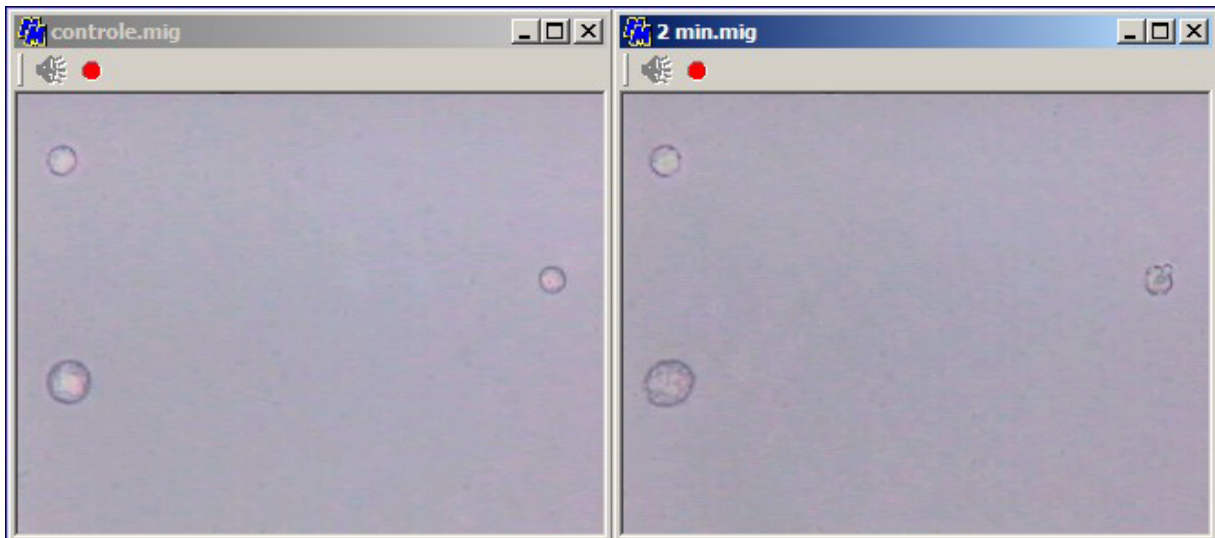


Figura 20: Células de *Bunodosoma caissarum* expostas ao choque hiposmótico (controle) e ao choque hiposmótico na presença de cloreto de mercúrio (n = 12).

Os testes dos bloqueadores na condição hiperosmótica revelaram uma alteração significativa do volume celular somente quando a furosemida foi testada em *Actinia bermudensis*. As células murcharam menos na presença do bloqueador. Enquanto na condição hiperosmótica elas apresentaram uma redução de volume que passou de 100% a $77,2\% \pm 2,9\%$, na presença do bloqueador, essa redução foi de 100% para $94,4 \pm 6,1\%$ (Fig. 21). *Bunodosoma caissarum* não apresentou alteração significativa na presença de nenhum bloqueador testado (Fig. 22).

As figuras a seguir, representam um resumo dos resultados da exposição das células das à solução hiperosmótica com adição de bloqueadores. Foram utilizadas para os gráficos, as diminuições máximas de volume atingido pelas células.

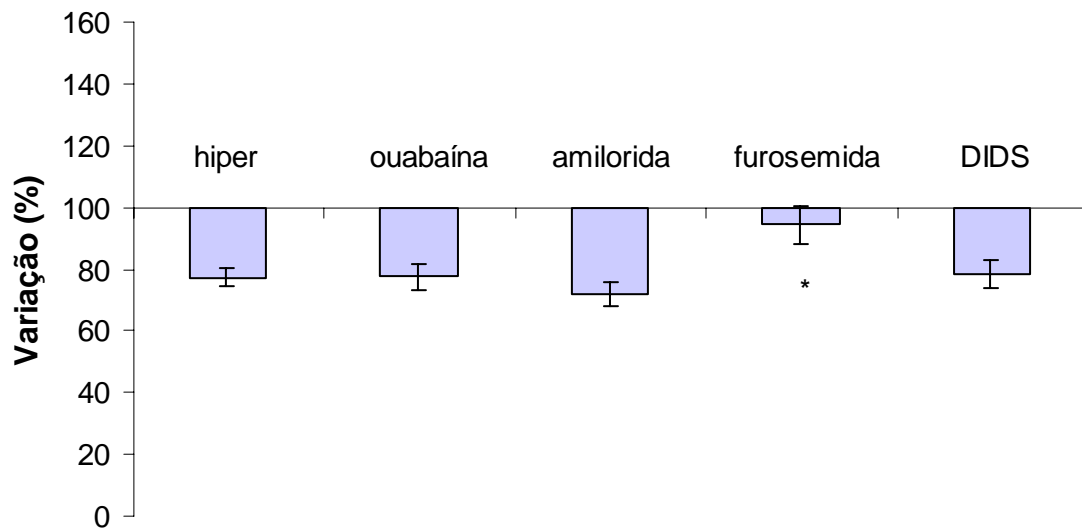
***Actinia bermudensis* - diminuição máxima de volume**

Figura 21: Diminuição máxima de volume atingida pelas células de *Actinia bermudensis* quando expostas ao choque hiperosmótico com adição de diferentes bloqueadores das vias de transporte (* indica diferença significativa em relação ao choque hiper sem adição de bloqueadores, $p < 0,05$, $n = 7 - 14$).

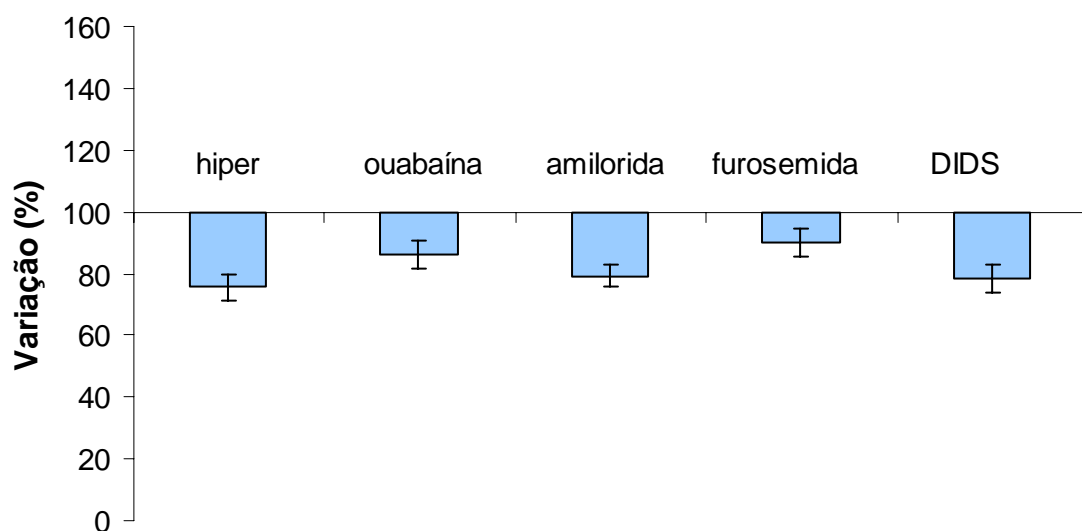
***Bunodosoma caissarum* - diminuição máxima de volume**

Figura 22: Diminuição máxima de volume atingida pelas células de *Bunodosoma caissarum* quando expostas ao choque hiperosmótico com adição de diferentes bloqueadores das vias de transporte ($n = 10 - 15$).

5. DISCUSSÃO

A maioria dos invertebrados marinhos está em equilíbrio osmótico com a água do mar. Por serem funcionalmente osmoconformadores, esses animais enfrentam as variações de salinidade variando também a concentração osmótica de seus fluidos corpóreos. Alguns, no entanto, conseguem manter a concentração osmótica do fluido diferente da do meio externo até uma determinada faixa de salinidade. A exposição de *Bunodosoma caissarum* e *Actinia bermudensis* a alterações de salinidade, naturais de seu ambiente, demonstrou mecanismos distintos de adaptação a essas variações da concentração osmótica do meio externo.

Actinia bermudensis demonstrou ser um típico osmoconformador alterando a concentração osmótica de seu fluido do celêntero na mesma proporção da alteração da concentração osmótica da água de ambas as condições testadas, ou seja, tanto em um choque hiperosmótico como em um choque hiposmótico. Esse mesmo padrão de resposta também foi encontrado em outras anêmonas do mar como *Condylactis gigantea* que quando exposta a salinidades que variavam de 20‰ a 46‰, o fluido do celêntero alcançou o equilíbrio com a água após 6 horas de exposição (BURSEY & HARMER, 1978) e *Bunodosoma cavernata* que quando exposta a salinidades de 11‰ a 49‰ rapidamente equilibraram o fluido do celêntero com o meio externo (BENSON – RODENBOUGH & ELLINGTON, 1981).

Bunodosoma caissarum, no entanto, demonstrou certo grau de regulação diante da diluição do meio externo. Quando expostas a salinidade mais baixa, esses animais não alteraram a concentração osmótica de seu fluido. Esse mesmo padrão de resposta não foi observado em um choque hiperosmótico, a concentração osmótica do fluido variou na mesma proporção da variação da concentração do meio externo. Na literatura não há relatos sobre a capacidade de cnidários regularem seu fluido do celêntero, os estudos realizados com diferentes espécies de anêmonas sempre mostraram a concentração osmo-iônica do fluido acompanhando a variação do meio externo (BURSEY & HARMER, 1978; BENSON – RODENBOUGH & ELLINGTON, 1981).

Schimidt- Nielsen (2002) relata que o fato de invertebrados em geral serem osmoconformadores e, portanto, possuírem concentração osmótica igual ou próxima da água que os rodeia, não significa que seus fluidos corpóreos apresentem a mesma composição de solutos que a água do mar. Segundo as análises iônicas, *Bunodosoma caissarum* possui a concentração dos íons Na^+ e Cl^- levemente aumentada em relação à água do mar (30‰,

controle). O mesmo padrão de equilíbrio osmo-iônico não foi observado em *Actinia bermudensis*.

O teor hídrico tecidual, utilizado por muitos autores como indicação da variação de volume celular, revela que ambas as espécies estudadas apresentam cerca de 80% de água tecidual na salinidade controle, este valor é semelhante ao descrito por Howard e colaboradores (1986) em *B. cavernata*. Após a exposição, por 6h, ao meio diluído tanto *Actinia bermudensis* como *Bunodosoma caissarum* apresentaram aumento de 10% no teor hídrico (menor que a intensidade do choque), esta variação indica que está ocorrendo regulação de volume celular. A completa recuperação do teor hídrico inicial parece necessitar de maior tempo de exposição, como já descrito por Benson-Rodenbough e Ellington (1981). Tipicamente, invertebrados marinhos osmoconformadores mostram mudanças menores do que as esperadas na hidratação tecidual quando submetidas a um estresse osmótico. Além disso, uma aclimação continuada à nova salinidade pode resultar em um aumento ou diminuição compensatória na hidratação tecidual.

Durante o choque hiposmótico da salinidade **30‰** para salinidade **25‰**, a diluição da água é de cerca de 20%, assim a análise dos íons no fluido de *Actinia bermudensis* demonstrou uma diminuição de 22% e 17% para os íons Na^+ e Cl^- respectivamente. Considerando que a osmolalidade reduziu 20%, isso significa que a diminuição encontrada na concentração iônica se deve a uma simples diluição do fluido do celêntero. A concentração de NPS no fluido aumentou bastante (177,4%), o que não foi acompanhado pela osmolalidade. Este grande aumento na concentração de NPS pode ser justificado, em parte, por um efluxo desses osmólitos na tentativa da célula regular seu volume, já que também foi observado um aumento no teor hídrico do tecido e uma diminuição dos íons Na^+ , Cl^- e NPS intracelulares, maior do que uma simples diluição celular. No entanto, o aumento de NPS no fluido é muito maior do que a diminuição na célula. Esta observação pode estar relacionada com um problema metodológico referente ao tempo de armazenamento da amostra de fluido (NPS no músculo era analisado em tecido fresco). Durante o armazenamento o fluido pode ter sofrido ação de proteases.

Nesse caso, as células de *Actinia bermudensis* parecem estar usando, portanto, os dois tipos de osmólitos (orgânicos e inorgânicos) na tentativa de regular o volume celular. Esse mesmo padrão de regulação também foi encontrado em miocárdios do caranguejo *Limulus polyphemus* (WARREN & PIERCE, 1982). A regulação de volume que ocorreu em resposta a um estresse osmótico dependeu da liberação de Na^+ e Cl^- intracelular, também não houve mudança na concentração de K^+ citoplasmático. Esses íons estariam sendo

utilizados inicialmente na regulação de volume, seguido por um efluxo de glicina e betaina 12 horas mais tarde (WARREN & PIERCE, 1982).

Durante o estresse hiperosmótico a intensidade do choque na água em que os animais foram expostos também fica em torno de 20% em relação à salinidade controle, e o aumento encontrado na concentração iônica do fluido de *Actinia bermudensis* foi de 20% e 44% para K^+ e Cl^- , respectivamente. O aumento na concentração do íon K^+ e de Cl^- indica a perda de água do fluido para o meio externo em virtude do aumento da salinidade. Entretanto, não foi possível evidenciar um aumento de sódio acompanhando o aumento de Cl^- . Apesar do aumento na concentração osmótica do fluido do celêntero, não foi identificado acúmulo de teor iônico tecidual.

Com *Bunodosoma caissarum* a concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- no fluido diminuíram 28%, 25% e 21% respectivamente quando em meio hiposmótico, ou seja, quase na mesma proporção da diminuição da salinidade durante o choque hiposmótico (~20%), o que indicaria uma simples diluição do fluido. No entanto, a concentração osmótica do fluido foi mantida, indicando que essa manutenção ocorreu devido ao aumento na concentração de NPS (osmólitos orgânicos). É sabido que anêmonas do mar como *Metridium senile* e *Bunodosoma cavernata*, quando sob estresse osmótico utilizam osmólitos orgânicos para manutenção de seu volume celular (BENSON-RODENBOUGH & ELLINGTON, 1981; HOWARD et al, 1986; DEATON & HOFFMANN, 1988). Logo, parece razoável considerar que tal soluto osmoticamente ativo seja também utilizado como osmólito no fluido do celêntero.

Apesar da manutenção da osmolalidade do fluido de *Bunodosoma caissarum*, houve um aumento no teor de hidratação tecidual e diminuição de Cl^- intracelular, sendo evidenciado também uma diminuição no teor de NPS, o que sugere um efluxo desses osmólitos da célula para regulação de seu volume, como discutido anteriormente. Esses resultados indicam mecanismos regulatórios, as células liberando osmólitos para manutenção de seu volume e esse efluxo de solutos (principalmente orgânico) podendo refletir na manutenção da osmolalidade do meio extracelular como resultado da resposta regulatória. Essa manutenção da osmolalidade do fluido do celêntero, caracterizando uma osmorregulação, seria portanto uma resposta secundária, como reflexo da regulação de volume celular ocorrida anteriormente em função da diluição do meio extracelular no início da exposição dos animais ao meio diluído.

Em 37‰, como já descrito, *Bunodosoma caissarum* se comportou como um osmoconformador. No entanto, quando o fluido foi analisado não houve aumento

significativo na concentração do íon Cl^- , nem do íon Na^+ , já o K^+ aumentou sua concentração (24%) na mesma proporção da condição hiperosmótica. Houve também um aumento de 39% na concentração de NPS. Esses resultados indicam que o aumento na concentração do íon K^+ e NPS apenas revela a perda de água do fluido para o meio externo, enquanto o fato de Na^+ e Cl^- não terem alterado pode significar uma tomada desses íons pela célula na tentativa de regular o seu volume. O aumento encontrado de 81,5% e 48,5% na concentração de Na^+ e Cl^- intracelular de *Bunodosoma caissarum* durante o choque hiperosmótico reforçam a idéia da tomada desses íons do fluido para a célula, regulando assim o seu volume, o que pôde ser evidenciado pela não variação do teor hídrico após 6 horas em condição hiperosmótica.

Células de vertebrados apresentam íons inorgânicos contribuindo com cerca de 70% da concentração osmótica celular (~300 mOsm). Por outro lado, invertebrados marinhos, cujo meio extracelular está equilibrado osmo-ionicamente com o meio externo e é portanto muito mais concentrado (~1000 mOsm) que o meio extracelular de vertebrados, apresenta concentração de osmólitos inorgânicos levemente superior ao observado nos vertebrados. Portanto, a relação osmótica intra e extracelular de invertebrados marinhos é alcançada pelo conteúdo de aminoácidos intracelulares, o que justifica a utilização desses solutos como osmólitos durante estresse salino (PIERCE, 1982).

As células dos animais osmoconformadores podem enfrentar altas osmolalidades extracelulares aumentando suas osmolalidades intracelulares e assim mantendo o volume celular. Isto é alcançado pelo aumento da concentração de osmólitos orgânicos intracelulares, que são substâncias que, presentes em altas concentrações, agem aumentando a osmolalidade intracelular (RANDALL et al., 2000). Está bem demonstrado que a concentração intracelular de aminoácidos livres é um fator importante no controle do volume celular em meios com salinidade variável. À medida que a salinidade da água aumenta ou diminui, os aminoácidos das células aumentam e diminuem de modo que as células permanecem isotônicas em relação ao seus arredores (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002). A diminuição no teor de NPS encontrada no músculo de *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* quando em meio hiposmótico reforça essa idéia. Entretanto, segundo os resultados, esses osmólitos parecem não participar da regulação do volume quando o animal foi exposto ao meio hiperosmótico.

Solutos inorgânicos por sua vez também são osmoticamente ativos, mesmo em invertebrados osmoconformadores (SMITH & PIERCE, 1987; McCARTY & O'NEIL, 1992; DEATON & PIERCE, 1994; SOUZA & SCMES, 2000), e também como sugerem os resultados de *Bunodosoma caissarum* sob anisomotividade. Este animal tende a acumular

(em função do gradiente) Na^+ e Cl^- quando sob hiperosmoticidade, o que é frequentemente observado em outras células animais quando sob esse mesmo choque (NATOCHIN, et al., 1978; MACKNIGHT, et al., 1994; DEATON, 1997).

Esses resultados mostram que, enquanto *Actinia bermudensis* osmoconforma em ambas as salinidades, *Bunodosoma caissarum* osmorregula em **25%** e osmoconforma em **37%**. É interessante notar que pela primeira vez observa-se uma espécie do gênero *Bunodosoma* apresentando capacidade de osmorregulação, estudos anteriores relatavam sobre *Bunodosoma cavernata* osmoconformando em meio hiposmótico (BENSON – RODENBOUGH & ELLINGTON, 1981).

A análise dos osmólitos extracelulares e teciduais indica que *Actinia bermudensis* é um típico osmoconformador e que utiliza osmólitos orgânicos associados aos inorgânicos para regulação de volume celular quando em choque hiposmótico. Enquanto *Bunodosoma caissarum* osmorregula em **25%**, pelo aumento de osmólitos orgânicos, e mantém seu volume celular por liberação de osmólitos inorgânicos e orgânicos, e em **37%** parece apresentar mecanismos para acúmulo iônico celular. É interessante ressaltar que, embora as duas espécies estejam fazendo uso de osmólitos orgânicos na regulação do volume celular, *Actinia bermudensis* mobiliza mais esse tipo de osmólito por dispor de maior quantidade desse soluto quando comparado com *Bunodosoma caissarum*.

Relatos do conteúdo de aminoácidos em invertebrados, como moluscos e crustáceos, mostram maiores concentrações em células de espécies marinhas e menores em espécies de água doce (CLAYBROOK, 1983; MATSUSHIMA et al., 1989; JORDAN & DEATON, 1999; McNAMARA et al., 2004). Assim, poderia-se especular que as diferenças nos conteúdos de aminoácidos totais (a partir da análise de NPS) observadas entre *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* fossem decorrentes do fato de *Actinia bermudensis* se portar como uma espécie mais marinha e *Bunodosoma caissarum* uma espécie mais estuarina, o que por sua vez estaria relacionado às diferenças nos padrões de ajustes osmo-iônicos observados para as duas espécies.

Numa segunda etapa da investigação da capacidade de regulação osmo-iônica desses animais, o volume celular foi avaliado diretamente pela aplicação de choque hipo e hiperosmótico em células isoladas. Novamente, houve um padrão distinto de respostas entre as duas espécies quando as células de ambas foram submetidas ao choque hiposmótico.

Células de *Actinia bermudensis* apresentaram um inchaço de quase 50% imediatamente após a aplicação do choque hiposmótico. Esse inchaço indica que essas células não ativam mecanismos para minimizar o aumento de volume durante um estresse

hiposmótico. Passados 20 min, as células apresentam mecanismos de regulação do volume celular, já que o inchaço inicial foi reduzido, sem no entanto, as células conseguirem retornar a seu volume inicial. Contrariamente a esses dados, nematocistos isolados da anêmona *Aiptasia diaphana* quando submetidos a um choque hiposmótico de 35% de magnitude, apresentaram um inchaço na proporção esperada pelo choque, o que foi seguido de uma rápida RVD (5 min) (LA SPADA, et al., 1999).

Assim como os nematocistos citados acima, as células de *Bunodosoma caissarum* demonstraram regulação completa de volume. No entanto, estas células nem chegaram a apresentar inchaço diante do choque hiposmótico. O volume foi mantido durante todo o tempo de exposição, relatos de manutenção de volume celular como esta, ainda não havia sido descrito para células de cnidários. Essa situação onde não há variação de volume durante condição anisomótica é observada durante a aplicação gradual da condição o que permite a ativação rápida dos mecanismos regulatórios (DRIESSCHE et al., 1997; TUZ et al., 2001).

A liberação eletroneutra de KCl parece ser uma das maiores características durante a RVD em muitos sistemas celulares (LANG et.al., 1998; WEHNER et.al. 2003). Uma das maneiras de liberar esses osmólitos é pelo cotransportador K^+-Cl^- . A participação desse transportador pôde ser evidenciada durante a RVD das células de *Bunodosoma caissarum*. A aplicação de um choque hiposmótico na presença de furosemida (3mM, bloqueador dessa via de transporte), inibiu a RVD dessas células, que passaram a apresentar um aumento de 35% de seu volume. Demonstrando dessa forma que a liberação dos íons K^+ e Cl^- por essa via é de fundamental importância para a manutenção do volume dessas células durante um choque hiposmótico, sendo essa ativada rapidamente, já que as células nem variaram seu volume.

Esses dados, quando comparados com os resultados encontrados, e já discutidos, do ensaio *in vivo* de *Bunodosoma caissarum* foram corroborados pela redução de Cl^- , sem no entanto ser acompanhada pelo íon K^+ no músculo do animal exposto à condição hiposmótica. Parece mais óbvio realmente que as células estejam utilizando a liberação dos dois íons - até por questão de um balanço eletrolítico - na regulação do volume, como sugerem os resultados *in vitro*. A não evidência da diminuição do teor de K^+ tecidual durante o ensaio *in vivo* pode estar relacionada ao fato deste ser o íon de maior concentração em tecidos, o que torna mais difícil identificar variações, além de problemas metodológicos. Como já mencionado anteriormente, a ação de proteases durante o armazenamento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

pode ter comprometido a real concentração de proteínas totais e portanto, influenciado a relação íon/proteína (minimizando as variações), principalmente no K^+ .

Quando nematocistos isolados da anêmona *Aiptasia diaphana* foram submetidos a choque hiposmótico (35%) foi observada RVD a partir do efluxo de KCl , o mecanismo regulatório consistia principalmente no aumento da condutância de K^+ , e conseqüentemente de Cl^- , e em segunda instância pela utilização dos trocadores H^+/K^+ e Cl^-/HCO_3^- (LA SPADA, et al., 1999). Cabe ressaltar, que este é o único relato de regulação de volume em células de cnidários *in vitro*, e com mobilização de osmólitos inorgânicos durante choque hiposmótico.

Também, conforme já discutido, durante a exposição de *Bunodosoma caissarum* ao choque hiposmótico, além da liberação de Cl^- , pôde ser evidenciada a liberação de osmólitos orgânicos do tecido. Na análise *in vitro* as células dessa espécie foram expostas ao choque hiposmótico na presença de DIDS, uma vez que a literatura descreve que transporte de osmólitos orgânicos pode usar vias com características semelhantes à de ânions inorgânicos, sendo sensíveis a bloqueadores de fluxos de cloreto (KIRK et al., 1992; PASANTES-MORALES et al., 1999). Os resultados obtidos na presença desse bloqueador sugerem que a liberação dos osmólitos orgânicos evidenciada no ensaio *in vivo* esteja sendo realizada, pelo menos em parte, por essa via de transporte sensível ao DIDS.

Através da exposição das células de *Bunodosoma caissarum* a um choque hiposmótico na presença de cloreto de mercúrio foi possível evidenciar a participação de aquaporinas na regulação do volume celular. As células não conseguiram manter o volume celular e incharam de tal maneira que houve o rompimento da membrana plasmática. Esses dados entretanto, indicam que a água entra na célula via aquaporinas insensíveis ao cloreto de mercúrio, o que justifica o inchaço. Sugerindo que pelo menos uma das aquaporinas sensíveis ao bloqueador (como AQP1, AQP2, AQP3, AQP5) pode ser a via de efluxo de água durante a regulação do volume celular, já que impedir a saída de água da célula bloqueando essas vias levou a mesma a estourar.

Não foi possível, através dos bloqueadores utilizados junto ao choque hiposmótico, evidenciar as vias de transporte de solutos em células de *Actinia bermudensis*. Desse modo, essas células estariam utilizando outras vias, que não Na^+-K^+ ATPase e cotransporte K^+-Cl^- . A análise dos resultados de mobilização de osmólitos sugere que a liberação de $NaCl$ das células seja ou por um cotransportador ou por uma via condutiva, não testados.

Em relação ao choque hiperosmótico, o comportamento das células de *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* foi semelhante. Houve uma redução de volume menor do que o esperado pela aplicação do choque. Ou seja, as células de ambas as espécies apresentaram mecanismos para minimizar variação de volume, no entanto, não foram capazes de conter essa perda de volume e não apresentaram RVI. Novamente, contrariando esses dados, nematocistos isolados de *Aiptasia diaphana* apresentaram capacidade de regulação do volume celular diante de condições hiperosmóticas (RVI). Esse processo envolveu tomada de íons por canais de Na^+ e pelo cotransporte $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$ (MARINO & LA SPADA, 2004).

Quando células de *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* foram submetidas a hiperosmotividade na presença de furosemida ($100\mu\text{M}$), bloqueador do cotransporte $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$, não foi possível evidenciar a participação dessa via na minimização do volume de nenhuma das duas espécies. Pelo contrário, observou-se que durante o bloqueio do transportador havia menor variação de volume celular (significativa em *Actinia bermudensis* e uma tendência em *Bunodosoma caissarum*). De alguma forma, o bloqueio do transportador parece ativar uma outra via de maior capacidade de tomada de osmólitos, esse comportamento nunca havia sido descrito na literatura.

Apesar de os resultados do ensaio *in vivo* demonstrar que *Bunodosoma caissarum* estaria evitando uma maior perda de volume celular diante do choque hiperosmótico pelo acúmulo de Na^+ e Cl^- , não foi evidenciada, durante o ensaio *in vitro* a participação dos trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ . Sugere-se então que a tomada desses íons esteja sendo feita através de vias condutivas, como já observado em nematocistos isolados de *Aiptasia diaphana* (MARINO & LA SPADA, 2004). A participação dos trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ também não foi evidenciada em células de *Actinia bermudensis* durante estresse hiperosmótico.

A inibição da Na^+-K^+ ATPase com ouabaína eventualmente leva a um aumento ou diminuição de volume celular mesmo em meio isosmótico, demonstrando assim a importância desse transportador na manutenção do volume celular. Essa ATPase durante a regulação de volume celular em condições anisosmóticas pode também desempenhar papéis distintos. Em um choque hiposmótico, por exemplo, a inibição desse trocador (por ouabaína) pode fazer com que em cardiomiócitos de embrião de galinha, o Na^+ que normalmente sairia por meio dessa proteína utilize uma outra via para a saída. Essa via seria o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Isso aumentaria os níveis de Ca^{2+} dentro da célula, que funciona como um sinalizador do processo regulatório, otimizando assim a RVD (SMITH et al., 1992).

O bloqueio da Na⁺-K⁺ ATPase durante o choque hiposmótico em células de *Bunodosoma caissarum* não parece interferir na atividade do trocador Na⁺/Ca²⁺, uma vez que não foi observada otimização de RVD. Pelo contrário, as células que naturalmente apresentavam completa RVD passaram a ter um aumento de volume em decorrência de maior acúmulo de Na⁺ (acompanhado de água) pela célula, o qual não foi recuperado.

Por outro lado, durante um choque hiperosmótico pode haver menor afinidade da ATPase por Na⁺ acarretando no acúmulo intracelular do íon, o que contribuiria para regulação do volume celular, revertendo assim, por exemplo, o murchamento de cardiomiócitos de mamífero (WHALLEY et al, 1993) . No entanto, em outras situações esse trocador pode não estar envolvido, ou não ser sensível à ouabaína (MORETTI et al., 1991). Assim como também sugerem os resultados de alteração de volume celular de ambas as espécies de anêmonas estudadas diante do choque hiperosmótico e de *Actinia bermudensis* em choque hiposmótico na presença de ouabaína; onde não houve alteração na capacidade de regulação do volume celular.

Como já descrito anteriormente participação de Ca²⁺ na sinalização da regulação de volume celular durante hiposmotividade tem sido bastante evidenciada em diversos tipos celulares. O envolvimento do Ca²⁺ na sinalização da RVD pode ser pela ativação de uma condutância ao K⁺ acompanhada por Cl⁻ e/ou pelo maior efluxo de osmólitos orgânicos (LANG, et al., 1998; WEHNER et al., 2003). A participação do Ca²⁺ pode se dar por um aumento de Ca²⁺ intracelular vindo do meio extracelular, liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares, ou ainda uma combinação dos dois mecanismos (SOUZA et al., 2000). Relatos do envolvimento do Ca²⁺ na regulação do volume celular durante um choque hiperosmótico são raros, Erickson e colaboradores (2001) descreveram que condrócitos sob hiperosmotividade apresentam aumentos transitórios de Ca²⁺ intracelular (através de influxo) para a sinalização da RVI. A via intracelular ativada, embora não elucidada, parece envolver sistema inositol fosfato.

A participação de Ca²⁺ na regulação do volume celular só pôde ser evidenciada em células de *Bunodosoma caissarum* expostas ao choque hiposmótico. A retirada de Ca²⁺ extracelular durante o choque hiposmótico inibiu a capacidade de regulação que essas células possuíam, ficando assim, clara a dependência desse íon na ativação da RVD desse tipo celular. No entanto, células de *Actinia bermudensis* que apresentavam uma regulação parcial de volume durante o choque hiposmótico, mantiveram essa capacidade mesmo na ausência do Ca²⁺ extracelular, indicando que algum outro tipo de sinalização, que não o Ca²⁺ extracelular, está relacionado com a ativação da RVD nessas células.

Segundo Pierce e Politis (1990), o efeito do Ca^{2+} na sinalização da regulação do volume celular, consiste na alteração do transporte de ao menos um dos dois tipos gerais de osmólitos (orgânicos e inorgânicos). Em tipos celulares de muitos vertebrados terrestres, alterações de $[\text{Ca}^{2+}]$ influenciam o efluxo de K^+ e Cl^- . A maioria dos dados indica que o cálcio afeta especificamente o movimento de K^+ porque uma droga chamada quinina que bloqueia os canais de K^+ - dependentes de Ca^{2+} inibe ou reduz a recuperação de volume celular, de forma semelhante à ausência de cálcio. Já em células de animais marinhos, variações de $[\text{Ca}^{2+}]$ alteram o efluxo de aminoácidos.

No caso de *Bunodosoma caissarum*, se a participação do cálcio na RVD fosse restrita a ativação do efluxo de osmólitos orgânicos (13% de redução) o aumento de volume celular na ausência de Ca^{2+} extracelular seria proporcional à redução desses osmólitos. No entanto, o aumento de volume observado foi de cerca de 50%, o que sugere que além do efluxo de osmólitos orgânicos, o Ca^{2+} também estaria atuando sobre a mobilização dos osmólitos inorgânicos. Estes achados já foram relatados em células musculares de craca sob estresse hiposmótico (PENA-RASGADO et al., 2001).

Ambas as espécies estudadas parecem apresentar mais mecanismos regulatórios como resposta a meios diluídos do que a meios de maior salinidade. *Bunodosoma caissarum* inclusive apresenta capacidade de osmorregular sob estresse hiposmótico, o que pode permitir a essa espécie uma maior tolerância à diluição quando comparada a *Actinia bermudensis*. Essa observação está de acordo com o padrão de distribuição das duas espécies no costão rochoso, *Bunodosoma caissarum* frequentemente apresenta uma ampla distribuição, inclusive em regiões que ficam expostas durante a maré baixa, enquanto *Actinia bermudensis* se limita a regiões que nunca ficam descobertas pela água.

A adaptação das duas espécies à variação de salinidade parece depender tanto da mobilização de osmólitos orgânicos como inorgânicos. A participação associada desses dois osmólitos na regulação de volume celular de cnidários nunca havia sido descrita antes.

6 CONCLUSÕES

- *Actinia bermudensis* é um típico osmoconformador em meio diluído, enquanto *Bunodosoma caissarum* ionoconforma e osmorregula graças à variação de osmólitos orgânicos.
- Ambas espécies osmoconformam em meio hiperosmótico.
- Durante exposição em meio diluído, o tecido muscular de *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum* perdem osmólitos orgânicos e inorgânicos .
- Durante exposição um meio hiperosmótico, o tecido muscular de *Bunodosoma caissarum* acumula osmólitos inorgânicos.
- Células de *Actinia bermudensis* apresentam RVD parcial, enquanto *Bunodosoma caissarum* apresenta RVD completa.
- Diante de choque hiperosmótico células de ambas espécies apresentam mecanismos para minimizar a perda de volume.
- A RVD de *Bunodosoma caissarum* se dá pelo efluxo de KCl através do cotransportador K^+Cl^- e osmólitos orgânicos possivelmente por uma via de fluxo de ânions.
- A Na^+K^+ ATPase está envolvida na manutenção do volume celular de células de *Bunodosoma caissarum* diante de choque hiposmótico.
- Os trocadores Na^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- não estão envolvidos nos mecanismos regulatórios durante o estresse hiperosmótico aplicado às células de ambas as espécies.
- O fluxo de osmólitos durante a RVD de *Bunodosoma caissarum* é dependente de Ca^{2+} extracelular

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALE, E.; GABILAN, N.H.; CANO-ABAD, M.F.; GARCIA, A.G.; LOPEZ, M.G. **The sea anemone toxin Bc2 induces continuous or transient exocytosis, in the presence of sustained levels of high cytosolic Ca²⁺ in chromaffin cells.** Journal of Biological Chemistry, v.275(48), p.37488-37495, 2000.

AMADO, E.M. **Regulação osmo-iônica e volume celular de *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda) diante de estresse químico e osmótico** 2002. 42p. Monografia – Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BELYANTSEVA, I.A.; FROLENKOV, G.I.; WADE, J.B.; MAMMAMO, F.; KACHAR, B. **Water permeability of cochlear outer hair cells: characterization and relationship to electromotility.** The Journal of Neuroscience, v.20(24), p.8996-9003, 2000.

BENSON-RODENBOUGH, B.; ELLINGTON, W.R. **Responses of the euryhaline sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc) (Anthozoa, Actinaria, Actiniidae) to osmotic stress.** Comparative Biochemistry Physiology, v.72A, p.731-735, 1981.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA G.J. **Invertebrates.** 2.ed. Sunderland: Sinauer, c2003.

BURSEY, C.R.; HARMER, J.A. **Induced changes in the osmotic concentration of the coelenteron fluid of the sea anemone *Condylactis gigantea*.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.64A, p.73-76, 1979.

CLAYBROOK, D.L. **Nitrogen Metabolism.** In: MANTEL, L.H. The Biology of Crustacea. New York: Academic press, v.5, p.163-212, 1983.

CLARK, M.E. **Free amino acid levels in the coleomic fluid and body wall of polychaetes.** Biological Bulletin, v.134, p.35-47, 1968.

DEATON, L.E. **Comparative aspects of cellular-volume regulation in cardiomyocytes.** Physiological Zoology, Chicago, v.70, p.379-390, 1997.

DEATON, L.E.; HOFFMANN, R.J. **Hypoosmotic volume regulation in the sea anemone *Metridium senile*.** Comparative Biochemistry Physiology, v.91C, p.187-191, 1988.

DEATON, L.E.; PIERCE, S.K. **Introduction: cellular volume regulation mechanisms and control.** Journal of Experimental Zoology, v.268, p.77-79, 1994.

DRIESSCHE, W.V.; SMET, P.D.; LI, J.; ALLEN, S.; ZIZI, M.; MOUNTIAN, I. **Isovolumetric regulation in a distal nephron cell line.** American Journal Physiology, v.272, p.C1890-C1898, 1997.

- ERICKSON, G.R.; ALEXOPOULOS, L.G.; GUILAK, F. **Hyper-osmotic stress induces volume change and calcium transients in chondrocytes by transmembrane, phospholipids, and G-protein pathways.** *Journal of Biomechanics*, v.34, p. 1527-1535, 2001.
- FORCE, T.; BONVENTRE, J.V. **Cellular signal transduction mechanisms.** In: STRANGE, K. (Ed) *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton: CRC press, 1994.
- HALLOWS, K.R.; KNAUF, P.A. **Principles of cell volume regulation.** In: STRANGE, K. (Ed) *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton: CRC press, 1994.
- HICKMAN, C.P. Jr; ROBERTS, L.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia.** 11^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- 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.
- HOWARD, C.L.; SWANK, P. KASSCHAU, M.R. **Environmental and seasonal influences of the free amino acid pool of the sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc) under natural conditions.** *Comparative Biochemistry Physiology*, v.87A, p.319-325, 1986.
- JORDAN, P.J.; DEATON, L.E **Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesii* and the freshwater clam *Lampisilis teres*.** *Comparative Biochemistry Physiology*, v.122(A), p.199-205, 1998.
- KÉVERS, C.; PÉQUEUX, A.; GILLES, R. **Effects of hypo- and hyperosmotic shocks on the volume and ions content of *Carcinus maenas* isolated axons.** *Comparative Biochemistry Physiology*, v.64A, p.427-431, 1979.
- KIRK, K.; ELLORY, J.C.; YOUNG, J.D. **Transport of organic substrates via a volume-activated channel.** *Journal of Biological Chemistry*, v.267, p. 23475- 23478.
- LA SPADA, G.; BIUNDO, T.; NARDELLA, R.; MELI, S. **Regulatory volume decrease in nematocytes isolated from acontia of *Aiptasia diaphana*.** *Cellular and Molecular Biology*, v.45(2), p.249-258, 1999.
- LANG, F. ; WALDEGGER, S. **Regulating cell volume.** *American Scientist*, v.85, p.456-463, 1997.
- LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VOLKI, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HAUSSINGER, D. **Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.** *Physiological Reviews*, USA, v.78, n.1, p.247-305, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-267, 1951.

- MACKNIGHT, A. D.C.; GORDON, L.G.M.; PURVES R.D. **Problems in the understanding of cell volume regulation** The Journal of Experimental Zoology, v.268, p. 80-89, 1994.
- MALE, K.B.; STOREY, K.B. **Kinetic characterization of NADP-specific glutamate dehydrogenase from the sea anemone, *Anthopleura xanthogrammica*: control of amino acid biosynthesis during osmotic stress.** Comparative Biochemistry Physiology, v.76B, p.823-829, 1983.
- MALPEZZI, E.L.; DE FREITAS, J.C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. **Characterization of peptides of sea anemone venom collected by a novel procedure.** Toxicon, v.31(7), p.853-864, 1993.
- MARINELLI, R.A.; PHAM, L.; AGRE, P.; LaRUSSO, N.F. **Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane.** The Journal of Biological Chemistry, v.272, p.12984-12988, 1997.
- MARINO, A.; LA SPADA, G. **Regulatory volume increase in nematocytes isolated from acontia of *Aiptasia diaphana* (Cnidária, Anthozoa).** Cell Molecular Biology, v.50, p.533-542, 2004.
- MATSUSHIMA, O.; KHAN, H.R.; SALEUDDIN, A.S.M. **Changes in the free aminoacida concentration in tissues of the freshwater pulmonates *Helisoma duryi* during hypertonic stress.** Comparative Biochemistry Physiology, v.94(A), p.653-657, 1989.
- MCCARTY, N.A.; O'NEIL, R.G. **Calcium signaling in cell volume regulation.** Physiological Reviews, v.72(4), p.1037-1061, 1992.
- McNAMARA, J.C.; GREENE, L.J.; ROSA, J.C.; AUGUSTO, A.S. **Adjustment of free aminoacid pools in different tissues and haemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during salinity acclimatation.** Marine and Freshwater Behavior and Physiology, v.37(3), p.193-208, 2004.
- MEINILD, A.K.; KLAERKE, D.A.; ZEUTHEN, T. **Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5.** The Journal of Biological Chemistry, v.273, p.32446-32451, 1998.
- MENDES, E.G. **Chemical mediation in Coelenterata.** Academia Brasileira de Ciências, v.47, p.101-104, 1976.
- MORETTI, R.; MARTIN, M.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARIN, R. **Ouabain-insesitive Na-ATPase activity in homogenates from differents animal tissues.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.98, p. 623-626, 1991.
- MORRIS, C.E.; WILLIAMS, B.; SIGURDSON, W.J. **Osmotically-induced volume changes in isolated cells of a pond snail.** Comparative Biochemistryc and Physiology, v.92 A, p.479-483, 1988.

- NATOCHIN, Y.V.; BERGER, V.Y.; KHLEBOVICH, V.V.; LAVROVA, E.A.; MICHAILOVA, O.Y. **The participation of electrolytes in adaptation mechanisms of intertidal molluscs' cells to altered salinity.** Comparative Biochemistry Physiology, v.63A, p.115-119, 1979.
- OLIVEIRA, J.S.; REDAELLI, E.; ZAHARENKO, A.J.; CASSULINI, R.R.; KONNO, K.; PIMENTA, D.C.; FREITAS, J.C.; CLARE, J.J.; WANKE, E. **Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop.** Journal of Biological Chemistry, v.279(32), p.33323-33335, 2004.
- PASANTE-MORALES, H.; OCHOA DE LA PAZ, L.D.; SEPULVEDA, J.; QUESADA, O. **Aminoacids as osmolytes in the retina.** Neurochemistry Researchs, v.24, p. 1339 –1346, 1999.
- PENA-RASGADO, C.; PIERCE, S.K.; RASGADO-FLORES, H. **Osmolytes responsible for volume reduction under isosmotic or hyposmotic conditions in Barnacle muscle cells.** Cell Molecular Biology, v.47, p. 841-853, 2001.
- PIERCE, S.K. **Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acid and inorganic ions as osmotic solute.** Biological Bulletin, v.183, p.405-419, 1982.
- PIERCE, S.K., Jr.; MINASIAN, L.L., Jr. **Water balance of a euryhaline sea anemone, *Diadumene leucolena*.** Comparative Biochemistry Physiology, v.49A, p.159-167, 1974.
- PIERCE, S.K.; POLITIS, A.D. **Ca²⁺ - Activated cell volume recovery mechanisms.** Annual Reviews of Physiology, v.52, p.27-42, 1990.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptação.** 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.
- RUSSEL, J.M. **Sodium-Potassium-Chloride cotransport.** Physiological Reviews, U.S.A., v.80(1), p.211-276, 2000.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente.** 6.ed. São Paulo : Editora Santos, 2002.
- SMITH, L.H., Jr.; PIERCE, S.K. **Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hyposmotic stress: Ca²⁺ effects on ionic and organic osmolyte effluxes.** Biological Bulletin, v.173, p.407-418, 1987.
- SMITH, T.W.; RASMUSSEN, R.L.; FREUDENRICH, C.C; LIEBERMAN, M. **Role of Ca²⁺ in myocardial volume regulation.** Circulation, v.86, p.480, 1992.
- SOUZA, M.M.; SCAMES, E. **Volume changes in cardiac ventricles from *Aplysia brasiliana* upon exposure to hyposmotic shock.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.127A, p.99-111, 2000.

SOUZA, M.M; BOYLE, R.T.; LIEBERMAN, M. **Different physiological mechanisms control isovolumetric regulation and regulatory volume decrease in chick embryo cardiomyocytes.** Cell Biology International, v. 24, p. 713 – 721, 2000.

SOUZA, M.M.; STUCCHI-ZUCCHI, A.; CASSOLA, A.C.; SCEMES, E. **Electrophysiology of cardiac myocytes of *Aplysia brasiliana*.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.133A, p.161-168, 2002.

TUZ, K.; ORDAZ, B.; VACA, L.; QUESADA, O.; PASSANTE-MORALES, H. **Isovolumetric mechanisms in cultured cerebellar granule neurons.** Journal of Neurochemistry, v.79, p.143-151, 2001.

WARREN, M.K.; PIERCE, S.K. **Two cell volume regulatory systems in the *Limulus* myocardium: an interaction of ions and quaternary ammonium compounds.** Biological Bulletin, v.163, p.504-516, 1982.

WATANABE, S.; KANEKO, T.; AIDA, K. **Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater.** The Journal of Experimental Biology, v.208, p.2673-2682, 2005.

WEHNER, F.; OLSEN, H.; TINEL, H.; KINNE-SAFFRAN, E.; KINNE, R.K.H. **Cell volume regulation: osmolytes, osmolytes transport, and signal transduction.** Physiological Biochemistry Pharmacology, v.148, p.1-80, 2003.

WHALEY, D.W.; HOOL, L.C.; TEN EICK, R.E; RASMUSSEN, H.H. **Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na⁺-K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes.** American Journal of Physiology, v.265, p. C1201 – C1210, 1993.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals.** Oxford: Blackwell Science, 2000.