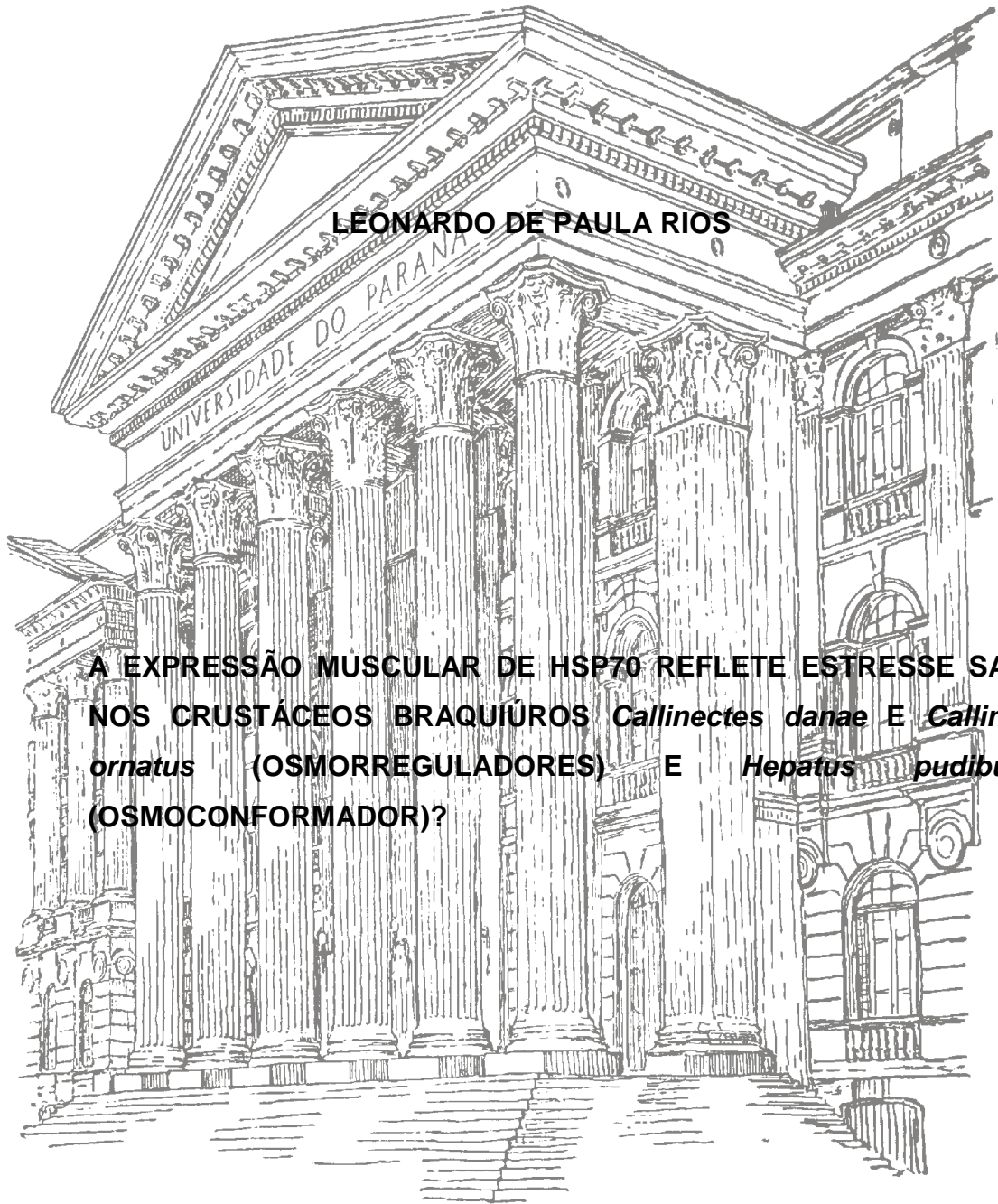


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



LEONARDO DE PAULA RIOS

A EXPRESSÃO MUSCULAR DE HSP70 REFLETE ESTRESSE SALINO
NOS CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS *Callinectes danae* E *Callinectes
ornatus* (OSMORREGULADORES) E *Hepatus pudibundus*
(OSMOCONFORMADOR)?

CURITIBA
2017

LEONARDO DE PAULA RIOS

A EXPRESSÃO MUSCULAR DE HSP70 REFLETE ESTRESSE SALINO
NOS CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS *Callinectes danae* E *Callinectes ornatus*
(OSMORREGULADORES) E *Hepatus pudibundus*
(OSMOCONFORMADOR)?

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Fisiologia, do Curso de Pós-Graduação em
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

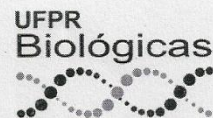
Orientadora: Prof^a. Dr^a Carolina Arruda de O. Freire

CURITIBA

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **LEONARDO DE PAULA RIOS** no dia 20 de fevereiro de dois mil e desessete, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Fisiologia, intitulada: "A EXPRESSÃO MÚSCULAR DE HSP70 REFLETE ESTRESSE SALINO NOS CRUSTÁCEOS BRAQUÍUROS *Callinectes danae* E *Callinectes ornatus* (OSMOREGULADORES) E *Hepatus pudibundus* (OSMOCONFORMADOR)?"", com a banca examinadora constituída pelos professores: Doutora Marta Marques de Souza (Universidade Federal do Rio Grande - FURG), Doutora Ana Lúcia Tararathuch (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire (Universidade Federal do Paraná - UFPR), como orientadora e presidente da Banca Examinadora, tendo sido **Aprovado**, sendo que a emissão do diploma ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data de emissão da mesma.

Curitiba 20 de fevereiro de 2017

Fernando Augusto Lavezzo Dias

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Prof. Dr. Fernando A. Lavezzo Dias

Matrícula UFPR - 20554

Coordenador Pós-Graduação em Fisiologia

Centro Politécnico - Caixa Postal 19031 - CEP: 81531-990 - Curitiba/PR

Telefones: (41) 3361-1714 - Fax (41) 3361-1714 - fisiologia@ufpr.br

www.bio.ufpr.br

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Carolina Arruda De Oliveira Freire, por ter me dado uma oportunidade, pela orientação, amizade, convívio, sabedoria e paciência nestes mais de 3 anos de LFCO.

A Prof^a Dra. Viviane Prodocimo pelos conselhos, convivência e colaboração.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Deivyson Bozza, Eloísa Pinheiro, Felipe Brandalise de Araújo, Flávia Sampaio, Giovanna C. Castellano, Guilherme de Almeida Torres, Gustavo Yamasaki, Isis Danniele Cury da Cruz, Juliane Ceron, Natascha Wosnick; à Silvia Milan e Anieli Maraschi que também fizeram parte da equipe: obrigado a todos pelo companheirismo, amizade, paciência e por estarem sempre dispostos a ajudar, colaborar e principalmente ensinar.

Aos meus familiares pelo apoio, suporte e ajuda.

Aos meus pais por cederem sua casa, comida e auxílio durante as coletas, pelo incentivo e por sempre estarem lá por mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia por terem contribuído com a minha formação e o meu aprendizado.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante esses dois anos de mestrado.

Quando nada pareceu dar certo, fui ver o cortador de pedras martelar a sua rocha, talvez cem vezes sem que uma rachadura aparecesse. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abriu em duas. E eu sabia que não foi aquele golpe que fez aquilo, mas todos os outros que vieram antes dele.

JACOB A. RIIS

RESUMO

O longo tempo de evolução dos crustáceos (~500 milhões de anos) em conjunto com fatores evolutivos, como mutação, seleção natural e o fluxo gênico entre populações, permitiu uma enorme variação de formas e no preenchimento de nichos ecológicos por parte destes animais, sendo que em torno de 90% das espécies conhecidas são encontradas no mar ou em águas salinas, como estuários. Qualquer que seja o seu habitat, a osmorregulação é de vital importância para a sobrevivência dos crustáceos, pois ela garante a homeostase do líquido extracelular, mesmo diante de variações na salinidade da água. Essas alterações de salinidade responsáveis pelo desequilíbrio osmótico do líquido extracelular podem impactar no funcionamento normal das células, que por sua vez, ativam respostas celulares, entre elas a possível síntese de proteínas de choque térmico, entre elas a Hsp70. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de Hsp 70, acompanhar a osmolalidade da hemolinfa e comparar a capacidade de hidratação muscular em três espécies de decápodes braquiúros: *Callinectes danae*, *Callinectes ornatus* e *Hepatus pudibundus* diante de desafios salinos. O fato de que as espécies do gênero *Callinectes* serem osmorreguladoras e *H. pudibundus* apresentar a estratégia de osmoconformação pode se refletir na expressão diferenciada da síntese de Hsp70 em resposta a um agente estressor. Para tanto, os animais foram expostos a choque hiposalino (20‰) e hipersalino (45‰) em intervalos com duração de 6 horas, 24 horas e 72 horas para cada espécie. Após a exposição, foram retiradas amostras da hemolinfa para posterior análise de osmolalidade, além de amostras de tecido muscular para determinação do teor de hidratação e para análise da expressão de Hsp70. Também foram analisadas as concentrações de amônia e o valor de pH na água no início e ao final de cada experimento para determinar se a concentração de amônia em determinado valor de pH poderia ser tóxica a ponto de desestabilizar o processo de osmorregulação. A hipótese de que *H. pudibundus* teria menor expressão constitutiva de Hsp70 não foi comprovada, mas a hipótese de que *C. danae* e *C. ornatus* apresentariam maior expressão de Hsp70 do que *H. pudibundus* diante ambos os choques salinos comprovou-se verdadeira, ao menos com relação a *C. danae* e condicionada a um tempo de exposição ao agente estressor de pelo menos 72 horas. As espécies *C. danae* e *C. ornatus* (osmorreguladoras fracas) e *H. pudibundus* (osmoconformador), apresentaram neste estudo grande capacidade de manutenção da osmolalidade da hemolinfa diante de redução de salinidade, ao menos por um período de poucas horas. Todas as três espécies apresentaram comportamento osmoconformatório diante de aumento de salinidade, como o esperado. Em relação a capacidade de hidratação tecidual, *C. danae* e *C. ornatus* conseguiram, de forma geral, manter a sua hidratação tecidual diante de ambos os choques salinos, enquanto *H. pudibundus* apresentou diminuição significativa na quantidade de água no tecido muscular a partir de 24 horas de exposição em choque hipersalino. A concentração de amônia na água em conjunto com os valores de pH não podem ser admitidos como fatores que possam ter prejudicado a resposta das espécies ao estresse salino. A resposta à pergunta de que a expressão de Hsp70 poderia refletir estresse salino em *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* só pode ser plenamente respondida através da análise da expressão de Hsp70 em outros tecidos como brânquias e hepatopâncreas, além da utilização de diferentes intervalos de tempo de exposição ao estresse salino.

Palavras chaves: osmorregulação, crustáceos, Hsp70, hiposalino, hipersalino

ABSTRACT

The long time evolution of crustaceans (~ 500 million years) along with evolutionary factors, such as mutation, natural selection and gene flow among populations, allowed a huge variation of forms and the filling of ecological niches by these animals. Around 90% of the known species of crustaceans are found in the sea or salt water, such as estuaries. Whatever their habitat, osmoregulation is of vital importance for the survival of crustaceans, as it ensures the homeostasis of extracellular fluid, even in the face of variations in salinity of water. These changes in salinity responsible for the osmotic imbalance of the extracellular fluid may impact on the normal functioning of the cells, which in turn activate cellular responses, among them the possible synthesis of heat shock proteins, like Hsp70. The objective of this study was to evaluate the expression of Hsp70, follow the hemolymph osmolality and to compare the muscle hydration capacity in three species of decapods: *Callinectes danae*, *Callinectes ornatus* and *Hepatus pudibundus* in the presence of saline challenges. The fact that species of the genus *Callinectes* are osmoregulatory and *H. pudibundus* presenting the osmoconformation strategy can be reflected in the differentiated expression of the synthesis of Hsp70 in response to a stressor agent. For this, the animals were exposed to hyposaline (20‰) and hypersaline (45‰) shock at intervals of 6 hours, 24 hours and 72 hours for each species. After exposure, hemolymph samples were taken for posterior osmolality analysis, as well as muscle tissue samples for determination of hydration content and analysis of Hsp70 expression. Ammonia concentrations and pH in water were also analyzed at the beginning and at the end of each experiment, to determine if the concentration of ammonia at a certain pH value could be toxic to the point of destabilizing the osmoregulation process. The hypothesis that *H. pudibundus* would have lower constitutive expression of Hsp70 has not been proven, but the hypothesis that *C. danae* and *C. ornatus* would present higher expression of Hsp70 than *H. pudibundus* exposed to salt shocks proved to be true, at least with respect to *C. danae* and conditioned to a exposure to the stressor of at least 72 hours. *C. danae* and *C. ornatus* (weak osmoregulators) and *H. pudibundus* (osmoconformer) presented in this study a great ability to maintain hemolymph osmolality in the presence of salinity reduction, at least for a few hours. All three species presented behavior of osmoconformators in exposure to increase of salinity, as expected. In relation to tissue hydration capacity, *C. danae* and *C. ornatus* were able to maintain their tissue hydration in the presence of both saline shocks, while *H. pudibundus* showed a significant decrease in the amount of water in the muscle tissue after 24 hours of exposure in hypersaline shock. The concentration of ammonia in the water together with the pH values can not be accepted as factors that may have impaired the response of the species to salt stress. The answer to the question that the expression of Hsp70 could reflect saline stress in *C. danae*, *C. ornatus* and *H. pudibundus* can only be fully answered by analyzing the expression of Hsp70 in other tissues such as gills and hepatopancreas, in addition to the use of different intervals of exposure to saline stress.

Key words: osmoregulation, crustacean, Hsp70, hypo-regulation, hyper-regulation

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Espécimes de *C. danae* (A), *C. ornatus* (B) e *H. pudibundus* (C).....5
- FIGURA 2 - Osmolalidade na hemolinfa (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparada a situação controle. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos em cada salinidade. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. n=6. A linha vermelha representa a osmolalidade da água.....14
- FIGURA 3 - Teor hídrico muscular (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparada a situação controle. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. 5>n<6.....16
- FIGURA 4 - Expressão de Hsp70 muscular (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparado a situação controle. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos em cada salinidade. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies cada tempo. 3>n<6.....22

Lista de tabelas

TABELA 1 – Concentração de amônia (N-NH₃) na água inicial e final (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (*): Diferença na concentração inicial e final de amônia na água. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos em cada salinidade. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo.

n=6.....18

TABELA 2 – Valores de pH na água inicial e final (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (*): Diferença nos valores de pH inicial e final na água. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos em cada salinidade. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies cada tempo.

n=6.....20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CARACTERÍSTICAS E HABITAT DOS CRUSTÁCEOS	1
1.2. OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS	1
1.3. ESPÉCIES ESTUDADAS	3
1.3.1. <i>Callinectes danae</i> E <i>Callinectes ornatus</i>	3
1.3.2. <i>Hepatus pudibundus</i>	4
1.4. AMONIA E pH NA ÁGUA	5
1.5. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	6
1.6. HIPÓTESE	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GERAL	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. COLETA E ACLIMATAÇÃO	10
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	10
3.3. DOSAGEM DE OSMOLALIDADE	11
3.4. TEOR HÍDRICO	11
3.5. DOSAGENS DE AMÔNIA E pH	11
3.6. EXPRESSÃO DE HSP70	11
3.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	12
4. RESULTADOS	13
4.1. OSMOLALIDADE	13
4.2. TEOR HÍDRICO	15
4.3. CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA NA ÁGUA	17
4.4. VALORES DE pH NA ÁGUA	18
4.5. EXPRESSÃO DE Hsp70	20
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1.INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS E HABITAT DOS CRUSTÁCEOS

Os primeiros registros fósseis de crustáceos datam de 500 milhões de anos atrás, desde o Cambriano inferior até o presente momento. Esse longo tempo de evolução, aliado à diversidade genética, plasticidade fenotípica, pressão seletiva, radiação adaptativa, mutação e seleção natural, entre outros fatores, permitiu uma grande variedade de formas e ocupação de diversos nichos ecológicos por parte destes animais, sendo que em torno de 90% das espécies conhecidas são encontradas no mar ou em águas salinas, como estuários (Schram 2001; Dixon *et al* 2003; Evans *et al* 2009). Qualquer que seja o seu habitat, a osmorregulação tem papel fundamental na capacidade de adaptação dos crustáceos aos diversos ambientes, pois ela permite a homeostase do líquido extracelular, mesmo diante de variações na salinidade da água (Pequex 1995; Odum 2001; Willmer *et al* 2009; Romano e Zeng 2012).

1.2. OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS

Em relação a salinidade, grande parte dos invertebrados marinhos (crustáceos, moluscos, poliquetas, e outros) podem ser classificados como estenohalinos, que por viverem em um ambiente estável, não toleram grandes variações de salinidades do seu meio, ou como eurihalinos, que exibem alto grau de tolerância a uma ampla variação da salinidade na água, sendo encontrados em locais como estuários e baías, onde há grande oscilação de salinidade em decorrência do ciclo de marés (Willmer *et al* 2005; Evans *et al* 2009; Sherwood *et al* 2012).

Em matéria de regulação de fluidos, os crustáceos podem apresentar duas estratégias distintas: osmoconformação ou osmorregulação (Pequex 1995). Tanto a osmoconformação quanto a osmorregulação têm suas vantagens e desvantagens. Se um animal possui a capacidade de regulação osmótica e iônica do líquido extracelular (LEC), ele consegue manter a pressão osmótica do LEC estável apesar das mudanças de salinidade do ambiente externo, através da manutenção de um gradiente osmótico, evitando deste modo que a maioria das suas células sejam expostas a oscilações osmóticas que levam a variação de volume (Moyes 2009; Sherwood *et al.* 2012). Para tanto, é necessário que ocorra gasto energético neste

processo. Uma das maneiras para que ocorra gradiente osmótico entre o meio extracelular e o meio externo é pela ativação de transportadores iônicos localizados em grande parte nas brânquias, de modo a absorver ou excretar íons, em um mecanismo conhecido como regulação Regulação Anisomótica Extracelular (RAE) (Florkin 1962; Foster *et al.*, 2010).

Quando se fala em osmorregulação é possível encontrar entre os crustáceos espécies hiperreguladoras, hiporreguladoras, ou espécies que apresentam comportamentos osmorregulatórios alternantes, como as espécies do gênero *Callinectes*, que apresentam hiperregulação em águas salinas e osmoconformação em água do mar. Os hiperreguladores permanecem hiperosmóticos em relação ao meio, quando a concentração osmótica do líquido extracelular é maior do que a do ambiente externo (Pequex 1995; Kirschner 2004; Freire *et al.*, 2008). Os hiporreguladores conseguem manter-se hiposmóticos em relação ao ambiente onde vivem, mantendo a concentração osmótica do fluido extracelular abaixo daquela do ambiente externo (Willmer *et al.* 2005; Freire *et al.* 2008). Alguns crustáceos eurihalinos podem ser hiperreguladores em baixas salinidades e hiporreguladores em altas salinidades. O crustáceo com este comportamento mais acentuado é a *Artemia salina*, que pode viver em água hipersalina. (Willmer *et al.* 2005, Sherwood *et al.* 2012). Em águas diluídas, alguns crustáceos osmorreguladores podem sobreviver a variações de salinidade entre 5‰ e 45‰, como os caranguejos da família Grapsidae e camarões peneídeos (Evans *et al.* 2009).

Se os animais exibirem estratégia de conformação osmótica e iônica do LEC, eles não apresentarão diferença significativa entre o seu meio interno e a água do seu ambiente, igualando a osmolalidade do LEC à do ambiente externo. Desta forma, as células destes animais sofrem uma mudança temporária no volume celular em decorrência do influxo ou efluxo de água através da membrana celular. Este movimento de água altera a composição e a força iônica intracelular, o que por sua vez afeta a atividade de enzimas envolvidas no anabolismo e catabolismo de aminoácidos, particularmente asparagina, glutamina, prolina, alanina, glicina e serina (Evans *et al.* 2009; Sherwood *et al.* 2012). Desta maneira, a regulação de volume torna-se essencial para a manutenção da homeostase em todos os tipos celulares de animais osmoconformadores. Devido ao fato destas células comportarem sistemas de

transporte de íons e estarem em contato direto com a água, elas podem sofrer danos, e deste modo prejudicar o funcionamento das brânquias (Evans *et al* 2009).

Osmoconformadores eurihalinos podem tolerar mudanças significativas de salinidade do ambiente externo (como estuários, por exemplo) e podem sobreviver a diluição ou concentração do LEC através da regulação dos osmólitos orgânicos e inorgânicos. Entre eles estão a β -alanina, taurina e prolina, que correspondem a mais da metade da osmolalidade dos osmoconformadores nas suas células. Desta maneira, é possível manter a concentração do líquido intracelular (LIC) em equilíbrio com o LEC (Moyes 2009; Sherwood *et al* 2012). Desta forma, osmoconformadores eurihalinos possuem grande capacidade de regulação de volume, em grande parte devido ao aumento da capacidade de síntese de aminoácidos livres quando expostos a alta salinidade. Em baixas salinidades, ocorre o contrário: os aminoácidos livres são catabolizados e liberados na hemolinfa, onde sofrem desaminação e são excretados como amônia através das brânquias. Este mecanismo é conhecido como regulação isosmótica intracelular (RII) (Willmer *et al.* 2005; Evans *et al* 2009; Moyes, 2009).

Ocorrem dois tipos de regulação de volume: Redução Regulatória de Volume (RVD), e Aumento Regulatório de Volume (RVI). A RVD é utilizada quando a célula ganha água e precisa perder volume; já o RVI ocorre quando existe a perda de água e a necessidade de reposição do volume perdido (Lang *et al.* 1998, Strange 2004). RVI e RVD podem acontecer, principalmente devido a ativação de ATPases relacionadas ao transporte de íons, já que durante a RVD acontece a saída de metabólitos somados à água para restabelecimento da homeostase. No caso da RVI, acontece o contrário: a entrada de solutos na célula permite a entrada de água, de modo a recuperar o volume anterior (Hoffmann e Dunham 1995; Wehner *et al.* 2003; Strange 2004, Hoffmann *et al.* 2009).

1.3. ESPÉCIES ESTUDADAS

1.3.1. *Callinectes danae* E *Callinectes ornatus*

Callinectes danae e *Callinectes ornatus* (FIGURAS 1A e 1B) são crustáceos decápodes, encontrados com facilidade em estuários, baías e em todo litoral ao longo da costa sul do Brasil. É possível capturá-los com certa facilidade, seja utilizando

petrechos de pesca, como o puçá ou armadilhas do tipo covo iscadas com vísceras de frango. Também é possível adquiri-los por intermédio de pescadores que frequentemente os encontram em suas redes de pesca, como fauna acompanhante (bycatch) da pesca do camarão (Baptista *et al.* 2003). Tanto *C. danae* quanto *C. ornatus* são chamados de osmorreguladores fracos, pois conseguem a captação de sal de águas salinas, mas não de água doce. Os crustáceos do gênero *Callinectes* são capazes de alternar o padrão osmorregulador para osmoconformador ou vice-versa, quando alternam entre o mar e estuário, especialmente em época de reprodução, pois a desova sempre ocorre em ambiente mais salino (Mantelatto e Fransozo 2000; Mantelatto 2000). *C. danae* e *C. ornatus* são osmoconformadores em altas salinidades e em salinidades próximas à da água do mar, e hiperosmorregulam em água do mar diluída (Masui *et al.* 2002; Garçon *et al.* 2009; Freire *et al.* 2011).

1.3.2. *Hepatus pudibundus*

Hepatus pudibundus (osmoconformador) (FIGURA 1C) é uma espécie de crustáceo decápode marinho encontrado no Brasil, do Amapá ao Rio Grande do Sul, que habita ambientes de fundos arenosos, lamosos e de conchas, de águas rasas ou que podem chegar a 160 metros de profundidade (Melo 1996; Fracasso e Branco 2005). A sua coleta é feita por rede de arrasto, na maioria das vezes, sendo apanhado como fauna acompanhante da pesca do camarão. A taxa de sobrevivência devido aos danos causados pelas redes de arrasto é variável entre os diferentes grupos taxonômicos, sendo que os crustáceos do gênero *Callinectes* e *H. pudibundus* são muito resistentes às injúrias e a exposição ao ar (Moreira *et al.* 2011). Como típico em invertebrados marinhos, *H. pudibundus* tem comportamento osmoconformador. Nestes animais, a concentração osmótica do meio extracelular varia de acordo com a concentração ou diluição da água do mar (salinidade), exigindo que o animal possua a capacidade de regulação de volume celular diante de variação de salinidade, para que as células possam desempenhar as suas funções (Pequex, 1995, Freire *et al.* 2008).

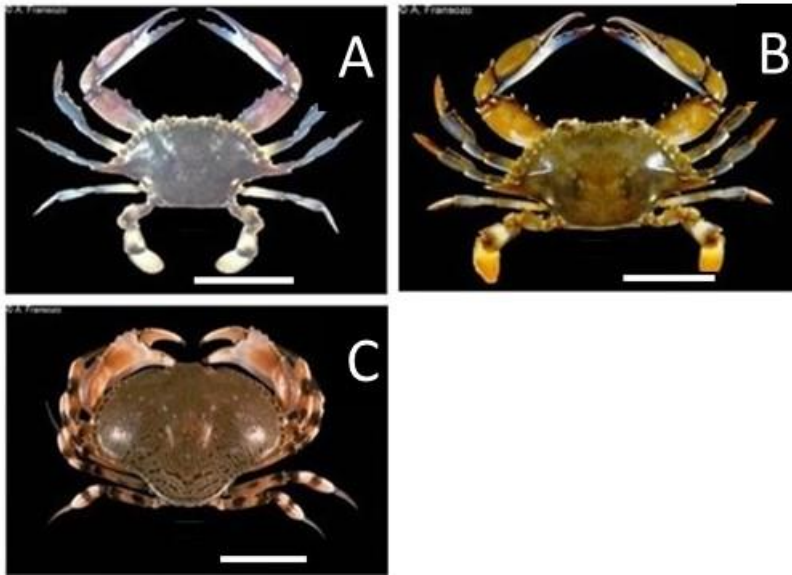


FIGURA 1. Espécimes de *C. danae* (A), *C. ornatus* (B) e *H. pudibundus* (C).

Escala: 4cm

FONTE: Disponível em goo.gl/St3O4D (*H. pudibundus*); em goo.gl/LCTe2B (*C. danae*); e em goo.gl/NDYjyv (*C. ornatus*). Acessado em 09/01/2017.

1.4. AMONIA E pH NA ÁGUA

C. danae, *C. ornatus* e *H. pudibundus* são organismos bentônicos, que vivem no substrato de fundo de ecossistemas aquáticos (rios, lagos, oceanos, etc), durante parte ou todo o seu ciclo de vida (Gray e Elliot 2009). Desta maneira, eles são suscetíveis a mudanças ambientais, exibindo variados graus de tolerância a fatores prejudiciais como poluição, aumento de temperatura, pH e amônia (Moss *et al.* 1987; Metcalfe, 1989). A amônia, em conjunto com o nitrito e nitrato, é um componente essencial a vida de microrganismos aquáticos, além de ser um dos mais abundantes produtos nitrogenados dissolvidos em ecossistemas aquáticos, embora quando encontrada em excesso, possa prejudicar a condição fisiológica de vários organismos, inclusive crustáceos decápodes. A amônia existe em duas formas: NH_3 e na forma iônica NH_4^+ , ao passo que a proporção entre elas é em grande parte determinada pela salinidade, temperatura e especialmente o pH da água (Whitfield 1974; Romano e Zeng 2013). A origem destes compostos nitrogenados no ambiente está ligada à decomposição natural de matéria orgânica e ao catabolismo de proteínas (Camargo e Alonso 2006; Romano e Zeng 2013). Em ambientes aquáticos, é possível encontrar tanto amônio (NH_4^+) quanto amônia (NH_3), a forma mais tóxica e que se difunde mais facilmente pela membrana plasmática das brânquias dos crustáceos e chegar até a hemolinfa (Weihrauch *et al.* 2004; Romano e Zeng 2013).

Devido ao fato de as brânquias estarem quase que o tempo todo em contato com a água, elas podem ser danificadas pela alta concentração de amônia no ambiente. Entre os danos causados, os mais importantes são: necrose, rompimento das células pilares, infiltração de hemócitos e colapso das lamelas (Rebelo *et al.* 2000; Romano e Zeng 2007). Em um ambiente com alta concentração de amônia, a sua toxicidade irá depender do estágio de desenvolvimento do animal, visto que nas fases pós larva e juvenil, a tolerância à amônia geralmente é maior (Zhao *et al.* 1997), além da sua acumulação na hemolinfa, que por sua vez é influenciada pela permeabilidade da membrana a amônia, por mecanismos de redução de difusão passiva, capacidade de excreção contra um gradiente de concentração e processos internos de desintoxicação (Romano e Zeng 2013). Normalmente, quando o NH_3 alcança a hemolinfa, ele é protonado em NH_4^+ , que então substitui potássio na atividade da Na^+/K^+ -ATPase basolateral das brânquias. Finalmente, o NH_4^+ é excretado para o ambiente via trocador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ apical ou via exocitose (Romano e Zeng 2007; Leone *et al.* 2017).

1.5. PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO

Falhas no processo de osmorregulação, como a incapacidade de regulação isosmótica intracelular (RII), podem desencadear alteração significativa no ambiente intracelular e possibilitar a desnaturação de proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos (Evans *et al.* 2009). Se isto ocorrer, a célula pode iniciar um aumento na síntese de chaperonas (Hsps), uma família de proteínas que hidrolisam o ATP e auxiliam no enovelamento de proteínas recém sintetizadas, além de encaminhá-las para destruição caso não ocorra o reparo (Terasawa 2005). Em estudos com o siri *Portunus trituberculatus*, a exposição à diluição de salinidade aumentou a sua capacidade osmorregulatória por intermédio da captação ativa de Na^+ e Cl^- , ao mesmo tempo em que houve aumento na síntese de Hsps para reparar o dano celular. Essas atividades demandam alto custo energético, o que impacta nas taxas de crescimento deste crustáceo (Lu *et al.* 2013). As Hsps também são conhecidas como proteínas de estresse, uma família de proteínas altamente conservadas de peso molecular que varia de 16 a 100 kDa, produzidas em todos os seres multicelulares quando submetidos a agentes estressores como anoxia, isquemia, toxinas, acidose, choque osmótico além de estresse térmico (Roberts *et al.* 2010).

Uma das proteínas mais conhecidas e estudadas desta família é a Hsp70, que auxilia na dobra e montagem de proteínas recém sintetizadas, redobramento de proteínas deformadas e de agregados proteicos, além do controle da atividade de proteínas regulatórias (Mayer e Bukau 2005). A presença da Hsp70 também pode ser utilizada como biomarcador, indicando estresse de origem antropogênica em espécies aquáticas (Webb e Gagnon 2009).

Embora a maioria das espécies conhecidas apresentem genes relacionados a síntese de chaperonas, a expressão gênica destas proteínas, principalmente Hsp70, é espécie-dependente e ambiente-dependente, assim como está relacionada com a exposição a agentes estressores (Yenary *et al.* 1999). É possível que as espécies que apresentam maiores níveis de síntese de chaperonas estejam sujeitas a grande variação de condições ambientais, como as espécies que vivem ou passam parte do seu ciclo de vida em estuários, o que pode torná-las resistente aos estresse (Feder e Hofmann 1999).

Em estudos anteriores do laboratório sobre a expressão de Hsp70, *C. danae* e *C. ornatus*, foram submetidos a choque hipo e hiperosmótico (5‰ e 40‰, respectivamente) durante o período de 3 horas, não sendo possível detectar mudanças no nível de expressão de Hsp70 em relação ao grupo controle (35‰). As alterações de salinidade responsáveis por desequilíbrio osmótico do líquido extracelular podem ter impactado no funcionamento normal das células. Estas células, por sua vez, ativaram respostas rápidas, associadas simultaneamente a outros mecanismos compensatórios envolvendo regulação de volume celular, o que pode ter assegurado o reestabelecimento da homeostase do meio interno (Marshall 2003; Freire *et al.* 2008). Desta maneira, não houve a necessidade da ativação de mecanismos mais elaborados e que são mais custosos metabolicamente, como a síntese de Hsp70, devido ao tempo de exposição ao choque osmótico ter sido breve (Souza-Bastos, dados não publicados).

1.6. HIPÓTESE

H. pudibundus, por habitar um ambiente mais estável, apresentaria menor expressão constitutiva de Hsp70 na condição controle (35‰). *C. danae* e *C. ornatus*, embora do mesmo gênero, apresentam diferenças, por exemplo, na ativação de enzimas antioxidantes. *C. danae* (mais eurihalino) têm maior atividade antioxidante constitutivamente, enquanto *C. ornatus* (menos eurihalino), apenas quando há necessidade, como exposição ao ar ou hipersalinidade (Freire *et al*, 2011). Estas duas espécies teriam maior indução da expressão de Hsp70 diante de redução de salinidade em decorrência da ativação da hiperregulação. Diante de aumento de salinidade, a maior expressão de Hsp70 ocorreria para proteger o meio intracelular da precipitação de proteínas pelo choque hiperosmótico. A hipótese alternativa seria de que ocorra aumento na expressão de Hsp70 em *H. pudibundus* devido à necessidade de proteção dos mecanismos intracelulares necessários para a regulação de volume celular, característica de osmoconformadores.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a intensidade e a variação da expressão de Hsp 70 diante de desafios salinos em três espécies de decápodes braquiúros: *C. danae* e *C. ornatus* (osmorreguladores) e *H. pudibundus* (osmoconformador).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar a osmolalidade da hemolinfa de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de aumento e redução de salinidade.
- Comparar a capacidade de hidratação muscular de ambas às espécies quando expostas a oscilações de salinidade do meio.
- Qualificar e quantificar a expressão de Hsp70 como mecanismo molecular ativador de proteção frente ao choque osmótico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA E ACLIMATAÇÃO

Crustáceos decápodos de três espécies, os siris *C. danae*, *C. ornatus* e o caranguejo marinho *H. pudibundus* provenientes do descarte da fauna acompanhante da pesca com rede de arrasto de camarão, foram coletados junto às bancas de pescadores do Balneário de Shangrilá, localizada no litoral do Paraná (25° 37' 29"S, 48° 25' 3"W). De imediato, os animais foram acomodados em caixas plásticas contendo água do local de coleta e mantidas sob aeração constante. Após este procedimento, foram transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram em aquário estoque contendo água do mar a 33‰ ± 2 e 24°C ± 1 durante 05 dias. Durante o período de aclimatação, os animais permaneceram em um aquário com aeração constante, filtro externo, pH ~8,3, oxigênio dissolvido na água em torno de 8,0 mg/L e fotoperíodo natural. Os animais foram alimentados a cada dois dias com pequenas porções de filé de peixe, sendo que este procedimento foi interrompido 24 horas antes do início dos experimentos.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi executado com 1 espécime por aquário de 2 litros, exposto ou a choque hiposalino (20‰) ou hipersalino (45‰) em intervalos com duração de 6, ou 24, ou 72 horas. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas. Os tempos e as salinidades foram baseados em experimentos anteriores realizados neste laboratório, em que *C. danae* e *C. ornatus* foram expostos a condição experimental de 03 horas em salinidades 5‰ e 40‰, sem que tenha havido diferença na concentração de Hsp70 em relação ao controle. Todo o processo foi repetido 6 vezes para cada grupo experimental ou controle, totalizando 114 animais (42 espécimes de *C. Danae* e *C. Ornatus* e 30 espécimes de *H.pudibundus*). A diluição da salinidade foi conseguida pela adição de água de torneira filtrada com a utilização de filtros de celulose e carvão ativado, e a solução de água do mar hipersalina foi alcançada pela adição de sal marinho obtido comercialmente em lojas de aquários. Após os experimentos, os animais foram crióanestesiados por aproximadamente 5 minutos, cobertos por gelo picado em caixa de isopor, e foram retirados amostras de tecido muscular para determinação da concentração de Hsp 70 e de teor hídrico.

Também foi coletada uma amostra de hemolinfa por punção da membrana artrodial de um pereópodo, usando seringa de insulina, e armazenada em freezer -20°C para determinação da osmolalidade e concentrações iônicas. Também foram analisadas a concentração de amônia dissolvida na água e pH no início e ao final dos experimentos.

3.3. DOSAGEM DE OSMOLALIDADE

A avaliação da osmolalidade foi feita através de Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor VAPRO 5520 (Wescor).

3.4. TEOR HÍDRICO

Para a determinação do teor hídrico, amostras do tecido muscular foram pesadas (peso úmido) em tubos previamente pesados e fechados (Balança Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secos em estufa por 24 horas a 62°C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem do peso úmido inicial da amostra através da fórmula:

$$\text{Th (\%)} = [(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido}] \times 100$$

3.5. DOSAGENS DE AMÔNIA E pH

A concentração de amônia na água no início e ao fim dos experimentos foi medida utilizando-se o *kit* comercial da AlphaKit com leitura de absorvância a 630 nm em espectrofotometro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Suécia). Os valores de pH foram medidos no início e ao final dos experimentos utilizando um (inoLAB pH Level 1WTW, Germany).

3.6. EXPRESSÃO DE HSP70

A expressão de Hsp70 foi obtida através do método de Western Blotting. fragmentos do tecido muscular de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* (~300 mg) foram homogeneizados durante 5 minutos em tampão de homogeneização (HEPES 20 mM, NaCl 15 mM, Triton X-100 1%, NP-40 1%) em conjunto com inibidores de proteases (Benzamidina 20 mM, EDTA 10 mM, Iodocetamida 10 mM, Pepstatina 5µg/mL, Fenantrolina 5 mM, PMSF 2 mM). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 13.400 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante retirado e congelado a -80 °C. Para determinação das proteínas totais no sobrenadante foi

utilizado o método descrito por Bradford (1976). Uma alíquota do extrato de proteínas contendo 100µg de proteína total do sobrenadante extraído do músculo de ambas as espécies foi diluída em tampão de amostra redutor e então submetida ao gel de corrida eletroforética (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150 mM contendo SDS 1 mM (pH 8,8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50 mM contendo SDS 1 mM (pH 6,8). Para a corrida, foi utilizado tampão Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS, durante aproximadamente 4 horas com corrente constante de 10-15 mA. Após a corrida, o gel contendo os peptídeos foi submetido à transferência para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blotting contendo tampão de transferência composto por Tris-Base, Glicina, SDS 10% e Metanol 20%. A transferência será realizada em corrente de 120-135 mA e 25 mV overnight a ~4°C.

A membrana foi retirada, a faixa com o marcador de peso molecular foi cortada, e então foi bloqueada em tampão TBST (NaCl 120mM, TRIS-HCl 20mM ph 7,4 e Tween-20 0,05%) contendo leite em pó Mólico (Nestlé®) 5% por 1 hora, para bloqueio dos sítios não específicos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por duas horas com anticorpo primário anti-Hsp70 (marca BD). Em seguida a membrana foi lavada em tampão TBST e posteriormente incubada com anticorpo secundário (anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina) por duas horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com tampão TBST e em seguida foi coberta com cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP/NBT, permanecendo nesta solução por ~10 minutos ou até completo aparecimento das bandas proteicas. Após a revelação, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água destilada para parar a reação. A membrana foi então digitalizada e a expressão das proteínas foi quantificada através da análise de intensidade relativa de cinza das bandas, utilizando-se o programa ImageJ.

3.7. TRATAMENTO ESTATISTICO

Para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizada a análise de variância de uma via, para análise de diferença dos tempos entre as espécies dentro de cada salinidade, seguido de test-t de Student entre as espécies e para cada condição experimental. Todas as análises foram feitas utilizando o software Sigma Plot® 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. OSMOLALIDADE

Em *C. danae* exposto a salinidade 20‰, a osmolalidade diminuiu após 6 horas (891 ± 15 mOsm/kg H₂O), 24 horas (846 ± 18 mOsm/kg H₂O) e 72 horas (856 ± 16 mOsm/kg H₂O) quando comparada com a salinidade controle de 35‰ (986 ± 22 mOsm/kg H₂O). Em salinidade 45‰, houve aumento da osmolalidade após 6 horas (1250 ± 42 mOsm/kg H₂O), 24 horas (1242 ± 25 mOsm/kg H₂O) e 72 horas (1229 ± 7 mOsm/kg H₂O). Não houve diferença entre os tempos dentro de cada salinidade (FIGURA 2A).

Em *C. ornatus* exposto a salinidade 20‰, a osmolalidade diminuiu após 6 horas (812 ± 6 mOsm/kg H₂O), 24 horas (777 ± 5 mOsm/kg H₂O) e 72 horas (766 ± 16 mOsm/kg H₂O) quando comparada com a salinidade controle de 35‰ (999 ± 4 mOsm/kg H₂O). Em salinidade 45‰, houve aumento da osmolalidade após 24 horas (1302 ± 17 mOsm/kg H₂O) e 72 horas (1245 ± 9 mOsm/kg H₂O). Houve diferença entre os tempos de 6 e 24 horas dentro da salinidade 45‰ (FIGURA 2B).

Em *H. pudibundus* exposto a salinidade 20‰, a osmolalidade diminuiu após 6 horas (813 ± 14 mOsm/kg H₂O) e não houve sobreviventes após 24 e 72 horas. A osmolalidade da salinidade controle (35‰) foi medida em (975 ± 12 mOsm/kg H₂O). Em salinidade 45‰, houve aumento da osmolalidade após 6 horas (1331 ± 11 mOsm/kg H₂O), 24 horas (1257 ± 24 mOsm/kg H₂O) e 72 horas (1285 ± 12 mOsm/kg H₂O). Houve diferença entre os tempos de 6 e 24 horas dentro da salinidade 45‰ (FIGURA 2C).

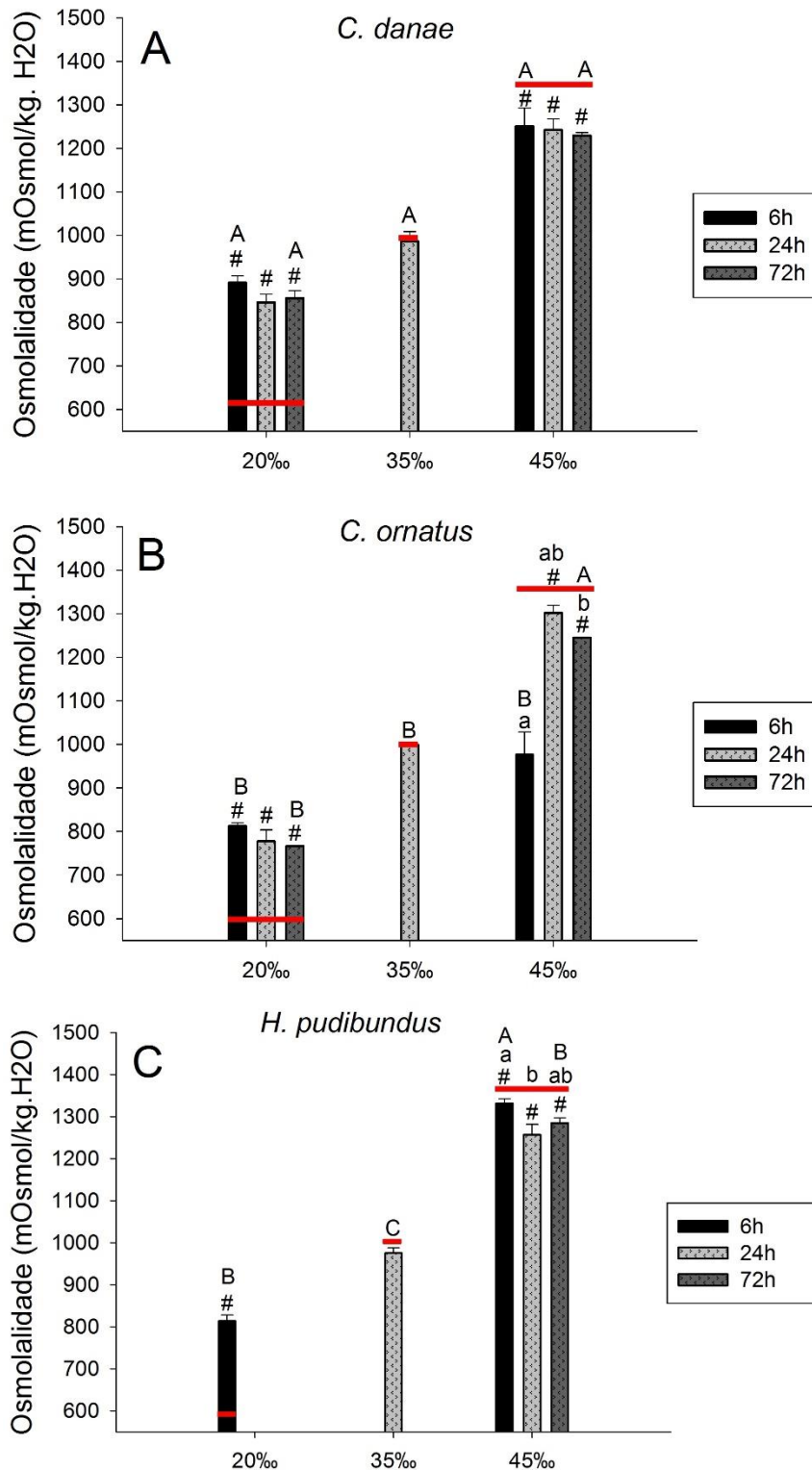


FIGURA 2. Osmolalidade na hemolinfa (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparada a situação controle. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos em cada salinidade. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. n=6. A linha vermelha representa a osmolalidade da água.

4.2. TEOR HÍDRICO

Em *C. danae* não foi observada diferença nos valores de teor hídrico muscular entre os tempos experimentais em salinidade 20‰ comparados ao controle de 35‰ ($75\pm 0,9\%$). Em salinidade 45‰, apenas o tempo de 24 horas ($72\pm 0,9\%$) mostrou valores de teor hídrico muscular diferente do controle. Não houve diferença entre os tempos dentro de cada salinidade (FIGURA 3A).

Em *C. ornatus* não houve diferença no teor hídrico das condições experimentais em relação a condição controle e nem entre os tempos dentro de cada uma das duas salinidades (FIGURA 3B).

Em *H. pudibundus* as únicas diferenças registradas nos valores de teor hídrico em relação ao controle ($74\pm 0,8\%$) foram relacionadas aos tempos de 24 ($70\pm 0,7\%$) e 72 horas ($72\pm 0,2\%$) em salinidade 45‰. Não houve diferença entre os tempos dentro de cada salinidade (FIGURA 3C).

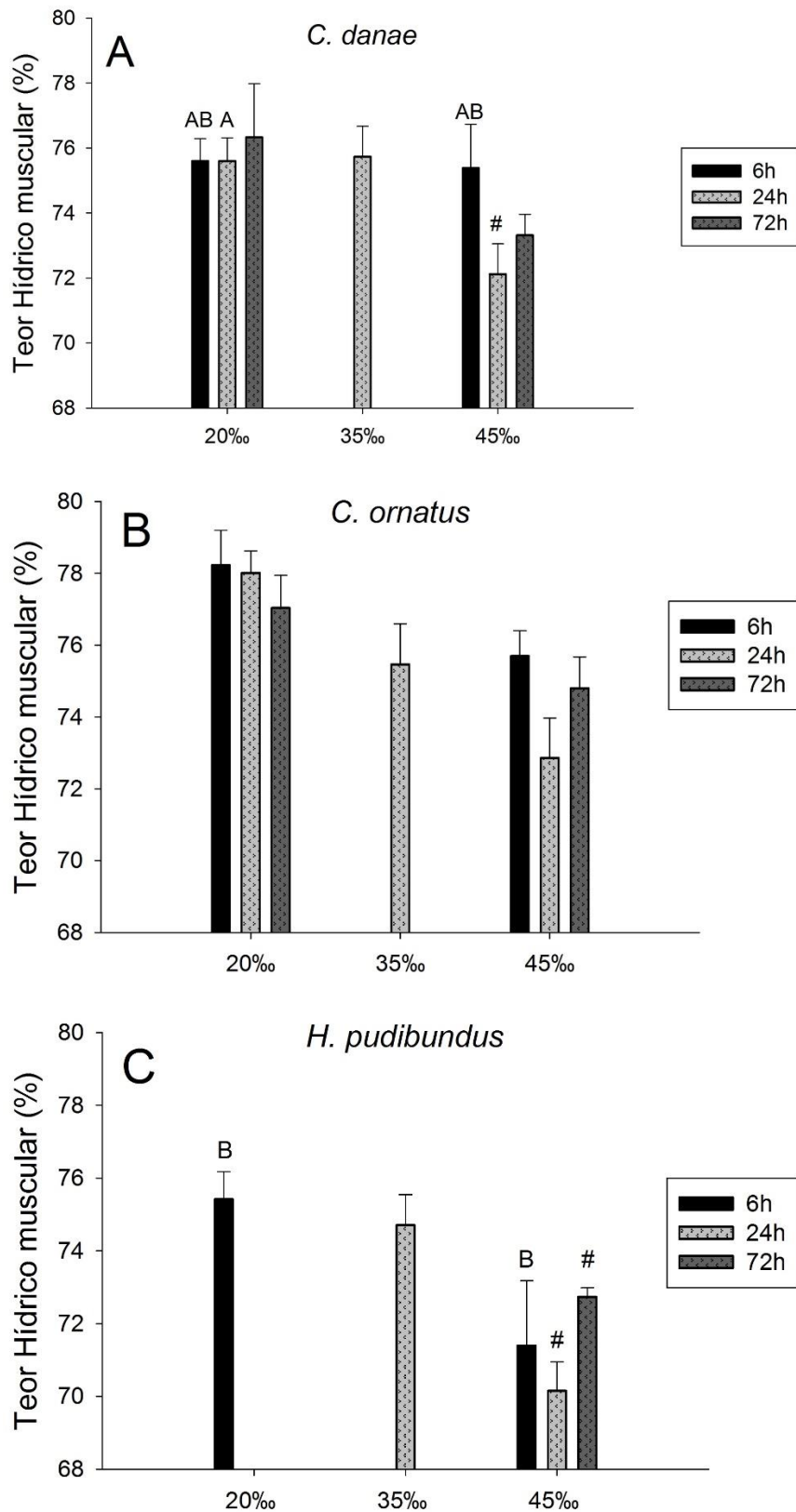


FIGURA 3. Teor hídrico muscular (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparada a situação controle. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. $5 > n < 6$

4.3. CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA NA ÁGUA

Em *C. danae* a concentração de final de amônia na água foi diferente da concentração inicial após a exposição a situação controle (35‰) e aos tempos experimentais em 20‰. Em salinidade 45‰ não houve diferença entre as concentrações finais e iniciais de amônia na água. Também não foram registradas diferenças entre os tempos dentro de suas respectivas salinidades (TABELA 1A).

Em *C. ornatus* a concentração de final de amônia na água foi diferente da concentração inicial após os tempos de 24 e 72 horas em 20‰. Em salinidade 45‰ não houve diferença entre as concentrações finais e iniciais de amônia na água. Considerando os tempos dentro da salinidade 20‰, os valores de amônia na água obtidos em 6 horas foram diferentes dos encontrados em 24 e 72 horas (TABELA 1B).

Em *H. pudibundus*, somente foi constatada diferença na concentração final de amônia na água em relação a concentração inicial para o tempo de 72 horas em salinidade 45‰, não sendo encontrada nenhuma diferença entre os tempos dentro desta salinidade (TABELA 1C).

TABELA 1 – Concentração de amônia (N-NH₃) na água inicial e final (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (*): Diferença na concentração inicial e final de amônia na água. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. n=6.

A	Salinidades/Tempos	Amônia Inicial (N-NH ₃) mg/L	Amônia final (N-NH ₃) mg/L	
	<i>C. danae</i>	20‰ 6 horas	0,039 ± 0,00	0,323 ± 0,08 * A
20‰ 24 horas		0,000 ± 0,00	0,449 ± 0,13 *	
20‰ 72 horas		0,000 ± 0,00	0,285 ± 0,03 *	
35‰ 24 horas		0,000 ± 0,00	0,180 ± 0,02 A	
45‰ 6 horas		0,002 ± 0,00	0,001 ± 0,00 A	
45‰ 24 horas		0,002 ± 0,00	0,000 ± 0,00	
45‰ 72 horas		0,000 ± 0,00	0,040 ± 0,02	
B	<i>C. ornatus</i>	20‰ 6 horas	0,033 ± 0,00	0,038 ± 0,01 a B
		20‰ 24 horas	0,033 ± 0,00	0,619 ± 0,06 * b
		20‰ 72 horas	0,033 ± 0,00	0,705 ± 0,12 * b
		35‰ 24 horas	0,000 ± 0,00	0,000 ± 0,00 B
		45‰ 6 horas	0,002 ± 0,00	0,014 ± 0,00 B
		45‰ 24 horas	0,002 ± 0,00	0,000 ± 0,00
		45‰ 72 horas	0,000 ± 0,00	0,035 ± 0,02
C	<i>H. pudibundus</i>	20‰ 6 horas	0,033 ± 0,00	0,038 ± 0,01 B
		20‰ 24 horas	-	-
		20‰ 72 horas	-	-
		35‰ 24 horas	0,028 ± 0,00	0,035 ± 0,01 C
		45‰ 6 horas	0,004 ± 0,00	0,000 ± 0,00 A
		45‰ 24 horas	0,004 ± 0,00	0,000 ± 0,00
		45‰ 72 horas	0,001 ± 0,00	0,025 ± 0,02 *

4.4. VALORES DE pH NA ÁGUA

Em *C. danae* foi encontrada diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água após a exposição a situação controle (35‰) e em 6 horas em salinidade 20‰, sendo que os valores obtidos para 6 horas foram iguais aos valores de 24 e 72 horas, e estes dois últimos tempos foram diferentes entre si. Em salinidade 45‰, foi encontrada diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água após a exposição a todos os tempos, sendo que os valores obtidos para 6 horas são diferentes de 24 e 72 horas, e estes dois últimos tempos foram iguais entre si (TABELA 2A).

Em *C. ornatus* foi encontrada diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água em situação controle (35‰) e após a exposição a todos os tempos em salinidade 20‰, e não foi constatada diferença entre os tempos dentro desta salinidade. Em salinidade 45‰, foi encontrada diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água após a exposição a todos os tempos, sendo que não foi constatada diferença entre os tempos dentro desta salinidade (TABELA 2B).

Em *H. pudibundus*, foi encontrada diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água após a exposição em situação controle após 6 horas em salinidade 20‰, assim como em todos os tempos após a exposição em salinidade 45‰. Não foi constatada diferença entre os tempos dentro desta salinidade (TABELA 2C).

TABELA 2 – Valores de pH na água inicial e final (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (*): Diferença nos valores de pH iniciais e finais na água. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies em cada tempo. n=6.

A	Salinidades/Tempos	pH inicial	pH final	
<i>C. danae</i>	20‰ 6 horas	8,22 ± 0,00	7,87 ± 0,07	* ab AB
	20‰ 24 horas	8,22 ± 0,00	8,03 ± 0,10	a
	20‰ 72 horas	7,56 ± 0,00	7,47 ± 0,00	b A
	35‰ 24 horas	7,69 ± 0,00	7,54 ± 0,09	A
	45‰ 6 horas	8,29 ± 0,00	8,12 ± 0,03	* a
	45‰ 24 horas	8,29 ± 0,00	7,75 ± 0,08	* b A
	45‰ 72 horas	7,88 ± 0,00	7,63 ± 0,07	* b AB
<i>C. ornatus</i>	20‰ 6 horas	8,31 ± 0,00	7,80 ± 0,04	* A
	20‰ 24 horas	8,31 ± 0,00	7,78 ± 0,09	*
	20‰ 72 horas	8,31 ± 0,00	7,87 ± 0,02	* B
	35‰ 24 horas	8,08 ± 0,00	7,64 ± 0,14	B
	45‰ 6 horas	8,27 ± 0,01	8,00 ± 0,08	*
	45‰ 24 horas	8,29 ± 0,00	7,84 ± 0,08	* A
	45‰ 72 horas	8,31 ± 0,00	7,61 ± 0,17	* A
<i>H. pudibundus</i>	20‰ 6 horas	8,31 ± 0,00	7,92 ± 0,03	* B
	20‰ 24 horas	-	-	
	20‰ 72 horas	-	-	
	35‰ 24 horas	8,09 ± 0,00	8,02 ± 0,03	AB
	45‰ 6 horas	8,25 ± 0,00	8,03 ± 0,02	*
	45‰ 24 horas	8,25 ± 0,00	8,02 ± 0,04	* B
	45‰ 72 horas	8,27 ± 0,01	7,89 ± 0,04	* B

4.5. EXPRESSÃO DE Hsp70

Em *C. danae*, a expressão da enzima Hsp70 detectada por Western blotting e quantificada através da intensidade das bandas (unidade arbitrária) foi diferente em relação ao controle de 35‰ ($8,4 \pm 0,5$ u.a.) apenas para o tempo de 72 horas em salinidade 20‰ ($5,1 \pm 0,4$ u.a.). Não houve diferença entre os tempos dentro de cada salinidade (FIGURA 4A).

Em *C. ornatus*, foram detectados diferenças nos valores da expressão de Hsp70 em relação ao controle de 35‰ ($5,9 \pm 0,8$ u.a.) para os tempos de 6 ($14,0 \pm 2,6$ u.a.) e 24 horas ($9,0 \pm 0,9$ u.a.) em salinidade 20‰ e 24 horas em salinidade 45‰ ($10,2 \pm 1,4$ u.a.). Não houve diferença entre os tempos dentro de cada salinidade (FIGURA 4B).

Em *H. pudibundus*, diferenças na expressão de Hsp70 em relação a condição controle de 35‰ ($11,8 \pm 1,4$ u.a.) foram observadas em 6 ($6,3 \pm 0,6$ u.a.), 24 ($5,1 \pm 1,3$ u.a.) e 72 horas ($3,1 \pm 0,1$ u.a.) em salinidade 45‰. Dentro desta mesma salinidade os valores obtidos para 6 horas foram iguais aos valores de 24 horas e diferente para os valores de 72 horas, sendo que não houve diferença entre estes dois últimos tempos (FIGURA 4C).

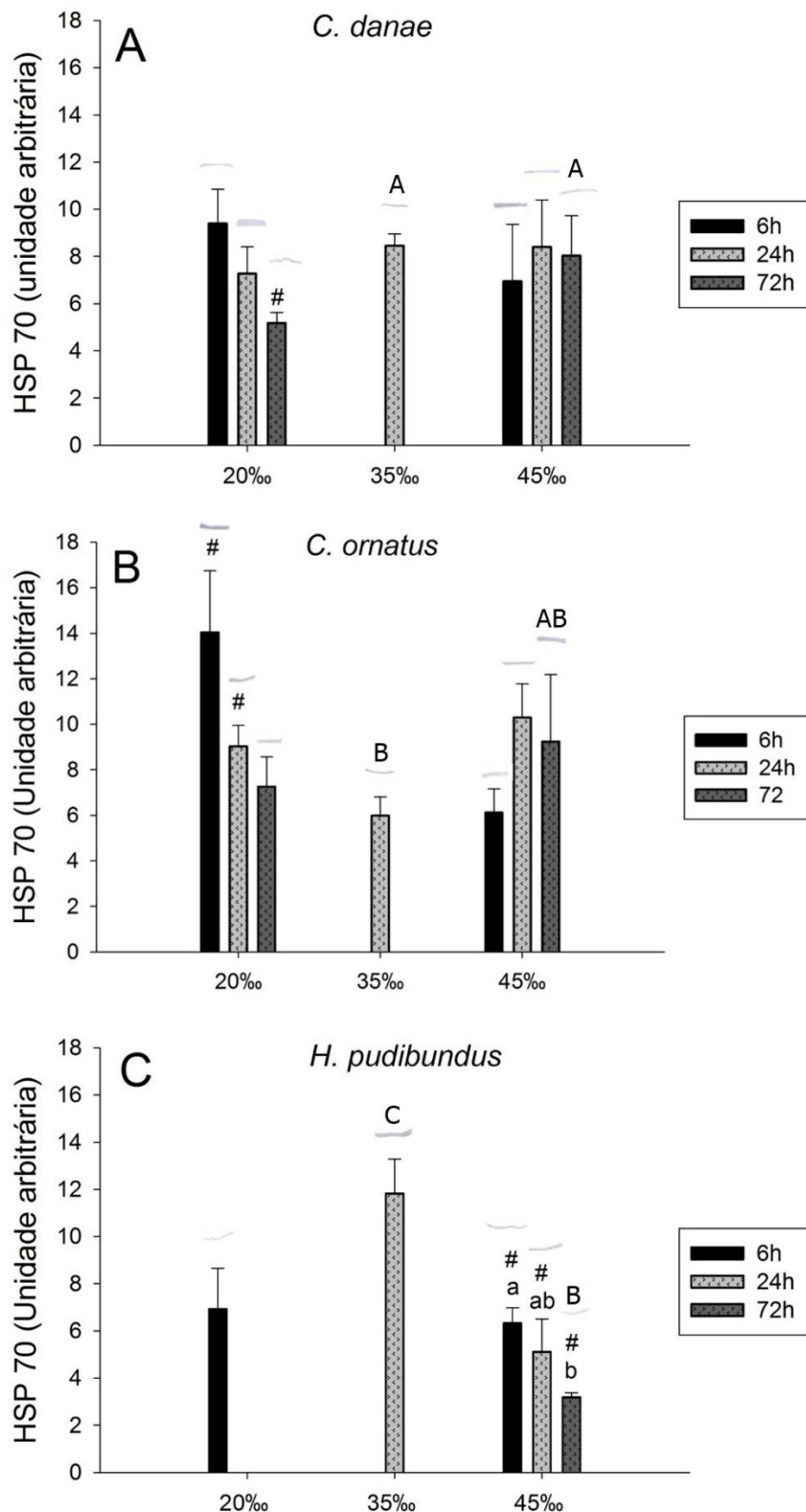


FIGURA 4. Expressão de Hsp70 muscular (média + erro padrão) de *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* diante de desafios salinos. Os caranguejos foram expostos por 6, 24 e 72 horas a salinidade 20‰ (*H. pudibundus* sobreviveu por apenas 6 horas) e por 6, 24 e 72 horas à salinidade 45‰. Para o controle foi utilizada a salinidade de 35‰ e o tempo de 24 horas (#): Diferença comparado a situação controle. Letras minúsculas representam diferenças entre os tempos. Letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies cada tempo. 3>n<6

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* (para o tempo de 6 horas) demonstraram boa capacidade osmorregulatória frente a exposição a salinidade 20‰. Nas três espécies os valores da osmolalidade da hemolinfa diminuíram em relação ao controle, mas permaneceram acima da osmolalidade aproximada para a água (~600 mOsm/kg H₂O). Estes resultados estão consistentes com demais estudos realizados neste laboratório (Togni 2007; Amado 2010; Rios 2014) e em outros artigos publicados (Harris 2000; Masui *et al* 2002; Garçon *et al* 2009; Freire *et al* 2011). Em um trabalho conduzido por Garçon *et al* (2009), espécimes de *C. ornatus* foram aclimatadas a salinidade de 21‰ por 15 dias. Ao final deste período a osmolalidade da hemolinfa tornou-se isosmótica a salinidade da água. Muito provavelmente, essas diferenças na osmolalidade devem-se ao maior tempo de exposição à hiposalinidade (15 dias contra apenas 3 neste estudo), o que evidencia a importância do tempo de exposição em experimentos de alteração de salinidade.

Em *H. pudibundus*, um crustáceo osmoconformador, o valor da osmolalidade medida neste estudo está acima da osmolalidade aproximada da água em 20‰. Em trabalho conduzido por Foster *et al* (2010), a osmolalidade de *H. pudibundus*, quando submetido a choque hiposmótico de 25‰, tornou-se isosmótica ao ambiente externo, resultado esperado pela suas características osmoconformadoras. A diferença entre os resultados obtidos nestes dois trabalhos pode ser explicada pela utilização de outra salinidade (25 para 20‰), o tempo de exposição (16 para 6 horas) e por uma possível alteração comportamental. A percepção do animal a esta condição adversa pode ativar alterações comportamentais, como constatado em *Cancer gracilis* submetidos a diminuição de salinidade, em que foi observado a retração de antenas, fechamento de peças bucais e quiescência. Esta atitude pode fazer com que a câmara branquial seja isolada do meio hiposalino, tornando o líquido no seu interior mais concentrado do que o ambiente externo (Sugarman *et al.* 1983; MCGAW 2006).

Quando os espécimes foram expostos ao choque hiperosmótico, os valores de osmolalidade das três espécies foram parecidos com a osmolalidade da água em 45‰ (~1350 mOsm/kg H₂O). Este resultado pode estar relacionado à característica intrínseca das espécies pertencentes ao gênero *Callinectes*, de adquirir características osmoconformadoras em altas salinidades (Pequex 1995; Freire *et al*

2008). Resultados parecidos foram obtidos em estudos com outros decápodes como um caranguejo da família varunidae, *Hemigrapsus edwardsi* (Bedford e Leader, 1978), camarões peneídeos (Sang 2004; Lignot 2000) e em siris portunídeos (Guerin e Stickle 1997; Tangkrock-Olan 2009).

A análise do teor hídrico revelou que em salinidade 20‰ não houve diferença quando as três espécies são comparadas a situação controle. Estes dados corroboram estudo anterior feito neste laboratório em que *C. danae* foi exposto a choque hiposalino de 10‰ por até 6 horas, não ocorrendo diferença em relação a salinidade controle de 35‰ (Rios 2014) e em *C. ornatus* e *H. pudibundus* quando expostos a diluição da água do mar (25‰) por até 6 horas sem alteração na hidratação tecidual (Amado 2010; Rios, dados não publicados).

Em exposição a salinidade 45‰, *C. danae* e *C. ornatus* apresentaram valores próximos aos seus respectivos controles e menor perda de água tecidual do que *H. pudibundus*. Tanto *C. danae* (mais eurihalino) quanto *C. Ornatus* (menos eurihalino) ocupam habitats como estuários, baías e mar aberto (Pita *et al.* 1985; Pinheiro *et al.* 1997; Keunecke *et al.* 2008; Freire *et al.* 2011), o que pode ter refletido na grande capacidade de manutenção da hidratação tecidual demonstrada neste estudo, mesmo quando expostos a salinidade de 45‰.

Quando comparados com o controle e com *C. danae* e *C.ornatus*, *H.pudibundus* apresenta os menores valores de hidratação tecidual em salinidade 45‰. Isso pode ser explicado pelas características intrínsecas do Aumento Regulatório de Volume (RVI), tipicamente encontrada em osmoconformadores. A resposta imediata a diminuição do volume celular é a mobilização de osmólitos inorgânicos (Na^+ , K^+ , Cl^-) pelas células e a mobilização de osmólitos orgânicos devido ao catabolismo de proteínas. Em uma escala maior de tempo (dias ou semanas) a regulação de volume se dá através de osmólitos orgânicos, que para serem mobilizados, necessitam de transcrição e tradução de genes para transportadores, além de síntese de enzimas (Amado 2012; Strange 2004). Como a alta concentração de sais intracelulares, como o NaCl pode interferir na atividade enzimática e de proteínas celulares (Wehner *et al* 2003), o RVI pode ser comprometido se o animal for exposto durante muito tempo a alta salinidade.

A excreção de amônia na água foi maior em salinidade 20‰ para *C. danae* e *C. ornatus* do que para as salinidades controle e 45‰, enquanto que em *H. pudibundus* não houve diferença entre os valores obtidos para nenhuma das condições, o que demonstra que houve pouquíssima excreção de amônia por esse crustáceo durante este estudo.

A amônia, em solução, pode ser encontrada em suas duas formas: NH_3 e NH_4^+ , e a existência de amônia não iônica (NH_3) ou iônica (NH_4^+) é dependente dos valores de pH (Weinrauch 2004). Por exemplo: em pH 7,8 estima-se que 98% esteja na forma iônica e 2% na forma não iônica (Cameron e Heisler, 1983). É bem conhecido que a diluição de salinidade causa diminuição na concentração de amino ácidos dos tecidos e aumenta a excreção de NH_4^+ em crustáceos (Lange 1972; Leone *et al.* 2017). Em animais osmorreguladores, a excreção de NH_4^+ parece estar ligada ao processo de regulação iônica, como por exemplo em *Litopenaeus stylirostris*, que aumenta a excreção de NH_4^+ quando hiperregula e diminui a excreção quando hiporegula (Diaz, 2004). Estudos conduzidos por Towle e Holleland (1987) e Lucu *et al.* (1989) indicaram que NH_4^+ pode substituir K^+ durante a ativação da Na^+/K^+ -ATPase.

Em estudos mais recentes, Masui *et al.* (2002, 2009) percebeu que a Na^+/K^+ -ATPase branquial de *C. danae* é sinergicamente estimulada por NH_4^+ e K^+ . De forma semelhante, Garçon *et al.* (2009) observou em *C. ornatus* uma estimulação sinérgica entre NH_4^+ e K^+ que leva ao aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase. Neste mesmo estudo, a atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase em *C. ornatus* foi cerca de três vezes menor do que em *C. danae* (Masui *et al.* 2002), provavelmente devido ao fato de que *C. ornatus* ocupa regiões com salinidades mais altas do que *C. danae*, que é encontrado em regiões com maior aporte de água doce e variação de salinidade (Mantelatto e Fransozo 2000; Freire *et al.* 2011), evidenciando as diferentes capacidades osmorreguladoras dessas duas espécies (Freire *et al.* 2011; Rios 2014) e corroborando com os resultados obtidos neste estudo, em que *C. danae* apresentou maior excreção de amônia do que *C. ornatus* e *H. pudibundus* em exposição a salinidade 20‰.

Houve queda nos valores de pH final na água comparado com o pH inicial para todas as espécies sendo que, proporcionalmente ao tempo, as maiores diferenças foram encontradas após 72 horas de exposição. O fato de os valores de pH na água estarem menores ao final do experimento deve-se, principalmente, ao fato de os

animais estarem respirando e produzindo CO₂, que difunde-se rapidamente na água formando ácido carbônico (H₂CO₃). Este ácido é considerado um ácido fraco e rapidamente se dissocia para formar hidrogênio (H⁺) e íons bicarbonato (HCO₃⁻) (Widdicomb e Spicer 2008). Esta acidificação na água parece ter sido compensada pelos mecanismos fisiológicos responsáveis pela regulação ácido base encontrados em crustáceos, pois os resultados relativos a osmolalidade, teor hídrico e excreção de amônia estão dentro dos valores esperados, sem levar em conta a acidificação da água provocada pelas três espécies durante os experimentos.

Entre os mecanismos responsáveis pelo equilíbrio ácido-base em crustáceos, talvez o principal deles seja a hidratação reversível do CO₂ pela enzima anidrase carbônica em ácido carbônico (H₂CO₃) e conseqüentemente HCO₃⁻ e H⁺ (Wheatly e Henry 1992; Perry e Gilmour 2006). Além de afetar o equilíbrio ácido-base, H⁺ e HCO₃⁻ também exercem um papel fundamental na osmorregulação, pois eles irão atuar no epitélio branquial, em que normalmente HCO₃⁻ é trocado por Cl⁻ e H⁺ por Na⁺ (Whiteley *et al.* 2001). Esta troca de íons eletroneutra é o principal mecanismo de regulação ácido-base em crustáceos decápodos (Wheatly e Henry 1992). Além disso, a anidrase carbônica parece exercer grande importância na tolerância a exposição a altas salinidades, como por exemplo, com o aumento da sua atividade nas brânquias de *Litopenaeus vannamei* submetidos a aumento de salinidade (Roy *et al.* 2007).

Em relação a expressão de Hsp70, *C. danae* e *C. ornatus* obtiveram desempenhos opostos em salinidade 20‰. Enquanto *C. danae* diminuiu gradualmente a expressão de Hsp70 até chegar ao menor valor após 72 horas, *C. ornatus* aumentou a síntese de Hsp70 durante as primeiras 24 horas e voltou aos níveis basais após 72 horas. Em exposição a salinidade 45‰, *C. danae* apresenta maior expressão de Hsp70 do que *H. pudibundus*, cuja síntese de Hsp70 quando comparada ao controle, diminui de forma gradual e chega aos menores valores após 72 horas.

Segundo Feder e Hofmann (1999), espécies que habitam regiões mais instáveis, como estuários, podem apresentar maiores níveis de expressão de Hsp70, o que pode torná-las mais resistente ao estresse. Este comportamento foi observado para *C. ornatus* durante as primeiras 24 horas de exposição a salinidade 20‰. Por outro lado, em um estudo conduzido por Werner (2004), o molusco marinho *Potamocorbula amurensis* foi incapaz de aumentar a síntese de Hsp70 em resposta

a choque térmico de 30 minutos, provavelmente devido a alto gasto energético com osmorregulação, da mesma forma como ocorreu neste estudo com *C. danae* após 72 horas de exposição a salinidade 20‰.

Em estudos do final dos anos 90, percebeu-se que a intensidade do agente estressor pode levar a um aumento da síntese de Hsp70 no início da exposição, e conforme o tempo de exposição é prolongado, a concentração de Hsp70 tende a diminuir, até chegar em um ponto em que o organismo perde a sua eficácia na produção desta chaperona e conseqüentemente, a sua capacidade de se proteger do agente estressor (Pyza 1997; Eckwert 1997). CHANG (2005) constatou aumento na expressão de Hsp70mRNA no músculo da lagosta *Homarus americanus* em exposição a choque hipo e hiperosmótico por 0,5 hora, mas após 2 horas de exposição, os valores de Hsp70mRNA voltaram as condições basais, evidenciando que o componente tempo também deve ser levado em consideração, além de fatores naturais como temperatura e salinidade para a utilização de Hsp70 como indicador de estresse.

Em trabalho produzido por Togni (2007), a questão temporal inclusive, pode ter sido responsável por não ter havido diferença na expressão de Hsp70 em *C. danae* e *C. ornatus* quando submetidos a choque hiposalino (10‰) e hipersalino (40‰) após 2 horas. De fato, o menor tempo em que o aumento de expressão de Hsp70 ocorreu nesse estudo só foi observado a partir de 6 horas de exposição a 20‰ para *C. ornatus*. Além disso, a concentração de Hsp70 também apresenta valores diferentes em tecidos diferentes. Quando foi feita a análise da expressão de Hsp70 em músculo, hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores de *Neohelice granulata*, um regulador hiper-hiposmótico eurihalino, submetido a choque hipo (0‰) e hiperosmótico (34‰) pelos tempos de 1 e 6 horas, somente foi detectado aumento na concentração de Hsp70 nas brânquias posteriores (Fernandes 2010), corroborando a afirmação de CHANG (2005) de que os tecidos não respondem da mesma maneira um determinado estresse.

A expressão de Hsp70 também ocorre na natureza, quando os animais se deparam com variações dos agentes abióticos, como temperatura e salinidade, principalmente em regiões mais instáveis, como estuários e costões rochosos (Feder e Hofmann 1999; Tomanek 2010; Madeira 2012). Nestes ambientes, a atuação conjunta de fatores como temperatura, salinidade e pH podem estimular a produção

de Hsps como mecanismo de defesa em decorrência ao estresse. Na tentativa de avaliar a ação sinérgica de temperatura, salinidade e pH, o caranguejo eurihalino hiper/hipo regulador *Pachygrapsus marmoratus* foi submetido a diluição de salinidade (de 35‰ para 15‰), diminuição de pH (de 8,0 para 7,0) e aumento de 1°C/h até atingir a temperatura crítica (CTMax). Da mesma maneira que ocorreu para *C. danae* neste estudo, em hiposalinidade e em pH 7,0, os níveis de Hsp70 foram menores quando comparados a situação controle. A explicação mais provável é que a energia poupada na síntese de Hsp70, que demanda alto custo energético (Hofmann e Somero 1995; Hamdoun *et al*/2003; Madeira *et al*/2014) seja utilizada para a osmorregulação, através da produção de transportadores de íons (Madeira 2014).

Quando foram analisadas a expressão de Hsp70 em algumas espécies marinhas (peixes, caranguejos e camarões) dentro de uma comunidade ao longo de um gradiente de temperatura até o limite superior térmico de tolerância, observou-se que espécies que habitam regiões com alta variação térmica, como a supra litoral, produziram maiores quantidades de Hsp70 do que espécies encontradas na região infra litoral (Madeira 2012). Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que os animais que habitam ambientes termicamente estáveis (peixes antárticos, invertebrados marinhos de grandes profundidades) podem não ter a capacidade de aumentar a síntese de Hsps diante de estressores abióticos (Tomanek 2010). Este aspecto relativo a falta de resposta ao choque térmico pode explicar o fato de que *H. pudibundus*, um crustáceo estritamente marinho, não tenha aumentado a síntese de Hsp70 frente ao estresse salino ao qual foi submetido neste estudo.

6. CONCLUSÃO

Em relação as espécies *C. danae* e *C. ornatus* (osmorreguladoras fracas) e *H. pudibundus* (osmoconformadora), existem poucos artigos publicados sobre sua osmorregulação e nenhum sobre a expressão de Hsp70 como indicador de estresse. Este trabalho tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre estas três espécies e contribuir para o preenchimento desta lacuna na literatura. Neste estudo *C. danae* e *C. ornatus* (osmorreguladoras fracas) e *H. pudibundus* (osmoconformadora), demonstraram grande capacidade de manutenção da osmolalidade da hemolinfa diante de redução de salinidade, ao menos por um período de poucas horas. *H. pudibundus* manteve a osmolalidade da hemolinfa acima dos valores referentes a linha isosmótica por 6 horas em salinidade 20‰. *C. danae* conseguiu melhor regulação da osmolalidade na hemolinfa em exposição a salinidade 20‰ do que *C. ornatus* após 72 horas. Todas as três espécies apresentaram comportamento osmoconformatório diante de aumento de salinidade, como o esperado. Em relação a capacidade de hidratação tecidual, *C. danae* e *C. ornatus* conseguiram, de forma geral, manter a sua hidratação tecidual diante de ambos os choques salinos, enquanto *H. pudibundus* apresentou diminuição significativa na quantidade de água no tecido muscular a partir de 24 horas de exposição em choque hipersalino. No que diz respeito aos fatores abióticos medidos na água e que variavam de acordo com o tempo de exposição, como pH e amônia, *C. danae* e *C. ornatus* não parecem ter sido afetados com severidade. Não se pode afirmar que a não sobrevivência de *H. pudibundus* aos tempos de 24 e 72 horas em salinidade 20‰ tenha sido causada pela própria salinidade, pH, concentração de amônia na água, ou uma combinação destes fatores. A hipótese de que *H. pudibundus* teria menor expressão constitutiva de Hsp70 não foi comprovada, mas a hipótese de que *C. danae* e *C. ornatus* apresentariam maior expressão de Hsp70 do que *H. pudibundus* diante ambos os choques salinos comprovou-se verdadeira, ao menos com relação a *C. danae* e condicionada a um tempo de exposição ao agente estressor de pelo menos 72 horas. A resposta à pergunta de que a expressão de Hsp70 poderia refletir estresse salino em *C. danae*, *C. ornatus* e *H. pudibundus* só pode ser plenamente respondida através da análise da expressão de Hsp70 em outros tecidos e utilizando diferentes intervalos de tempo de exposição ao estresse salino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amado, E.M. O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos. (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR, Curitiba, PR, 2011.

Baptista, C.; Pinheiro, M.; Blankenstein, A.; Borzone, C. 2003. Estrutura populacional de *C. ornatus Ordway* (Crustacea, Portunidae) no Balneário Shangri-La, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. Rev Bras Zool, 20:661-666.

Bedford, J. J.; Leader, J. P. 1978. Hyperosmotic readjustment of the crab, *Hemigrapsus edwardsi*. J Comp Physiol 128:147-151.

Camargo, J. A.; Alonso, Á. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. Environ Int 32:831-849.

Cameron, J. N.; Heisler, N. 1983. Studies of ammonia in the rainbow trout: physico-chemical parameters, acid-base behaviour and respiratory clearance. J Exp Biol 105:107-125.

Diaz, F.; Re, A. D.; Sierra, E.; Diaz-Iglesias, E. 2004. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). J Shellfish Res 23:903-910.

Dixon, C. J.; Ahyong, S. T.; Schram, F. R. 2003. A new hypothesis of decapod phylogeny. Crustaceana, 76:935-975.

Evans, D.H.; Charmantier, G.; Charmantier-Daures, M.; Towle, D. 2009. Osmotic and ionic regulation in Aquatic arthropods. In: D.H. Evans (ed.) Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals, pp. 295–366. CRC Press, Boca Raton, FL.

Feder, M. E.; Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol 61:243-282.

Florkin, M. 1962. La régulation isosmotique intracellulaire chez lês invertébratés marins euryhalins. Bull Acad Roy Belg CI Sci 48: 687–694.

Foster, C.; Amado, E. M.; Souza, M. M.; Freire, C. A. 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. J Exp Zool Part A, 313:80-94.

Fracasso, H. A. A.; Branco, J. O. 2005. Estrutura populacional de *H. pudibundus* (Herbst)(Crustacea, Decapoda) na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Zool 22:342-348.

Freire, C.A; Onken, H.; McNamara, J.C. 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Comp Biochem Physiol 151A: 272–304.

Freire, C. A.; Togni, V. G.; Hermes-Lima, M. 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*C. danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. Comp Biochem Phys A 160:291-300.

Garçon, D. P.; Masui, D. C.; Mantelatto, F. L.; Furriel, R. P.; McNamara, J. C.; Leone, F. A. 2009. Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). Comp Biochem Phys A 154:44-55.

Gray, John S.; Elliott, Michael. Ecology of marine sediments: from science to management. Oxford University Press, 2009.

Guerin, J. L.; Stickle, W. B. 1997. A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. J Exp Mar Biol Ecol, 218:165-186.

Harris, R. R.; Santos, M. C. F. 2000. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). Mar Biol 137:691-703.

Hoffmann, E. K.; Dunham, P. B. 1995. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. Int Ver Cytol 161:173-262.

Hoffmann, E. K.; Lambert, I. H.; Pedersen, S. F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol Rev 89:193-277.

Keunecke, K. A., Moreira, F., Silva Junior, D. R. D., & Verani, J. R. (2008). Idade e crescimento de *Callinectes danae* e *C. ornatus* (Crustacea, Decapoda) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia Ser Zool* 98:231-235.

Kirschner, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439–1452.

Lange, R. O. L. F. (1972). Some recent work on osmotic, ionic and volume regulation in marine animals. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Ver* 10:97-136.

Lang, F.; Busch, G. L.; Ritter, M.; Völkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol rev* 78: 247-306.

Leone, F. A.; Lucena, M. N.; Garçon, D. P.; Pinto, M. R.; McNamara, J. C. 2017. Gill Ion Transport ATPases and Ammonia Excretion in Aquatic Crustaceans. In *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates* (pp. 61-107). Springer International Publishing.

Lignot, J. H.; Spanings-Pierrot, C.; Charmantier, G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191:209-245.

Lu, Y. L.; Wang, F.; Jia, X. Y.; Gao, Q. F.; Dong, S. L. (2013). A laboratory simulation of the effects of acute salinity decrease on osmoregulation and Hsps expression in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*: implications for aquaculture. *Mar Freshw Behav Phy* 46:301-311.

Mantelatto, F. L. M. 2000. Allocation of the portunid crab *C. ornatus* (Decapoda: Brachyura) in the Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. *Crustacean Iss* 12:431-443.

Mantelatto, F. L. M.; Fransozo, A. 2000. Brachyuran community in Ubatuba bay, northern coast of São Paulo state, Brazil. *J Shellfish Res* 19:701-710.

Marshall, W. S. 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *BBA-Biomembranes*, 1618:95-105.

Masui, D. C.; Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C.; Mantelatto, F. L. M.; Leone, F. A. 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Phys C* 132:471-482.

Masui, D. C.; Mantelatto, F. L.; McNamara, J. C.; Furriel, R. P.; Leone, F. A. 2009. Na⁺, K⁺-ATPase activity in gill microsomes from the blue crab, *Callinectes danae*, acclimated to low salinity: novel perspectives on ammonia excretion. *Comp Biochem Phys A* 153:141-148.

Mayer, M. P.; Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670-684.

McGaw, I. J. (2006). Feeding and digestion in low salinity in an osmoconforming crab, *Cancer gracilis* I. Cardiovascular and respiratory responses. *J Exp Biol* 209: 3766-3776.

Melo, G.A.S. 1996. Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro. São Paulo, Plêiade, FAPESP, 604p.

Metcalf, J. L. 1989. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: history and present status in Europe. *Environ pollut*, 60:101-139.

Moreira, F. N.; Vianna, M.; Lavrado, H. P.; Silva-Junior, D. R.; Keunecke, K. A. 2011. Survival and physical damage in swimming crabs (Brachyura, Portunidae) discarded from trawling fisheries in an estuarine ecosystem in southeastern Brazil. *Crustaceana*, 84:1295-1306.

Moss, D.; Furse, M. T.; Wright, J. F.; Armitage, P. D. 1987. The prediction of the macro-invertebrate fauna of unpolluted running-water sites in Great Britain using environmental data. *Freshwater biol* 17:41-52.

Moyes, C. D.; Schulte, P. M. 2009. Principios de fisiología animal. 2 ed. São Paulo. Artmed Editora.752p.

Odum, E. P. 2001. Fundamentos de ecologia. 5ª ed., São Paulo. Thomson Learning. 612 p.

Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crustac Biol* 5: 1–60.

Pinheiro, M. A. A., Fransozo, A., & Negreiros-Fransozo, M. L. 1997. Dimensionamento e sobreposição de nichos dos portunídeos (Decapoda, Brachyura), na enseada da Fortaleza, Ubatuba, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool.* 14:371-378.

Pita, J. B., Rodrigues, E. S., Graça-Lopes, R. D.; Coelho, J. A. P. 1985. Levantamento da família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no complexo baía-estuário de Santos, São Paulo, Brasil. *Bol Inst Pesca.* 12:153-162.

Rebelo, M. F.; Rodriguez, E. M.; Santos, E. A.; Ansaldo, M. 2000. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Phys C* 125:157-164.

Rios, L. D. P. 2014. Repostas de curto-prazo a desafios salinos hipo-e hiper-osmóticos em siris marinhos-estuarinos: o papel da redução aparente de permeabilidade. 44p. Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas). Setor de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

Roberts, R. J.; Agius, C.; Saliba, C.; Bossier, P.; Sung, Y. Y. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J fish dis* 33:789-801.

Romano, N.; Zeng, C. 2007. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 266:246-254.

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

Romano, N.; Zeng, C. 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Rev Fish Sci* 21:1-21.

Sang, H. M.; Fotedar, R. 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) reared at different salinities. *Aquaculture*, 234:601-614.

Schram, F. R. 2001. Phylogeny of decapods: moving towards a consensus. In *Advances in Decapod Crustacean Research* pp. 1-20. Springer Netherlands.

Sherwood, L.; Klandorf, H.; Yancey, P. 2012. Fluid and Acid–Base Balance. In L. Sherwood (ed.) *Animal physiology: from genes to organisms*, pp. 612-654. Brooks/Cole, Thomson Learning, Belmont, USA.

Strange, K. 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28:155-159.

Sugarman, P. C.; Pearson, W. H.; Woodruff, D. L. 1983. Salinity detection and associated behavior in the Dungeness crab, *Cancer magister*. *Estuaries*, 6:380-386.

Tangkrock-Olan, N.; Ketpadung, R. 2010. A comparative study on the blood osmolality of the mud crab (*Scylla serrata*) and the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) exposed to different salinities: a case study for the topic “osmotic regulation” in high school biology. *Asian J Biol Educ*, 4:8-14.

Terasawa, K.; Minami, M.; Minami, Y. 2005. Constantly updated knowledge of Hsp90. *J Biochem* 137:443-447.

Togni, V.G. Efeito da salinidade sobre a resposta do sistema antioxidante e expressão de Hsp70 em siris (gênero *Callinectes*). (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR, Curitiba, PR, 2007.

Yenari, M. A.; Giffard, R. G.; Sapolsky, R. M.; Steinberg, G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (Hsp70). *Mol Med Today* 5:525-531.

Webb, D.; Gagnon, M. M. 2009. The value of stress protein 70 as an environmental biomarker of fish health under field conditions. *Environ Toxicol* 24:287-295.

Wehner, F.; Olsen, H.; Tinel, H.; Kinne-Saffran, E.; Kinne, R. K. 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* pp. 1-80. Springer Berlin Heidelberg.

Weihrauch, D.; Morris, S.; Towle, D. W. 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol* 207:4491-4504.

Whitfield, M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water-a theoretical study. *J Mar Biol Assoc UK*, 54:565-580.

Willmer, P.; Stone, G. and Johnston, I. 2005. *Environmental Physiology of Animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.

Zhao, J. H.; Lam, T. J.; Guo, J. Y. 1997. Acute toxicity of ammonia to the early stage-larvae and juveniles of *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards, 1853 (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquac Res* 28:517-525.